

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

\*\*\*\*\*

FACULTE DES SCIENCES

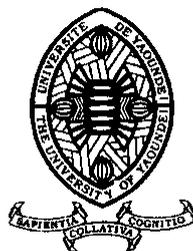
\*\*\*\*\*

CENTRE DE RECHERCHE ET  
DE FORMATION DOCTORALE  
EN SCIENCES DE LA VIE,  
SANTÉ ET ENVIRONNEMENT

\*\*\*\*\*

UNITE DE RECHERCHE EN  
SCIENCE DE LA VIE

\*\*\*\*\*



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

\*\*\*\*\*

FACULTY OF SCIENCE

\*\*\*\*\*

CENTRE FOR RESEARCH AND  
TRAINING SCHOOL FOR LIFE  
SCIENCE-HEALTH AND  
ENVIRONMENT

\*\*\*\*\*

DOCTORATE TRAINING UNIT OF  
LIFE SCIENCE

\*\*\*\*\*

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES

DEPARTMENT OF ANIMAL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE ANIMALE

LABORATORY OF ANIMAL PHYSIOLOGY

**Effets œstrogénique et anti-ostéoporotique de l'extrait  
éthanolique des écorces du tronc de *Lannea acida* A. Rich.  
(Anacardiaceae) : Etudes *in vitro* et *in vivo***

Thèse présentée et soutenue en vue de l'obtention du **Doctorat/Ph.D** en

**Biologie des Organismes Animaux**

Option : **Physiologie Animale**

par

**RIEPOUO MOUCHILI Oumarou**

***Master ès-sciences en Biologie des Organismes Animaux***

Option : **Physiologie Animale**

Matricule : **08Q0913**

Défendue publiquement le 18 septembre 2023, devant un jury composé ainsi qu'il suit :

Président : M. DIMO Théophile, Professeur ,

Rapporteur : M. NJAMEN Dieudonné, Professeur ,

Membres : M. MASSOMA LEMBE Dieudonné, Professeur ,

Mme NGUEGUIM TSOFAK Florence, Maître de Conférences,

M. DJIOGUE Séfirin, Maître de Conférences ,

Université de Yaoundé I ;

Université de Yaoundé I ;

Université de Douala ;

Université de Yaoundé I ;

Université de Yaoundé I.



Année 2023

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix-Travail-Patrie

\*\*\*\*\*

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I

FACULTÉ DES SCIENCES

\*\*\*\*\*



REPUBLIC OF CAMEROUN

Peace-Work-Fatherland

\*\*\*\*\*

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

\*\*\*\*\*

**DEPARTMENT OF ANIMAL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY**

**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE**

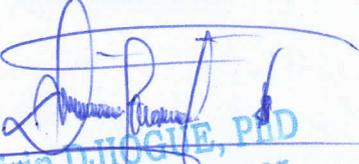
**ATTESTATION DE CORRECTION**

Nous soussignés, membres du jury de la soutenance de thèse de Doctorat/PhD en **Biologie des Organismes Animaux**, Option : **Physiologie Animale**, de Monsieur **RIEPOU MOUCHILI Oumarou**, matricule **08Q0913**, soutenance autorisée par la correspondance N° 23700132 UY1/VREPDTIC/DAAC/DEPE/SPD/SPDA/CB-AP de Monsieur le recteur de l'Université de Yaoundé I en date du 17 Juillet 2023 sur le sujet intitulé : « Effets oestrogénique et anti-ostéoporotique de l'extrait éthanolique des écorces du tronc de *Lannea acida* A. Rich. (Anacardiaceae) : Etudes *in vitro* et *in vivo* », attestons que les corrections exigées au candidat lors de cette évaluation, qui a eu lieu le lundi 18 septembre 2023 dans la salle multimédia de la Faculté des Sciences, ont réellement été effectuées.

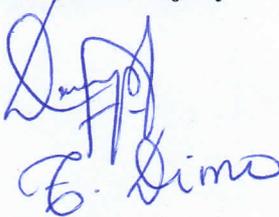
En foi de quoi, la présente attestation lui est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Fait à Yaoundé, le **25 JAN 2024**

L'Examineur

  
**Selrin DJIOQUE, PhD**  
Associate Professor  
University of Yaounde 1

Le Président du jury

  
**E. Dima**

Le Chef de Département



  
**Charles Félix Bilong Bilong**  
Professeur

<b>UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I</b> <b>Faculté des Sciences</b> Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		<b>THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I</b> <b>Faculty of Science</b> Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs
<b>LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS</b>		<b>LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF</b>

**ANNÉE ACADEMIQUE 2022/2023**

(Par Département et par Grade)

**DATE D'ACTUALISATION 31 MAI 2023**

**ADMINISTRATION**

**DOYEN :** TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maître de Conférences*

**VICE-DOYEN / DPSAA :** ATCHADE Alex de Théodore, *Professeur*

**VICE-DOYEN / DSSE :** NYEGUE Maximilienne Ascension, *Professeur*

**VICE-DOYEN / DRC :** ABOSSOLO ANGUE Monique, *Maître de Conférences*

**Chef Division Administrative et Financière :** NDOYE FOE Florentine Marie Chantal,  
*Maître de Conférences*

**Chef Division des Affaires Académiques, de la Recherche et de la Scolarité DAARS :**  
AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

<b>1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (43)</b>			
N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1.	BIGOGA DAIGA Jude	Professeur	En poste
2.	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3.	KANSCI Germain	Professeur	En poste
4.	MBACHAM FON Wilfred	Professeur	En poste
5.	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	<i>Chef de Département</i>
6.	NGUEFACK Julienne	Professeur	En poste
7.	NJAYOU Frédéric Nico	Professeur	En poste
8.	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
9.	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10.	ATOGHO Barbara MMA	Maître de Conférences	En poste
11.	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12.	BELINGA née NDOYE FOE F. M. C.	Maître de Conférences	<i>Chef DAF / FS</i>
13.	DJUIDJE NGOUNOUE Marceline	Maître de Conférences	En poste
14.	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Maître de Conférences	En poste
15.	EFFA ONOMO Pierre	Maître de Conférences	<i>VD/FS/Univ Ebwa</i>
16.	EWANE Cécile Annie	Maître de Conférences	En poste
17.	KOTUE TAPTUE Charles	Maître de Conférences	En poste
18.	LUNGA Paul KEILAH	Maître de Conférences	En poste
19.	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Maître de Conférences	En poste
20.	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	<i>Doyen FS / UDs</i>
21.	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
22.	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
23.	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste
24.	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
25.	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
26.	BEBOY EDJENGUELE Sara Nathalie	Chargé de Cours	En poste
27.	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste

28.	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
29.	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
30.	FOUPOUAPOUOGNIGNI Yacouba	Chargé de Cours	En poste
31.	KOUOH ELOMBO Ferdinand	Chargé de Cours	En poste
32.	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
33.	OWONA AYISSI Vincent Brice	Chargé de Cours	En poste
34.	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
35.	PECHANGOU NSANGO Sylvain	Chargé de Cours	En poste
36.	WILFRED ANGIE ABIA	Chargé de Cours	En poste
37.	BAKWO BASSOGOG Christian Bernard	Assistant	En Poste
38.	ELLA Fils Armand	Assistant	En Poste
39.	EYENGA Eliane Flore	Assistant	En Poste
40.	MADIESSE KEMGNE Eugenie Aimée	Assistant	En Poste
41.	MANJIA NJIKAM Jacqueline	Assistant	En Poste
42.	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistant	En poste
43.	WOGUIA Alice Louise	Assistant	En Poste

## 2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (52)

1.	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>DAARS/FS</i>
2.	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	<i>Chef de Département</i>
3.	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4.	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5.	DZEUFLET DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En Poste
6.	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>CD et Vice Doyen/FMSB/UYI</i>
7.	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
8.	KEKEUNOU Sévior	Professeur	En poste
9.	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
10.	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
11.	NOLA Moïse	Professeur	En poste
12.	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
13.	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service / Coord.Progr./MINSANTE</i>
14.	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	En poste
15.	ALENE Désirée Chantal	Maître de Conférences	<i>Vice Doyen/ Uté Ebwa</i>
16.	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
17.	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
18.	GOUNOUE KAMKUMO Raceline épouse FOTSING	Maître de Conférences	En poste
19.	JATSA BOUKENG Hermine épouse MEGAPTCHE	Maître de Conférences	En Poste
20.	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Maître de Conférences	En poste
21.	MAHOB Raymond Joseph	Maître de Conférences	En poste
22.	MBENOUN MASSE Paul Serge	Maître de Conférences	En poste
23.	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
24.	MOUNGANG Luciane Marlyse	Maître de Conférences	En poste
25.	NOAH EWOTI Olive Vivien	Maître de Conférences	En poste
26.	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
27.	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste

28.	NGUEMBOCK	Maître de Conférences	En poste
29.	TAMSA ARFAO Antoine	Maître de Conférences	En poste
30.	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste
31.	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
32.	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Chargé de Cours	En poste
33.	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
34.	FEUGANG YOUMSSI François	Chargé de Cours	En poste
35.	FOKAM Alvine Christelle Epse KENGNE	Chargé de Cours	En poste
36.	GONWOUO NONO Legrand	Chargé de Cours	En poste
37.	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
38.	KOGA MANG DOBARA	Chargé de Cours	En poste
39.	LEME BANOCK Lucie	Chargé de Cours	En poste
40.	MAPON NSANGOU Indou	Chargé de Cours	En poste
41.	METCHI DONFACK MIREILLE FLAURE EPSE GHOUMO	Chargé de Cours	En poste
42.	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
43.	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
44.	NJUA Clarisse YAFI	Chargée de Cours	<i>Chef Div. Uté Bamenda</i>
45.	NWANE Philippe Bienvenu	Chargé de Cours	En poste
46.	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
47.	YEDE	Chargé de Cours	En poste
48.	YOUNOUSSA LAME	Chargé de Cours	En poste
49.	AMBADA NDZENGUE GEORGIA ELNA	Assistante	En poste
50.	KODJOM WANCHE Jacguy Joyce	Assistante	En poste
51.	NDENGUE Jean De Matha	Assistant	En poste
52.	ZEMO GAMO Franklin	Assistant	En poste

### 3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (34)

1.	AMBANG Zachée	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
3.	MBOLO Marie	Professeur	En poste
4.	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
5.	YOUMBI Emmanuel	Professeur	En poste
6.	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste
7.	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8.	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9.	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Maître de Conférences	En poste
10.	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11.	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	<i>DAAC /UDla</i>
12.	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	En poste
13.	NGALLE Hermine BILLE	Maître de Conférences	En poste
14.	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
15.	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	<i>CT / MINRESI</i>
16.	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
17.	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
18.	ONANA JEAN MICHEL	Maître de Conférences	En poste

19.	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
20.	GONMADGE CHRISTELLE	Chargée de Cours	En poste
21.	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
22.	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
23.	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
24.	NSOM ZAMBO EPSE PIAL ANNIE CLAUDE	Chargé de Cours	<i>En détachement/UNESCO MALI</i>
25.	GODSWILL NTSOMBOH NTSEFONG	Chargé de Cours	En poste
26.	KABELONG BANAHO Louis-Paul- Roger	Chargé de Cours	En poste
27.	KONO Léon Dieudonné	Chargé de Cours	En poste
28.	LIBALAH Moses BAKONCK	Chargé de Cours	En poste
29.	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Chargé de Cours	En poste
30.	TAEDOUNG Evariste Hermann	Chargé de Cours	En poste
31.	TEMEGNE NONO Carine	Chargé de Cours	En poste
32.	MANGA NDJAGA JUDE	Assistant	En poste
33.	DIDA LONTSI Sylvere Landry	Assistant	En poste
34.	METSEBING Blondo-Pascal	Assistant	En poste

#### 4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (28)

1.	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Mission PR</i>
2.	NANSEU NJIKI Charles Péguy	Professeur	En poste
3.	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
4.	NENWA Justin	Professeur	En poste
5.	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>Doyen FS Univ.Ngaoundere</i>
6.	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancelor/UB</i>
7.	NJOYA Dayirou	Professeur	En poste
8.	ACAYANKA Elie	Maître de Conférences	En poste
9.	EMADAK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
10.	KAMGANG YOUNBI Georges	Maître de Conférences	En poste
11.	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
12.	KENNE DEDZO GUSTAVE	Maître de Conférences	En poste
13.	MBEY Jean Aime	Maître de Conférences	En poste
14.	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	<i>Chef de Département</i>
15.	NEBAH Née NDO SIRI Bridget NDOYE	Maître de Conférences	<i>Sénatrice/SENAT</i>
16.	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
17.	NYAMEN Linda Dyorisse	Maître de Conférences	En poste
18.	PABOUDAM GBAMBIE AWAWOU	Maître de Conférences	En poste
19.	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Maître de Conférences	En poste
20.	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Maître de Conférences	<i>Chef Service/ ENS Bertoua</i>
21.	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Maître de Conférences	En poste
22.	KOUOTOU DAOUDA	Maître de Conférences	En poste
23.	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
24.	NCHIMI NONO KATIA	Chargée de Cours	En poste
25.	NJANKWA NJABONG N. Eric	Chargé de Cours	En poste

26.	PATOUOSSA ISSOFA	Chargé de Cours	En poste
27.	SIEWE Jean Mermoz	Chargé de Cours	En Poste
28.	BOYOM TATCHEMO Franck W.	Assistant	En Poste

#### 5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (37)

1.	Alex de Théodore ATCHADE	Professeur	<i>Vice-Doyen / DPSAA</i>
2.	DONGO Etienne	Professeur	<i>Vice-Doyen/FSE/UYI</i>
3.	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	<i>Chef de Département UDS</i>
4.	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP/ Chef de Département</i>
5.	WANDJI Jean	Professeur	En poste
6.	MBAZOA née DJAMA Céline	Professeur	En poste
7.	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste
8.	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
9.	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
10.	KAMTO Eutrophe Le Doux	Maître de Conférences	En poste
11.	KENMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
12.	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13.	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
14.	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
15.	MVOT AKAK CARINE	Maître de Conférences	En poste
16.	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	<i>Chef de Cellule MINRESI</i>
17.	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	<i>C.E.A/ MINESUP</i>
18.	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	<i>DAAC/Uté Bertoua</i>
19.	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
20.	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
21.	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste
22.	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
23.	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
24.	ZONDEGOUNBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste
25.	MESSI Angélique Nicolas	Chargé de Cours	En poste
26.	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
27.	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
28.	NONO NONO Éric Carly	Chargé de Cours	En poste
29.	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
30.	OUETE NANTCHOUANG Judith Laure	Chargée de Cours	En poste
31.	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
32.	TCHAMGOUE Joseph	Chargé de Cours	En poste
33.	TSAFFACK Maurice	Chargé de Cours	En poste
34.	TSAMO TONTSA Armelle	Chargé de Cours	En poste
35.	TSEMEUGNE Joseph	Chargé de Cours	En poste
36.	MUNVERA MFIFEN Aristide	Assistant	En poste
37.	NDOGO ETEME Olivier	Assistant	En poste

#### 6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (22)

1.	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef de Division MINESUP</i>
----	--------------------	------------	---------------------------------

2.	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Inspecteur Général/ MINESUP</i>
3.	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
4.	TSOPZE Norbert	Maître de Conférences	En poste
5.	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	<i>Chef de Cellule MINFOPRA</i>
6.	AMINOU HALIDOU	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
7.	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
8.	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Chargé de Cours	En poste
9.	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10.	HAMZA Adamou	Chargé de Cours	En poste
11.	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Chargé de Cours	En poste
12.	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
13.	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
14.	MESSI NGUELE Thomas	Chargé de Cours	En poste
15.	MONTHÉ DJIADEU Valéry M.	Chargé de Cours	En poste
16.	NZEKON NZEKO'O ARMEL JACQUES	Chargé de Cours	En poste
17.	OLLE OLLE Daniel Claude Georges Delort	Chargé de Cours	<i>Sous-Directeur ENSET Ebolowa</i>
18.	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
19.	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
20.	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
21.	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	En poste
22.	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

#### **7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (33)**

1.	AYISSI Raoult Domingo	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	KIANPI Maurice	Maître de Conférences	En poste
3.	MBANG Joseph	Maître de Conférences	En poste
4.	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
5.	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Maître de Conférences	En poste
6.	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>Chef Service des Programmes &amp; Diplômes/FS/UYI</i>
7.	TAKAM SOH Patrice	Maître de Conférences	En poste
8.	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	<i>Directeur/AIMS Rwanda</i>
9.	TCHOUNDJA Edgar Landry	Maître de Conférences	En poste
10.	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINEPAT</i>
11.	BOGSO ANTOINE Marie	Chargé de Cours	En poste
12.	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
13.	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
14.	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
15.	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
16.	LOUMNGAM KAMGA Victor	Chargé de Cours	En poste
17.	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
18.	MBATAKOU Salomon Joseph	Chargé de Cours	En poste

19.	MENGUE MENGUE David Joël	Chargé de Cours	<i>Chef Dpt /ENS Université d'Ebolowa</i>
20.	MBIAKOP Hilaire George	Chargé de Cours	En poste
21.	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
22.	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
23.	OGADOA AMASSAYOGA	Chargée de Cours	En poste
24.	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	<i>En stage</i>
25.	TCHEUTIA Daniel Duviol	Chargé de Cours	En poste
26.	TETSADJIO TCHILEPECK M. Eric.	Chargé de Cours	En poste
27.	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
28.	FOKAM Jean Marcel	Assistant	En poste
29.	GUIDZAVAI KOUCHERE Albert	Assistant	En poste
30.	MANN MANYOMBE Martin Luther	Assistant	En poste
31.	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
32.	NYOUMBI DLEUNA Christelle	Assistant	En poste
33.	TENKEU JEUFACK Yannick Léa	Assistant	En poste

#### **8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (24)**

1.	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
3.	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	En poste
4.	BOUGNOM Blaise Pascal	Maître de Conférences	En poste
5.	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
6.	KOUITCHEU MABEKU Epse KOUAM Laure Brigitte	Maître de Conférences	En poste
7.	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
8.	NJIKI BIKOÏ Jacky	Maître de Conférences	En poste
9.	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste
10.	ESSONO Damien Marie	Chargé de Cours	En poste
11.	LAMYE Glory MOH	Chargé de Cours	En poste
12.	MEYIN A EBONG Solange	Chargé de Cours	En poste
13.	MONI NDEDI Esther Del Florence	Chargé de Cours	En poste
14.	NKOUDOU ZE Nardis	Chargé de Cours	En poste
15.	TAMATCHO KWEYANG Blandine Pulchérie	Chargé de Cours	En poste
16.	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	<i>Chef de Service de la Scolarité</i>
17.	TOBOLBAÏ Richard	Chargé de Cours	En poste
18.	NKOUÉ TONG Abraham	Assistant	En poste
19.	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistant	En poste
20.	EZO'O MENGO Fabrice Télésfor	Assistant	En poste
21.	EHETH Jean Samuel	Assistant	En poste
22.	MAYI Marie Paule Audrey	Assistant	En poste

23.	NGOUENAM Romial Joël	Assistant	En poste
24.	NJAPNDOUNKE Bilkissou	Assistant	En poste

### 9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (43)

1.	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2.	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Professeur	En poste
3.	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Vice-Recteur. Uté Ngaoundéré</i>
4.	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
5.	HONA Jacques	Professeur	En poste
6.	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
7.	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	En poste
8.	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	<i>Chef de Département</i>
9.	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste
10.	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
11.	SAIDOU	Professeur	<i>Chef de centre/IRGM/MINRESI</i>
12.	TABOD Charles TABOD	Professeur	<i>Doyen FSUniv/Bda</i>
13.	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
14.	WOAFO Paul	Professeur	En poste
15.	ZEKENG Serge Sylvain	Professeur	En poste
16.	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	<i>DG/HYDRO Mekin</i>
17.	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
18.	ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA	Maître de Conférences	En poste
19.	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
20.	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
21.	MBINACK Clément	Maître de Conférences	En poste
22.	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Maître de Conférences	En poste
23.	MEL'I Joelle Larissa	Maître de Conférences	En poste
24.	MVOGO ALAIN	Maître de Conférences	En poste
25.	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
26.	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
27.	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
28.	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
29.	WAKATA née BEYA Annie Sylvie	Maître de Conférences	<i>Directeur/ENS/UYI</i>
30.	WOULACHE Rosalie Laure	Maître de Conférence	<i>En stage depuis février 2023</i>
31.	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
32.	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Chargé de Cours	En poste
33.	CHAMANI Roméo	Chargé de Cours	En poste
34.	DJIOTANG TCHOTCHOU Lucie Angennes	Chargée de Cours	En poste
35.	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
36.	FOUEJIO David	Chargé de Cours	<i>Chef Cell. MINADER</i>
37.	KAMENI NEMATCHOUA Modeste	Chargé de Cours	En poste
38.	LAMARA Maurice	Chargé de Cours	En poste

39.	OTTOU ABE Martin Thierry	Chargé de Cours	Directeur Unité de production des réactifs/IMPM
40.	TEYOU NGOUPO Ariel	Chargé de Cours	En poste
41.	WANDJI NYAMSI William	Chargé de Cours	En poste
42.	NGA ONGODO Dieudonné	Assistant	En poste
43.	SOUFFO TAGUEU Merimé	Assistant	En poste

#### 10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (42)

1.	BITOM Dieudonné-Lucien	Professeur	<i>Doyen / FASA /UDs</i>
2.	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
3.	NDJIGUI Paul-Désiré	Professeur	<i>Chef de Département</i>
4.	NGOS III Simon	Professeur	En poste
5.	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
6.	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
7.	ONANA Vincent Laurent	Professeur	<i>Chef de Département/Uté. Eb.</i>
8.	YENE ATANGANA Joseph Q.	Professeur	<i>Chef Div. /MINTP</i>
9.	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
10.	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	En poste
11.	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	<i>Chef Div./Uté Ebolowa</i>
12.	Elisé SABABA	Maitre de Conférences	En poste
13.	FUH Calistus Gentry	Maître de Conférences	<i>Sec. d'Etat /MINMIDT</i>
14.	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
15.	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	<i>Chef de Div. /Uté Bertoua</i>
16.	MBIDA YEM	Maitre de Conférences	En poste
17.	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/MINIMDT</i>
18.	NGO BIDJECK Louise Marie	Maître de Conférences	En poste
19.	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	<i>CEA/MINRESI</i>
20.	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
21.	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
22.	TCHAKOUNTE Jacqueline épouse NUMBEM	Maître de Conférences	<i>Chef. Cell /MINRESI</i>
23.	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
24.	TEMGA Jean Pierre	Maître de Conférences	En poste
25.	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>
26.	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
27.	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
28.	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
29.	EYONG John TAKEM	Chargé de Cours	En poste
30.	MAMDEM TAMTO Lionelle Estelle, épouse BITOM	Chargée de Cours	En poste
31.	MBESSE Cécile Olive	Chargée de Cours	En poste
32.	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33.	MINYEM Dieudonné	Chargé de Cours	<i>Chef Serv./Uté Maroua</i>

34.	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35.	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
36.	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargée de Cours	En poste
37.	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
38.	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
39.	FEUMBA Roger	Chargé de Cours	En poste
40.	MBANGA NYOBE Jules	Chargé de Cours	En poste
41.	KOAH NA LEBOGO Serge Parfait	Assistant	En poste
42.	NGO'O ZE ARNAUD	Assistant	En poste
43.	TENE DJOUKAM Joëlle Flore, épouse KOUANKAP NONO	Assistante	En poste
44.	KOAH NA LEBOGO Serge Parfait	Assistant	En poste
45.	NGO'O ZE ARNAUD	Assistant	En poste
46.	TENE DJOUKAM Joëlle Flore, épouse KOUANKAP NONO	Assistante	En poste
47.	KOAH NA LEBOGO Serge Parfait	Assistant	En poste
48.	NGO'O ZE ARNAUD	Assistant	En poste
49.	TENE DJOUKAM Joëlle Flore, épouse KOUANKAP NONO	Assistante	En poste

### Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	8 (01)	15 (11)	13 (03)	7 (05)	<b>43 (20)</b>
BPA	14 (01)	16 (09)	18 (04)	4 (02)	<b>52 (16)</b>
BPV	6 (01)	12 (02)	13 (07)	3 (00)	<b>34 (10)</b>
CI	7 (01)	15 (04)	5 (01)	1 (00)	<b>28 (06)</b>
CO	6 (01)	18 (04)	11 (04)	2 (00)	<b>37 (09)</b>
IN	2 (00)	2 (00)	14 (01)	4 (00)	<b>22 (01)</b>
MAT	1 (00)	8 (00)	17 (01)	7 (02)	<b>33 (03)</b>
MIB	2 (01)	7 (03)	8 (04)	7 (02)	<b>24 (10)</b>
PHY	15 (01)	15 (04)	11 (01)	2 (00)	<b>43 (06)</b>
ST	8 (00)	17 (03)	15 (04)	3 (01)	<b>43 (08)</b>
<b>Total</b>	<b>69 (07)</b>	<b>125 (40)</b>	<b>125 (30)</b>	<b>40 (12)</b>	<b>359 (89)</b>

Soit un total de

**359 (89)** dont :

- Professeurs **69 (07)**
- Maîtres de Conférences **125 (40)**
- Chargés de Cours **125 (30)**
- Assistants **40 (12)**

( ) = Nombre de Femmes

**89**

# DEDICACE

*Je dédie ce travail à mes parents : Monsieur **MOUNCHILI Idrissou** et Madame **NTAPNSIERE Awawou**.*

*Maman, Papa, vous m'avez construit patiemment pendant des années. Jours après jours, vous m'avez soutenu quand le besoin s'en faisait sentir et conseillé quand je doutais. Votre complémentarité infailible a été l'un des piliers de ma réussite. Merci de m'avoir transmis toutes les valeurs qui font de moi celui que je suis. Ma réussite est aussi la vôtre, je ne vous dirai jamais assez merci !!*

# REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse s'est déroulé dans le Laboratoire de Physiologie Animale de l'Université de Yaoundé I. Il n'aurait pas pu aboutir sans le soutien de plusieurs personnes à qui je voudrais exprimer mes remerciements.

- Je tiens à remercier le Professeur **NJAMEN Dieudonné** (Professeur titulaire du Département de Biologie et Physiologie Animales de l'Université de Yaoundé I, Cameroun) pour m'avoir accueilli dans son unité de recherche et de diriger de bout en bout ce travail. Je vous remercie affectueusement pour votre disponibilité, votre dévouement, vos nombreux conseils, votre rigueur scientifique. Vous êtes un modèle de réussite sociale pour moi ;
- Je remercie le Professeur **ZINGUÉ Stéphane** (Maître de Conférences à la faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales de l'Université de Yaoundé I, Cameroun) qui m'a proposé ce sujet et en a assuré l'encadrement. Vous avez toujours été là de la conception jusqu'à la finalisation de ce travail, nonobstant vos occupations. Vos conseils, votre rigueur scientifique, votre loyauté et votre promptitude m'ont été très précieux dans la réalisation de ce travail. Trouvez en ces mots, l'expression de ma sincère reconnaissance ;
- Je remercie le Docteur **ATEBA SYLVAIN Benjamin** (Chargé de Cours au Département de Biologie des Organismes Animaux de l'Université de Douala, Cameroun) pour avoir encadré une partie de ce travail, pour sa disponibilité et ses conseils avisés. Merci pour votre présence réconfortante, et pour votre rigueur scientifique transmise ;
- Je remercie particulièrement le Professeur **DJIOGUE Séfirin** (Maître de Conférences au Département de Biologie et Physiologie Animales de l'Université de Yaoundé I, Cameroun) pour l'aide multiforme qu'il m'a apporté durant ce travail ;
- Mes remerciements vont ensuite au Professeur **MVONDO MARIE Alfrede** (Maître de Conférences au Département de Biologie Animale de l'Université de Dschang, Cameroun), pour ses conseils et son assistance multiforme ;
- Mes sincères remerciements aux Docteurs, **TCHOUPANG NANA Edwige**, **AWOUNFACK CHARLINE Florence**, **SILIHÉ KAMGA Kévine**, **MAPTOUOM FOTSO Christiane**, **ZEMO GAMO Franklin**, **SIMO RUDIG Valdès**, **SIPPING KEMEGNE Marius**, **DJIKEM TADAH RUDIG Nikanor** et **NANBO GUEYO Téléspore**, pour leurs assistances et apports multiples durant la période de manipulation. Vous m'avez fait partager votre enthousiasme et expérience et n'avez ménagé aucun effort

pour m'intégrer au sein de cette grandissime famille. Je vous suis parfaitement reconnaissant ;

- Je remercie tous les enseignants du Département de Biologie et Physiologie Animales de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I (Cameroun), pour les enseignements reçus tout au long de mon cursus académique ;
- Mes remerciements vont ensuite à l'endroit des membres de l'équipe de recherche du Professeur NJAMEN Dieudonné. Il s'agit de Mmes **BAKAM YENGWA Berlise**, **YONKEU TATCHOU Floriane Gaëlle**, **MOTOUM TEDJO Florette**, **TOUOMO SANDOCK Aude Jaëlle**, **NDJENGUE MINDANG Elisabeth** et Messieurs, **GUEMNANG NGITEDEM Stève**, **BIKOI BIKOI René James**, , **TCHATCHOU Jules** et **DJOUSI NJIMFO Sosthène** pour leurs assistances et aides multiformes lors des différentes manipulations ;
- Ma profonde gratitude va à l'endroit du Professeur **PIEME Constant Anatole** (Maître de Conférences au Département de Biochimie de la Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales de l'Université de Yaoundé I, Cameroun), pour son assistance matériel et technique dans la réalisation des dosages biochimiques sur les paramètres du stress oxydatifs ;
- Merci à Monsieur **TAKALA Jean Pierre** (Technicien au Département d'Anatomie et Pathologie de la Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales de l'Université de Yaoundé I, Cameroun), pour son aide dans la réalisation de la partie histologique de ce travail ;
- Un merci particulier à Monsieur **PANSSIE Soulemanou** (Ingénieur en Chirurgie au Centre des Urgences de Yaoundé), pour l'aide apporté dans l'induction des fractures chez les animaux ;
- Je remercie Monsieur **NANA Victor** (Botaniste Consultant auprès de l'Herbier National du Cameroun), pour son expertise lors de la récolte et de l'authentification de notre matériel végétal ;
- Merci à mes sœurs : Mesdames **MANDOU MOUCHILI Brikissou**, **NGAMOUN MOUCHILI Kazinetou** ; Mesdemoiselles **MEFIRE MOUCHILI Saïda**, **KOUTOUOP MOUCHILI Nouriatou** ; mes frères : Messieurs **ADAMOU Idrissou**, **MEFIRE PEMPÈME Daouda**, **MFOMTAPVOUI Ousmane** et **MEFIRE NKOUANDOU Abdel Mounir** pour leurs aides multiformes ;
- Je remercie tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la concrétisation de ce travail, qu'ils trouvent dans ces lignes l'expression de ma sincère reconnaissance.

# SOMMAIRE

<b>LISTE PROTOCOLAIRE.....</b>	<b>i</b>
<b>DEDICACE.....</b>	<b>xi</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>xii</b>
<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>xiv</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>xviii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>xxi</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>xxiii</b>
<b>RESUME.....</b>	<b>xxiv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xxvi</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE.....</b>	<b>5</b>
<b>I.1- Les œstrogènes.....</b>	<b>6</b>
I.1.1- Définition et sources.....	6
I.1.2- Biosynthèse et régulation.....	6
I.1.3- Les récepteurs aux œstrogènes.....	7
I.1.4- Mécanismes d'action des récepteurs aux œstrogènes .....	8
I.1.5- Actions physiologiques des œstrogènes.....	10
<b>I.2-Tissu osseux.....</b>	<b>13</b>
I.2.1- Rôle.....	13
I.2.2- Organisation architecturale.....	13
I.2.3- Composition du tissu osseux.....	15
I.2.4- Le remodelage osseux.....	17
<b>I.3- Ménopause et problème d'ostéoporose.....</b>	<b>19</b>
I.3.1- Définition et épidémiologie.....	19
I.3.2- Ménopause comme cause d'ostéoporose.....	20
<b>I.4- Définition et types d'ostéoporose.....</b>	<b>20</b>
I.4.1- Définition.....	20
I.4.2- Types d'ostéoporoses.....	21
I.4.3- Ostéoporose : problème de santé publique.....	22
I.4.4- Impact des fractures ostéoporotiques.....	23
I.4.5- Facteurs de risque d'ostéoporose .....	23
I.4.6- Méthodes de détection de l'ostéoporose.....	25

I.4.7- Les complications de l'ostéoporose : les fractures.....	26
I.4.8- Ostéoporose et stress oxydant .....	27
I.4.9- Prise en charge de l'ostéoporose postménopausique.....	29
I.4.10- Phytothérapie et ostéoporose.....	31
<b>I.5- La plante : <i>Lannea acida</i> .....</b>	<b>32</b>
I.5.1- Classification et synonymes.....	32
I.5.2- Répartition géographique et description.....	32
I.5.3- Utilisation traditionnelle .....	34
I.5.4- Travaux pharmacologiques antérieurs .....	34
I.5.5- Investigations phytochimiques.....	35
<b>CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>36</b>
<b>II.1-Matériel.....</b>	<b>37</b>
II.1.1- Matériel végétal.....	37
II.1.2- Animaux expérimentaux.....	37
II.1.3- Lignées cellulaires.....	37
II.1.4- Substances pharmacologiques.....	37
<b>II.2- Méthodes .....</b>	<b>38</b>
II.2.1- Extraction de la plante.....	38
II.2.2- Préparation des solutions.....	38
II.2.3- Evaluation de l'effet œstrogénique <i>in vivo</i> de l'extrait éthanolique de <i>L.acida</i> chez la rate.....	40
II.2.4- Evaluation des effets préventifs de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur un modèle d'ostéoporose induite par l'ovariectomie chez la rate.....	41
II.2.5- Evaluation des effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur la cicatrisation de la fracture du fémur chez la rate.....	43
II.2.6- Evaluation <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> des effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur les récepteurs aux oestrogènes.....	45
II.2.7- Caractérisation phytochimique de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> .....	49
II.2.8 - Evaluation de la toxicité orale aiguë de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> .....	50
II.2.9- Frottis vaginal.....	52
II.2.10- Ovariectomie.....	52
II.2.11- Prélèvement du sang .....	52
II.2.12- Prélèvement des organes.....	53
II.2.13- Techniques histologiques.....	53

II.2.14- Analyse microscopique et interprétation des résultats.....	55
II.2.15- Protocoles des dosages .....	56
II.2.16- Analyse statistique.....	67
<b>CHAPITRE III : RESULTATS.....</b>	<b>68</b>
<b>III.1- Effets œstrogéniques <i>in vivo</i> de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> chez la rate ovariectomisée.....</b>	<b>69</b>
III.1.1- Effets sur l'utérus.....	69
III.1.2- Effets sur le vagin.....	71
III.1.3- Effets sur la glande mammaire.....	74
<b>III.2- Effets préventifs de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur un modèle d'ostéoporose induite par ovariectomie chez la rate Wistar.....</b>	<b>75</b>
III.2.1- Effets sur l'utérus.....	75
III.2. 2- Effets sur le vagin .....	77
III.2.3- Effets sur la masse relative et la densité minérale du fémur et du Tibia.....	78
III.2.4- Effets sur quelques biomarqueurs du métabolisme osseux.....	80
III.2.5- Effets sur les paramètres hématologiques.....	82
III.2.6- Effets sur la microarchitecture des os.....	84
III.2.7- Conséquences de l'ostéoporose induite.....	86
<b>III.3- Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur la cicatrisation de la fracture du fémur induite chez la rate Wistar .....</b>	<b>88</b>
III.3.1- Effets sur la survie des animaux.....	88
III.3.2- Effets sur quelques cibles primaires des œstrogènes.....	90
III.3.3- Effets sur la masse relative du fémur (frais et sec) et la densité minérale du fémur.....	94
III.3.4- Effets sur quelques paramètres du métabolisme osseux.....	95
III.3.5- Effets sur quelques paramètres du stress oxydatif .....	99
III.3.6- Effets sur les paramètres hématologiques.....	101
III.3.7- Effets sur l'histomorphologie du fémur et l'épaisseur de l'os trabéculaire du fémur...	104
III.3.8- Effets sur la radiographie du fémur droit.....	106
<b>III.4- Effets <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur les récepteurs aux œstrogènes .....</b>	<b>107</b>
III.4.1- Viabilité des cellules MCF-7 et HEK293T en présence de l'extrait de <i>L. acida</i> .....	107
III.4.2- Effets <i>in vitro</i> œstrogéniques l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur les cellules MCF-7 (" <i>E-screen assay</i> ") .....	108
III.4.3- Effets <i>in vitro</i> de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur les récepteurs alpha (ER $\alpha$ ) et	

béta (ER $\beta$ ) aux œstrogènes .....	108
III.4.4- Effets <i>in vivo</i> de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur les cibles primaires des œstrogènes en présence du fulvestrant.....	110
<b>III.5-Phytochimie et activité antiradicalaire de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> .....</b>	<b>115</b>
<b>III.6- Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> en essai aiguë.....</b>	<b>116</b>
III.6.1- Sur l'aspect, le comportement et la mortalité des animaux.....	116
III.6.2- Sur l'évolution pondérale des animaux.....	116
III.6.3- Sur la masse relative des organes.....	117
III.6.4- Sur l'histologie des organes.....	118
<b>CHAPITRE IV : DISCUSSION.....</b>	<b>119</b>
<b>CONCLUSION ET PERPECTIVES.....</b>	<b>137</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>139</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>166</b>
<b>Liste des publications .....</b>	<b>174</b>

# LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Structures chimiques des œstrogènes.....	6
<b>Figure 2</b> : Biosynthèse des œstrogènes.....	7
<b>Figure 3</b> : Organisation structurale et fonctionnelle des isotypes $\alpha$ et $\beta$ des récepteurs aux œstrogènes humain.....	8
<b>Figure 4</b> : Mécanisme d'activation des récepteurs aux œstrogènes.....	9
<b>Figure 5</b> : Structure d'un os long.....	14
<b>Figure 6</b> : Principales cellules osseuses.....	16
<b>Figure 7</b> : Cycle du remodelage osseux.....	18
<b>Figure 8</b> : Conséquences statiques des fractures vertébrales.....	27
<b>Figure 9</b> : Photos de <i>L. acida</i> .....	33
<b>Figure 10</b> : Protocole d'extraction à l'éthanol des écorces du tronc de <i>L. acida</i> .....	38
<b>Figure 11</b> : Protocole expérimental d'évaluation des propriétés œstrogéniques de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> .....	41
<b>Figure 12</b> : Protocole expérimental d'évaluation des effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur un modèle d'ostéoporose post-ovariectomie chez la rate Wistar.....	42
<b>Figure 13</b> : Evaluation des effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur la cicatrisation de la fracture fémur chez la rate Wistar.....	44
<b>Figure 14</b> : Protocole d'évaluation des effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida in vivo</i> en présence d'un antagoniste (le fulvestrant).....	49
<b>Figure 15</b> : Protocole de la détermination de la composition minérale de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> .....	50
<b>Figure 16</b> : Protocole expérimental d'évaluation de la toxicité aiguë par voie orale de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> .....	51
<b>Figure 17</b> : Courbe d'étalonnage des protéines totales.....	57
<b>Figure 18</b> : Courbe d'étalonnage pour le dosage de la capacité antioxydante totale <i>in vivo</i> de <i>L. acida</i> .....	61
<b>Figure 19</b> : Courbe d'étalonnage du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> non décomposé par la catalase.....	62
<b>Figure 20</b> : Courbe d'étalonnage du dosage des polyphénols totaux.....	64
<b>Figure 21</b> : Courbe d'étalonnage du dosage des flavonoïdes totaux.....	65
<b>Figure 22</b> : Courbe d'étalonnage de détermination du potentiel antioxydant <i>in vitro</i> .....	66

<b>Figure 23</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur la masse relative de l'utérus (A) et la taille de l'épithélium utérin (B).....	70
<b>Figure 24</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur la cytologie vaginale.....	72
<b>Figure 25</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur la taille de l'épithélium vaginal.....	73
<b>Figure 26</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur de la glande mammaire.....	76
<b>Figure 27</b> : Effets à l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur la masse relative de l'utérus (A) et sur la taille de l'épithélium utérin (B).....	76
<b>Figure 28</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur la taille de l'épithélium vaginal.....	78
<b>Figure 29</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur la masse relative du fémur [frais (A) et sec (C)], du tibia [frais (B) et sec (D)] et sur la densité minérale du fémur (E) et du Tibia (F).....	79
<b>Figure 30</b> : Effets préventifs de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur la microarchitecture du tibia, du fémur, de la mandibule et de la vertèbre lombaire numéro 3.....	85
<b>Figure 31</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur l'évolution pondérale .....	86
<b>Figure 32</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur les microarchitectures des organes de la détoxification .....	88
<b>Figure 33</b> : Courbe de KOPLAN Meir présentant la survie des rates après induction de la fracture du fémur.....	89
<b>Figure 34</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur les microphotographies de l'utérus .....	90
<b>Figure 35</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur la taille de l'épithélium utérin (A et B) et la masse relative de l'utérus (C et D) des rates OVX et normales, après une fracture du fémur suivie d'un traitement pendant 60 jours.....	91
<b>Figure 36</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur le vagin après induction de la fracture suivie d'un traitement pendant 60 jours .....	93
<b>Figure 37</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur la masse relative du fémur frais (A et B), du fémur sec (C et D) et de la densité du fémur (E et F). .....	94
<b>Figure 38</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur les taux du calcium sérique (A et B) et osseux (C et D) des rates normaux et OVX-fracturés.....	96
<b>Figure 39</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur le taux du phosphore inorganique sérique (A et B) et osseux (C et D) chez les rates normales et OVX-fracturées...	97
<b>Figure 40</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur l'activité de la phosphatase alcaline sérique (A et B) et osseuse (C et D) chez des rates normale et OVX-fracturés.....	98

<b>Figure 41</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur l'activités de la Catalase (A et B), du Glutathion peroxydase (C et D) et de la capacité antioxydante totale (FRAP).....	100
<b>Figure 42</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur l'histomorphologie du fémur (A) et l'épaisseur de l'os trabéculaire (B et C).....	105
<b>Figure 43</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur la radiographie du fémur droit dans un modèle de fracture induite chez la rate.....	106
<b>Figure 44</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur la viabilité des cellules MCF-7 (A) et HEK294T (B).....	107
<b>Figure 45</b> : Effets œstrogénique et antiœstrogénique <i>in vitro</i> de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur les cellules MCF-7.....	108
<b>Figure 46</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur la transactivation des récepteurs aux œstrogènes ER $\alpha$ (A) et ER $\beta$ (B) stablement transfectés sur les cellules HEK293T.....	109
<b>Figure 47</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>Lannea acida</i> sur l'utérus des rates ovariectomisées en présence d'un anti-œstrogène pure (fulvestrant).....	111
<b>Figure 48</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur la taille de l'épithélium vaginal en présence de l'anti-œstrogène pure (fulvestrant).....	113
<b>Figure 49</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur la glande mammaire en présence d'un anti-œstrogène pure (fulvestrant).....	114
<b>Figure 50</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur l'évolution pondérale des animaux en essai aigu.....	117
<b>Figure 51</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur la microarchitecture du foie, du rein, des poumons en essai aigu.....	118

# LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I</b> : Définition ostéodensitométrie de l'ostéoporose.....	20
<b>Tableau II</b> : Détermination de la courbe d'étalonnage utilisé pour le dosage des protéines totales .....	57
<b>Tableau III</b> : Protocole de détermination de l'activité de la phosphatase alcaline.....	58
<b>Tableau IV</b> : Protocole de dosage du calcium dans le sérum et le fémur.....	59
<b>Tableau V</b> : Protocole de dosage du phosphore inorganique .....	59
<b>Tableau VI</b> : Protocole d'établissement de la courbe d'étalonnage de la FRAP.....	60
<b>Tableau VII</b> : Protocole de détermination du potentiel antioxydant <i>in vivo</i> de <i>L. acida</i> .....	60
<b>Tableau VIII</b> : Protocole de détermination de la courbe d'étalonnage du dosage de la catalase.....	61
<b>Tableau IX</b> : Protocole du dosage de l'activité de la catalase.....	62
<b>Tableau X</b> : Protocole de détermination de l'activité de la glutathion peroxydase.....	63
<b>Tableau XI</b> : Protocole de détermination de la courbe d'étalonnage de la teneur en polyphénols del'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> .....	64
<b>Tableau XII</b> : Protocole de détermination de la courbe d'étalonnage de la teneur en flavonoïdes de l'extrait.....	67
<b>Tableau XIII</b> : Protocole de détermination de la courbe d'étalonnage du potentiel antioxydant <i>in vitro</i> .....	66
<b>Tableau XIV</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur quelques paramètres biochimiques de l'œstrogénicité dans l'utérus après trois jours de traitement.....	71
<b>Tableau XV</b> : Effets de trois jours de traitement à l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur le dénombrement des types cellulaires sur les frottis vaginaux.....	72
<b>Tableau XVI</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur quelques biomarqueurs du remodelage osseux après 12 semaines de traitement sur un modèle préventif d'ostéoporose post-ovariectomie chez la rate.....	82
<b>Tableau XVII</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur les paramètres hématologiques après 12 semaines de traitement sur un modèle d'ostéoporose post-ovariectomie chez la rate.....	82
<b>Tableau XVIII</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur la masse relative des organes après 12 semaines de traitement.....	87
<b>Tableau XIX</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur les paramètres hématologiques des rates OVX, fracturés.....	102

<b>Tableau XX</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur les paramètres hématologiques des rates SHAM, fracturés.....	103
<b>Tableau XXI</b> : Taux des composés phénoliques, capacité antioxydante et activité antioxydante <i>in vitro</i> de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> .....	115
<b>Tableau XXII</b> : Composition minérale de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> .....	116
<b>Tableau XXIII</b> : Comportement des animaux en essai aigu.....	116
<b>Tableau XXIV</b> : Effets de l'extrait éthanolique de <i>L. acida</i> sur la masse relative des organes .....	117

# LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ACTH:</b> "Adreno-Cortico-Tropin-Hormone "	<b>LDL:</b> " Low Density Lipoprotein "
<b>ALP:</b> Alkaline Phosphatase	<b>VLDL:</b> " Very Low-Density Lipoprotein "
<b>BMP:</b> " Bone Morphogenetic Protein "	<b>LH:</b> " Luteinizing Hormone "
<b>CAT:</b> Catalase	<b>LPL:</b> " Lipoprotéine Lipase "
<b>CSF:</b> "Colony Stimulating Factors "	<b>M-CSF:</b> " Macrophage-Colony Stimulating Factor "
<b>DMO:</b> Densité Minérale Osseuse	<b>MSRO :</b> Modulateur Sélectif des Récepteurs aux Œstrogènes
<b>E<sub>2</sub>V :</b> Œstradiol valérate	<b>OMS :</b> Organisation Mondiale de la Santé
<b>EGF:</b> " Epidermal Growth Factor "	<b>OPG :</b> Ostéoprotégérine
<b>ER:</b> " Estrogen Receptor "	<b>OVX :</b> Ovariectomisé
<b>ERE:</b> " Estrogen Receptor Element "	<b>Pi :</b> Phosphore Inorganique
<b>ERO :</b> Espèces Réactives de l'Oxygène	<b>PTH:</b> Parathormone
<b>FESF :</b> Fracture de l'Extrémité Supérieure du Fémur	<b>RANK:</b> " Receptor Activated of Nuclear Factor Kappa B "
<b>FSH:</b> " Folliculin Stimulating Hormone "	<b>RANKL:</b> "Receptor Activated of Nuclear Factor Kappa B Ligand "
<b>G-CSF:</b> "Granulocyte Colony Stimulating Factor"	<b>RL :</b> Radicaux Libres
<b>GM-CSF:</b> " Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor "	<b>SHBeG:</b> " Sex-Hormone Binding Globulin "
<b>GnRH:</b> " Gonadotropin Releasing Hormone "	<b>SOD:</b> Superoxyde Dismutase
<b>GPER:</b> " G-protein Estrogen receptor "	<b>TGF:</b> " Transforming Growth Factor "
<b>GPx :</b> Glutathion Péroxydase	<b>THS :</b> Traitement Hormonal Substitutif
<b>GSH :</b> Glutathion Réduit	<b>UMB :</b> Unité Multicellulaire de Base
<b>HDL:</b> " High Density Lipoprotein "	<b>VL3 :</b> Vertèbre Lombaire Numéro-3
<b>IGF:</b> " Insulin-like Growth Factor "	
<b>IL-6:</b> Interleukine-6	
<b>IOF:</b> " International Osteoporosis Foundation "	

# RESUME

Le déclin en œstrogènes est reconnu comme étant la cause principale des troubles physiologiques associés à la ménopause. Face aux limites de la médecine conventionnelle, les phytoœstrogènes, composés à activités œstrogéniques contenus dans les plantes, font l'objet de recherches intensives. *L. acida* A. Rich (Anacardiaceae) est une plante médicinale de la pharmacopée camerounaise, utilisée pour traiter de nombreuses pathologies telles que les dysménorrhées, l'infertilité, le rhumatisme et les troubles musculosquelettiques. L'objectif de ce travail était d'évaluer les effets œstrogéniques et anti-ostéoporotiques de l'extrait éthanolique des écorces du tronc de *L. acida*. Les animaux utilisés étaient des rates albinos de souche Wistar (8 - 12 semaines ;  $200 \pm 10$ g), qui ont été traités par gavage œsophagien. L'œstrogénicité de l'extrait éthanolique de *L. acida* a été évaluée *in vivo* par le test utéro-trophique de 3 jours et *in vitro* par la méthode "E-Screen" sur les cellules de l'adénocarcinome mammaire MCF-7. La détermination des paramètres physiques (la masse relative du fémur, du tibia et leur densité minérale) et biochimiques (la teneur en calcium, en phosphore inorganique et activité de la phosphatase alcaline sérique) du remodelage osseux, l'examen hématologique et l'analyse histopathologique des os (tibia, fémur, troisième vertèbre lombaire (VL-3) et mandibule) ont permis d'évaluer les effets préventifs de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur un modèle d'ostéoporose induite par l'ovariectomie pendant 84 jours. Les effets de *L. acida* ont également été évalués sur la cicatrisation de la fracture du fémur induite chez la rate normale et ovariectomisée, par mesure de la masse relative du fémur, de l'activité de la phosphatase alcaline sérique et osseuse, et la teneur en calcium et en phosphore inorganique. L'analyse histologique et radiographique du fémur, le dosage de certains paramètres du stress oxydant tels que l'activité de la catalase (CAT), de la glutathion peroxydase (GPx) et la capacité antioxydante totale (FRAP) ont également été effectuées. La capacité de l'extrait à activer les récepteurs aux œstrogènes  $\alpha$  et  $\beta$  a été évaluée *in vitro* sur la lignée cellulaire HEK293T. *In vivo* les rates ont été traitées à l'extrait de *L. acida* en présence d'un antagoniste (faslodex). Un screening phytochimique et une étude de la toxicité orale aiguë ont été réalisés. Les résultats obtenus à l'issue des tests œstrogéniques ont montré que l'extrait éthanolique de *L. acida* possède des effets œstrogéniques *in vivo* par augmentation ( $p < 0,05$  ; 50 et 200 mg/kg) de la masse relative de l'utérus et de la taille des épithélia utérin ( $p < 0,05$  ; 200 mg/kg) et vaginal ( $p < 0,001$ ). *In vitro*, *L. acida* a induit l'augmentation du nombre total des cellules MCF-7 à des concentrations de 10, 100 ( $p < 0,05$ ) et de 200  $\mu$ g/mL ( $p < 0,01$ ). *L. acida* a induit les effets préventifs sur le modèle d'ostéoporose, en prévenant la baisse ( $p < 0,05$  ; 200 mg/kg) de la

masse relative du fémur, du tibia ainsi que de leurs densités minérales. *L. acida* a également prévenu l'augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline sérique ( $p < 0,01$  ; 50 mg/kg) et la baisse du taux de calcium et du phosphore inorganique ( $p < 0,05$  ; 200 mg/kg). L'examen hématologique a montré une réduction significative ( $p < 0,01$ ) du taux de l'hémoglobine (50 mg/kg), du pourcentage de lymphocyte et granulocyte (200 mg/kg), et du pourcentage de l'hématocrite (50, 200 mg/kg). L'analyse histologique des os (fémur, tibia, VL-3 et mandibule) a montré que *L. acida* a protégé de la désorganisation de leurs microarchitectures. Au bout de 60 jours de traitement à l'extrait de *L. acida*, les résultats ont montré chez les animaux OVX-fracturés, une augmentation ( $p < 0,001$ ) des activités de la GPx et de la FRAP à toutes les doses testées (50,100 et 200 mg/kg) ainsi que de la catalase à la dose de 100 mg/kg. L'extrait a induit une augmentation de l'épaisseur de l'os trabéculaire aux doses de 50 ( $p < 0,05$ ),100 et de 200 mg/kg ( $p < 0,001$ ), protégé de la désorganisation de la microarchitecture du fémur et induit une cicatrisation de la fracture fémorale aux doses de 50, 100 et de 200mg/kg. Chez les animaux normaux-fracturés, *L. acida* a également prévenu la baisse ( $p < 0,001$ ) de l'activité de la GPx (100 et 200 mg/kg), de la FRAP (50,100 et 200 mg/kg) et de la catalase (100 mg/kg). Ces effets bénéfiques seraient dus aux phytoconstituants (polyphénols totaux ( $786,75 \pm 82,33$ ) et flavonoïdes ( $250,61 \pm 48,17$ )) contenus dans l'extrait. *L. acida* a significativement baissé ( $p < 0,001$ ) l'activité de la luciférase pour les deux sous types de récepteurs aux œstrogènes  $\alpha$  et  $\beta$  à des concentrations allant de 0,00001 à 0,1 $\mu$ g /mL. Aucun effet anti-oestrogénique n'a été observé *in vivo* sur l'utérus, le vagin et la glande mammaire après traitement à l'extrait de *L. acida* à la dose de 50 mg/kg en présence d'un antagoniste (faslodex). L'évaluation de la toxicité orale aiguë a montré que l'extrait de *L. acida* serait faiblement toxique. Sa DL<sub>50</sub> a été estimée supérieure à 2000 mg/kg PC. Les résultats obtenus montrent que cet extrait possède des effets œstrogénique et anti-ostéoporotique. Ces résultats apportent ainsi des bases scientifiques à l'utilisation de l'extrait éthanolique de *L. acida* pour l'amélioration de la santé des femmes au cours de la ménopause.

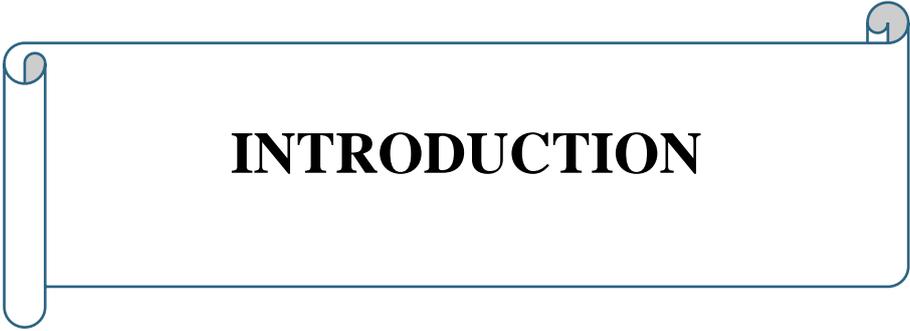
**Mots Clés :** *L. acida* ; Ménopause ; Œstrogénique ; Anti-ostéoporotique.

# ABSTRACT

Estrogen decline is recognized as the main cause of physiological complaints associated with menopause. Due to the limits of conventional medicine, phytoestrogens, plant-derived compounds with estrogenic activity, are the subject of intensive research. *L. acida* A. Rich (Anacardiaceae) is a medicinal plant in the Cameroon pharmacopoeia, used to treat many pathologies such as dysmenorrhea, infertility, rheumatism and musculo-skeletal troubles. The aim of this study was to evaluate the estrogenic and antiosteoporotic effects of the ethanol extract of *L. acida* A. The animals used were female albinos Wistar rats (8 - 12 weeks;  $200 \pm 10$  g), who were treated by esophageal gavage. The estrogenicity of the ethanol extract of *L. acida* was evaluated *in vivo* following the 3-days uterotrophic test and *in vitro* following the "E-Screen" method on the mammary adenocarcinoma cells MCF-7. The determination of the physical parameters (relative mass of femur, tibia and their mineral density) and biochemical parameters (calcium and inorganic phosphorus content and serum alkaline phosphatase activity) of bone remodeling. The hematological test and the histopathological analysis of the bone (tibia, femur, third lumbar vertebrae (VL-3) and mandible) have permitted to evaluate the protective effects of the ethanol extract of *L. acida* on the model of osteoporosis induced by ovariectomy for 84 days. The effects of the ethanol extract of *L. acida* were equally evaluated on the femur healing fracture model induced on normal and ovariectomized rat, by measuring bone mass, serum and bone alkaline phosphatase activity, calcium and inorganic phosphorus levels. The histological and radiographic analysis of femur, the determination of some oxidative stress parameters such as catalase (CAT), glutathione peroxidase activities (GPx) and total antioxidant capacity (FRAP) were equally assessed. The ability of the extracts to activate estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  were evaluated *in vitro* on the cells lines HEK 293T. *In vivo* rats were treated with *L. acida* extract in the presence of antagonist (faslodex). A phytochemical screening and study of acute oral toxicity were realized. The results obtained from the estrogenic test showed that the ethanolic extract of *L. acida* has estrogenic activities *in vivo* by the increase ( $p < 0,05$ ; 50 and 200 mg/kg BW) of relative uterine mass and the height of uterine ( $p < 0,05$ ; 200 mg/kg) and vaginal epithelia ( $p < 0,001$ ). *In vitro*, the ethanolic extract of *L. acida* induced significant increase of MCF-7 cells number at the concentration of 10, 100 ( $p < 0,05$ ) and 200  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,01$ ). *L. acida* have induced the protective effects on a model of osteoporosis by preventing the decrease ( $p < 0,05$ ; 200 mg/kg) of the relative mass of femur, tibia as well as their mineral density. *L. acida* has equally prevent the augmentation of serum alkaline phosphatase activity (50 mg/kg) and reduction of calcium and inorganic phosphorus rate ( $p <$

0,01; 200 mg/kg). The hematological analysis showed the significant decrease ( $p < 0,01$ ) of hemoglobin rate (50 mg/kg), the percentage of lymphocyte and granulocyte (200 mg/kg) and hematocrit percentage (50, 200 mg/kg). The histological analysis of the bones (tibia, femur, VL3, Mandible) has showed that *L. acida* has prevented disorganization of their microarchitecture. At the end of 60-days of treatment, the *L. acida* extract prevented ( $p < 0,001$ ) on the OVX-fractured animals the decrease of GPx, FRAP and catalase activities ( $p < 0,001$ ; 100 mg/kg BW). The extract has induced augmentation of trabecular bone thickness at the doses of 50 ( $p < 0,05$ ), 100 and of 200 mg/kg ( $p < 0,001$ ), protected against femur microarchitecture disorganization, and induced total femur healing at the doses of 50, 100 and 200mg/kg. On the normal-fractured animals, the extract has equally prevented decrease of GPx (100 and 200 mg/kg), FRAP (50, 100 and 200 mg/kg) and catalase (100 mg/kg) activities. These beneficial effects were due to phytoconstituents (totals polyphenols ( $786,75 \pm 82,33$ ) and flavonoids ( $250,61 \pm 48,17$ ) contains in the extract. *L. acida* has significantly decreased ( $p < 0,001$ ) the luciferase activity for the two subtypes of estrogens receptors  $\alpha$  and  $\beta$  at the concentrations ranging from 0,00001 to 0,1 $\mu$ g/mL. No anti-estrogenic effect was observed *in vivo* on uterine, vaginal and mammary gland after treatment with *L. acida* at the dose of 50 mg/kg in the present of antagonist (faslodex). The acute oral toxicity evaluation showed that the ethanol extract of *L. acida* would be slightly toxic. Its  $DL_{50}$  was estimated higher than 2000 mg/kg BW. These results obtained showed that this extract has estrogenic and antiosteoporotic effects. These results provide the scientific basis for the use of the ethanol extract of *L. acida* to improve women health during menopause.

**Key words:** *L. acida* ; Estrogenic; Menopause; Antiosteoporotic.



# **INTRODUCTION**

La ménopause qui survient en moyenne à 50 ans chez la femme est par définition l'arrêt des menstruations en réponse à l'épuisement du stock folliculaire ovarien (OMS, 2015). Cet épuisement met ainsi fin à la production d'hormones ovariennes parmi lesquelles les œstrogènes, qui jouent un rôle important dans la régulation de la croissance, le développement et le fonctionnement du tractus génital femelle, du système nerveux central, ainsi que dans l'homéostasie des systèmes cardiovasculaire et osseux (Agatonovic-Kustrin *et al.*, 2008). Les effets bénéfiques des œstrogènes disparaissent à la ménopause entraînant des troubles physiologiques à court, moyen et long terme. Les bouffées de chaleur (Freeman *et al.*, 2014), le dessèchement vaginal, l'atrophie des seins, l'incontinence urinaire et les syndromes dépressifs (Pinkerton *et al.*, 2009) constituent les désagréments survenant à court et à moyen termes. Les troubles du métabolisme lipidique et osseux, prédisposant aux maladies cardiovasculaires et aux fractures ostéoporotiques (Al-Anazi *et al.*, 2011) surviennent à long terme et constituent les causes de morbidité et de mortalité chez la femme ménopausée (Pisani *et al.*, 2016). Estimé à 467 millions en 1990, le nombre de femmes ménopausées dans le monde atteindra 1,2 milliard en 2030 (OMS, 1996). Au Cameroun, la population des femmes ménopausées constitue environ 27% de la population féminine (BUCREP, 2011).

L'ostéoporose est une maladie diffuse des os, caractérisée par une diminution de sa masse ou densité et une altération de la microarchitecture du tissu osseux conduisant à une augmentation de la fragilité osseuse et du risque de fracture (Migliorini *et al.*, 2021). Elle est considérée comme l'une des maladies majeures du 21<sup>e</sup> siècle qui touchait plus de 200 millions de personnes dans le monde en 2012 (Fondation Internationale d'Ostéoporose, 2012). Au-delà de sa fréquence, la morbidité liée à cette maladie est associée à l'une de ses conséquences la plus importante qu'est la fracture ostéoporotique (Baccaro *et al.*, 2015). Elle apparaît généralement au niveau de la hanche, des vertèbres et du poignet et constitue la cause majeure des douleurs aiguës ou chroniques, des pertes de mobilité et de mortalité chez les personnes âgées (Sánchez-Riera et Wilson, 2017). D'après Tella et Gallagher, (2014), le nombre de personnes âgées de 50 ans et plus ayant un haut risque de fracture ostéoporotique était estimé à 158 millions dans le monde en 2010 et ce nombre devrait doubler d'ici 2040. En 2013, on estimait à 10 millions le nombre mondial annuel de fractures ostéoporotiques, dont les deux-tiers chez les femmes (Hernlund *et al.*, 2013 ; Svedbom *et al.*, 2013). Selon la Fondation Internationale d'Ostéoporose (2011), l'incidence des fractures ostéoporotiques et le coût de traitement sont en pleine augmentation alors que les stratégies thérapeutiques demeurent encore marginales. Des conséquences médicales et économiques énormes sont associées aux fractures ostéoporotiques. Williamson *et al.* (2017) estimaient à 43669 USD le coût global des soins de

santé et des soins sociaux par patient au cours de la première année suivant une fracture de la hanche aux Etats-Unis.

En Afrique, les travaux de Baklouti *et al.*, (2022) ont montré que, sur 144 personnes souffrant d'ostéoporose en Tunisie et âgées de 68 ans en moyenne, 15,3% entre elles souffraient d'une fracture pathologique, et parmi ces patients, 18 étaient des femmes (81,8%). Les travaux de Zebaze et Seeman (2003) ont montré que sur 192 femmes camerounaises victimes de fracture et âgées au moins 35 ans, 13,5% entre elles souffraient des fractures de la hanche, 4,7% des fractures de poignets et 81,8% d'autres types de fractures incluant les fractures du tibia et du fémur. Ngandeu et Amvene, (2008) ont montré que sur 218 femmes ménopausées de la ville de Yaoundé, 17,9% des femmes âgées de 50 ans souffraient d'ostéoporose et à plus de 70 ans cette prévalence augmente jusqu'à 55,8%. La recrudescence de l'ostéoporose dans le monde a conduit à une médicalisation croissante.

Le traitement hormonal substitutif (THS), l'utilisation des modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes (MSRO) et des bisphosphonates sont des stratégies thérapeutiques classiques recommandées (Sjögren *et al.*, 2016 ; Anastasilakis *et al.*, 2018). Le THS est efficace pour la prévention de l'ostéopénie et la réduction du risque de fractures vertébrales et périphériques (Liang *et al.*, 2022). Cependant, son utilisation à long terme augmente les risques de développer un cancer du sein, des thromboses et des accidents cardiovasculaires (Levin *et al.*, 2018). Les MSRO ont par la suite été mis sur pied et le plus connu sur le marché est le tamoxifène. Bien qu'étant efficace dans le traitement de l'ostéoporose (Thomson *et al.*, 2017), il est responsable des maladies thromboemboliques (Migliorini *et al.*, 2021). Les limites de ces traitements, ont poussé la communauté scientifique à mettre sur pieds d'autres médicaments plus efficaces à l'instar des antirésorptifs, qui sont des molécules empêchant la résorption osseuse. Parmi les antirésorptifs, les bisphosphonates sont les plus utilisés en raison de leurs implications dans la diminution du nombre d'ostéoclastes (cellules ostéorésorbantes) et la limitation des risques des fractures ostéoporotiques (fémur et vertèbres). Cependant, la prescription de certains bisphosphonates est à l'origine de l'ostéonécrose et de l'ostéosarcome (Luhmann *et al.*, 2012). Au regard des limites des traitements conventionnels, la communauté scientifique s'est tournée vers les phytoœstrogènes, qui sont des molécules présentant des similarités structurales avec les œstrogènes et capables d'induire des effets œstrogéniques ou antiœstrogéniques. Des études ont montré leur efficacité dans la prévention et le traitement de l'ostéoporose postménopausique, des maladies cardiovasculaires et de certaines troubles physiologiques liées à la ménopause (Mathey *et al.*, 2007). Il y'a donc un intérêt croissant vis-

à-vis des alternatives plus efficaces et moins nocives. La phytothérapie semble offrir un potentiel non négligeable dans le cadre de la prévention et de la prise en charge de l'ostéoporose ainsi que des fractures ostéoporotiques. Dans les pays en développement environ 80 % de la population a recours à la phytothérapie pour ses besoins de santé primaire (WHO, 2008). Cet engouement manifeste pour la phytothérapie est dû à l'accessibilité, la disponibilité et aux croyances traditionnelles, mais aussi aux effets secondaires minimes des régimes phytothérapeutiques.

*Lannea acida* A. Rich (Anacardiaceae) est une plante répandue en Afrique (Arbonier, 2009) et utilisée pour soigner de nombreuses maladies (Asase *et al.*, 2005 ; Arbonier, 2009). Au Cameroun, la population de Moutourwa à l'Extrême-Nord macère les écorces du tronc de *L. acida* dans un vin local pour traiter l'aménorrhée, l'infertilité et les troubles musculosquelettiques (rhumatisme, douleurs osseuses chez les femmes âgées). Sur la base de ses usages contre l'aménorrhée, l'infertilité et les troubles musculosquelettiques, cette plante aurait des propriétés œstrogéniques et ainsi, préviendrait l'ostéoporose postménopausique et ses complications.

Fort de cette hypothèse, nous nous sommes proposés d'évaluer *in vitro* et *in vivo*, les effets œstrogéniques et antiostéoporotiques de l'extrait éthanolique des écorces du tronc de *Lannea acida* A. Rich. (Anacardiaceae)

Il s'agissait précisément de déterminer :

- 1- ses effets œstrogéniques *in vitro* sur la lignée cellulaire MCF-7 et *in vivo* sur des rates ovariectomisées ;
- 2- ses effets protecteurs sur un modèle d'ostéoporose induite par l'ovariectomie;
- 3- ses effets sur la cicatrisation de la fracture du fémur induite chez les rates normales et ovariectomisées ;
- 4- ses mécanismes d'actions cellulaires *in vivo* en présence du faslodex et *in vitro* sur la lignée cellulaire HEK 293T
- 5- le seuil de sécurité lié à l'usage de cet extrait en essai aiguë.

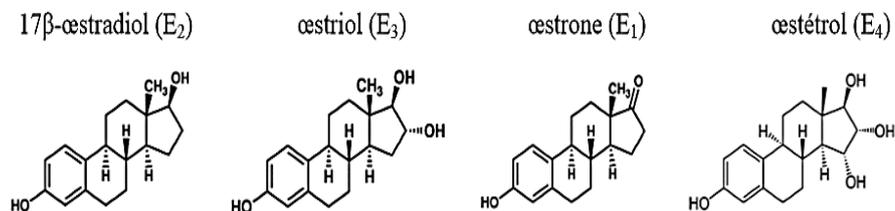


**CHAPITRE I**  
**REVUE DE LA LITTERATURE**

## I.1- Les œstrogènes

### I.1.1- Définition et sources

Les œstrogènes (Figure 1) sont des hormones sexuelles stéroïdes à 18 atomes de carbone qui sont synthétisées à partir du cholestérol principalement dans les ovaires, et dans une moindre mesure dans les tissus périphériques ou extra-gonadiques tels que : le tissu adipeux (Miller, 1991), le cortex adrénalien, le tissu nerveux, et le tissu osseux (Simpson *et al.*, 2003). Le 17 $\beta$ -œstradiol (E<sub>2</sub>), principalement sécrété par les cellules de la thèque interne et de la granulosa des follicules ovariens, et le corps jaune (Matsumine *et al.*, 1991), est l'œstrogène endogène le plus puissant à cause de sa grande affinité pour les récepteurs des œstrogènes (RE) (Gruber *et al.*, 2002 ; Simpson *et al.*, 2003).



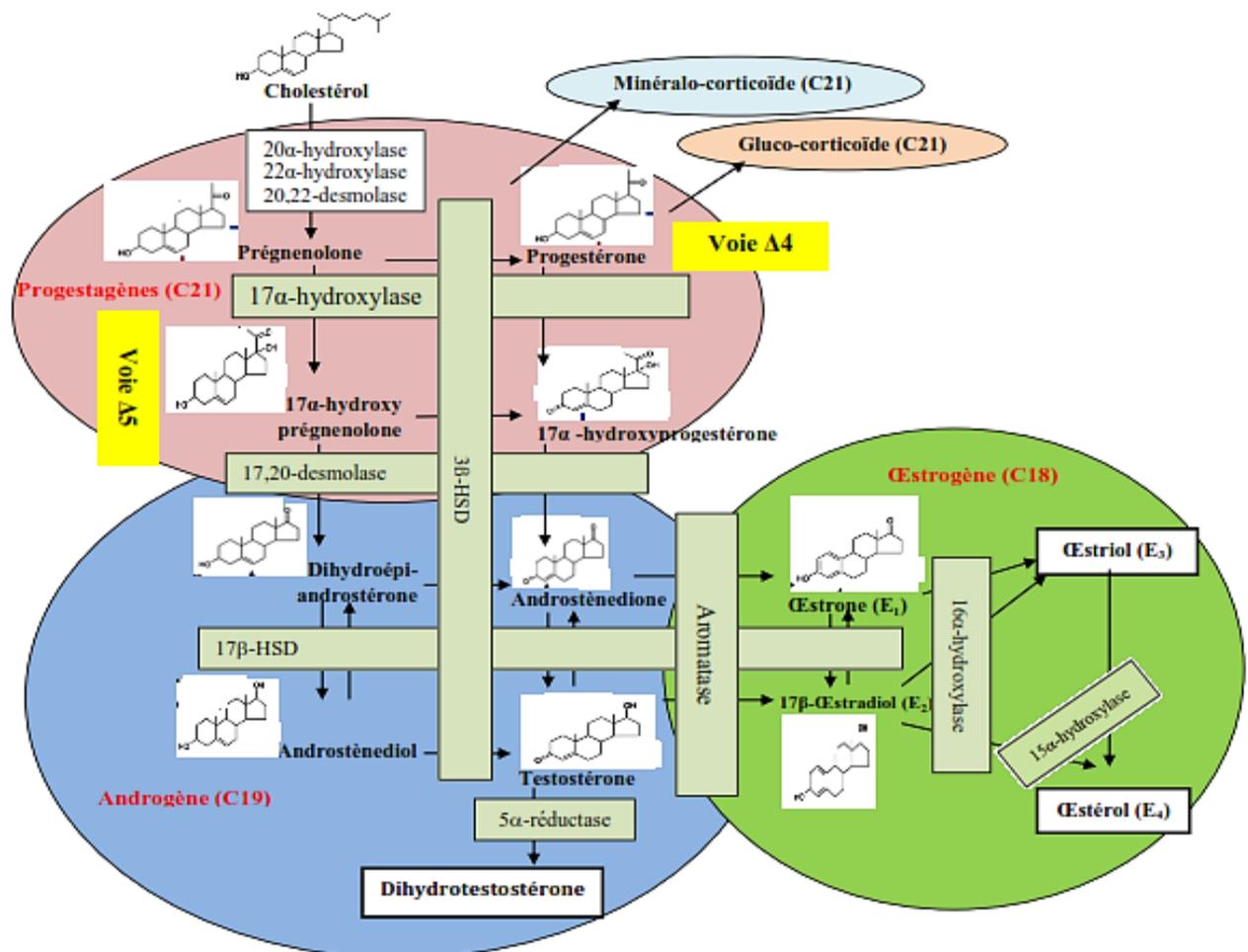
**Figure 1** : Structures chimiques des œstrogènes (Handgraaf, 2013).

### I.1.2- Biosynthèse et régulation

Après internalisation du cholestérol par les cellules endocrines de l'ovaire, celui-ci est transporté vers les mitochondries grâce à la protéine StART (Stocco *et al.*, 2005). Il est transformé en prœgnénolone sous l'action des enzymes (20 $\alpha$ -hydroxylase, 22 $\alpha$ hydroxylase, 20,22- desmolase) utilisant le cytochrome P450 comme coenzyme. Cette synthèse se fait sous le contrôle hormonal de la LH ("*Luteinizing Hormone* ") au niveau des gonades et de l'ACTH ("*Adreno-Cortico-Tropin-Hormone* ") au niveau des glandes surrénales. La prœgnénolone pénètre ensuite dans les microsomes où elle est transformée en androgènes par deux voies alternatives (voies  $\Delta 4$  et  $\Delta 5$ ). Les androgènes par aromatisation dans la granulosa, seront transformés en œstrogènes (Xavier, 2012) (Figure 2).

La régulation de la biosynthèse des œstrogènes suit un axe physiologique appelé axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. Ainsi, l'hypothalamus sécrète par impulsion (toutes les 60 à 90 min) la gonadolibérine ou GnRH ("*Gonadotrophin Releasing Hormone* ") qui est véhiculée par le système porte hypothalamo- hypophysaire et stimule la sécrétion de la FSH ("*Folliculin Stimulating Hormone*") et de la LH par l'adénohypophyse. La FSH agit sur les cellules folliculaires granulaires et favorise l'aromatisation des androgènes en œstrogènes. Les

œstrogènes produits, contrôlent en retour leur synthèse en modulant l'amplitude et la fréquence de libération de la GnRH au niveau de l'hypothalamus (Leung et Armstrong, 1980).



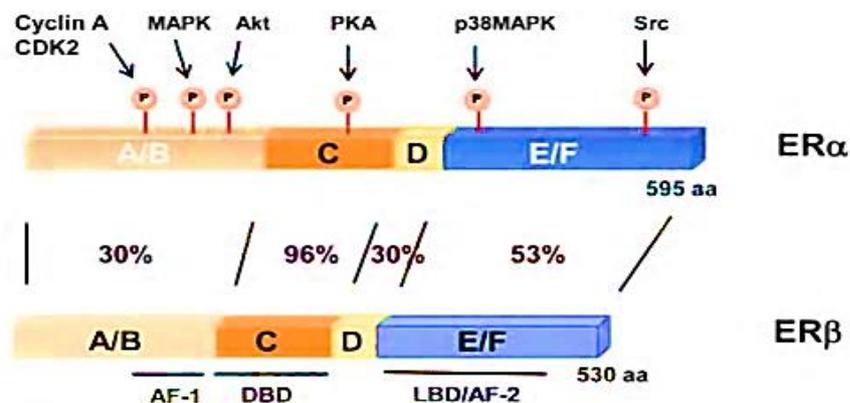
**Figure 2 :** Biosynthèse des œstrogènes (adapté de Handgraaf, 2013), 3β-HSD : 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase, 17β-HSD : 17β-hydroxystéroïde déshydrogénase.

### I.1.3- Les récepteurs aux œstrogènes

Les œstrogènes agissent sur les organes cibles via des récepteurs qui sont intracellulaires (les récepteurs alpha ( $ER\alpha$ ) et bêta ( $ER\beta$ )) ou membranaires (récepteurs GPER : "*G-protein Estrogen receptor*") (Khosla *et al.*, 2008). Les  $ER\alpha$  et  $ER\beta$  présentent une similarité structurale et sont constitués de 4 domaines fonctionnels (Krust *et al.*, 1986) :

- Le domaine de liaison au ligand (LBD) en C-terminal avec ~53% d'homologie entre les deux récepteurs, il contient la fonction transactivatrice dépendante du ligand (AF-2) et le domaine de dimérisation, et est impliqué dans la liaison des chaperonnes et coactivateurs.
- La région charnière ou domaine D est responsable de la spécificité du récepteur et de la polarité de liaison à l'ADN. C'est lui qui permet le changement conformationnel et le maintien de la structure tridimensionnelle du récepteur suite à la liaison du ligand.

- Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) principalement composé de deux modules appelés doigts de zinc à travers lesquels le récepteur interagit directement avec l'ADN.
- Le domaine A/B en N-terminale ayant plusieurs sites de phosphorylation et de sumoylation impliqués dans l'activation et l'expression des gènes cibles en interaction avec des récepteurs dans différentes voies de signalisation. Il contient aussi la fonction transactivatrice indépendante du ligand (AF-1). Le domaine AF-1 est plus actif pour le ER $\alpha$  que pour le ER $\beta$ .



**Figure 3 :** Organisation structurale et fonctionnelle des isotypes  $\alpha$  et  $\beta$  du récepteur aux œstrogènes humain (Roman *et al.*, 2009). Les pourcentages représentent les degrés d'homologie. AF : "Activation Function"; DBD: "DNA Binding Domain"; LBD: "Ligand Binding Domain".

Le récepteur GPER médie les effets rapides en réponse aux œstrogènes (Prossnitz *et al.*, 2009) et est situé au niveau de la membrane plasmique (Filardo *et al.*, 2000) et du réticulum endoplasmique (Revankar *et al.*, 2005).

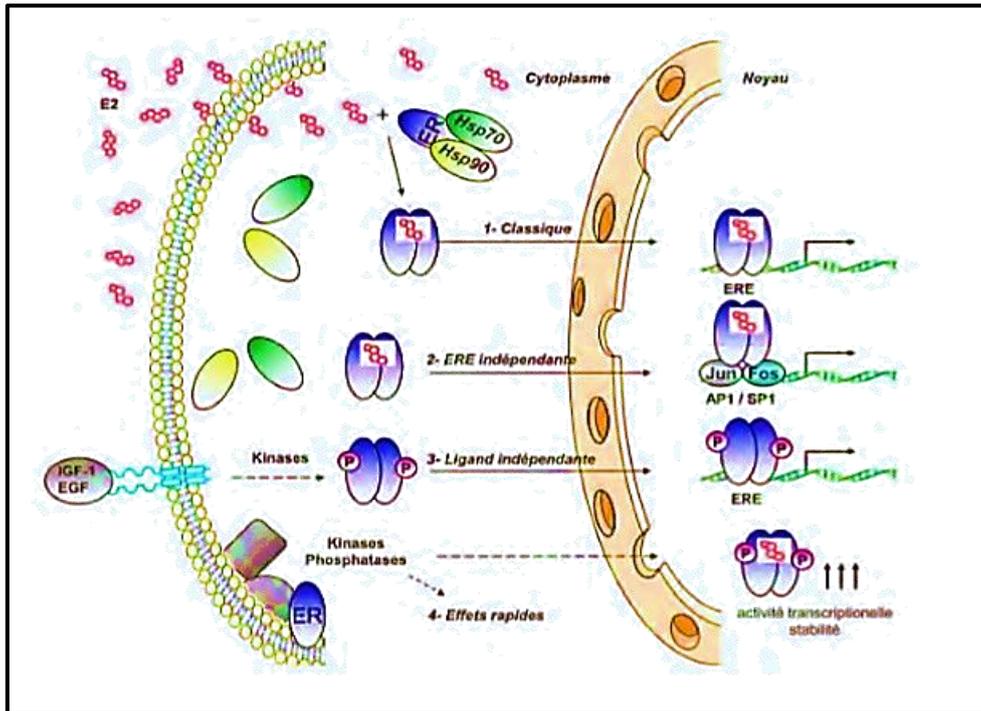
#### I.1.4- Mécanismes d'activation des récepteurs aux œstrogènes

Le mode d'activation des récepteurs aux œstrogènes (Figure 4) est défini selon deux principales voies : la voie génomique et la voie non génomique (Mendelsohn *et al.*, 2010).

##### I.1.4.1- La voie génomique

###### ➤ Le mécanisme classique : l'activation transcriptionnelle ERE dépendante

La liaison du ligand au domaine LBD entraîne la dissociation des protéines chaperonnes. Le récepteur va alors se dimériser et diffuser dans le noyau pour se lier directement à des séquences d'ADN présentes dans la région promotrice de gènes cibles appelé ERE ("Estrogen Receptor Element").



**Figure 4 :** Mécanisme d'activation des récepteurs aux œstrogènes (adapté de Heldring *et al.*, 2007).

#### ➤ **Activité transcriptionnelle ERE-indépendante**

Pour certains gènes (exemples : IGF-1, récepteurs aux LDL), la séquence de la région promotrice n'est pas similaire à celle de l'ERE (Li *et al.*, 2011). Dans ce cas, le récepteur interagit indirectement avec l'ADN par l'intermédiaire des facteurs de transcription c-fos et jun appartenant à la famille des facteurs de transcription AP1 ("Activator Protein 1") ou de Sp1 ("Specificity protein 1") (Paech *et al.*, 1997).

#### ➤ **Activité transcriptionnelle ligand-indépendante**

En absence d'œstrogènes, l'activation des ERs peut se faire par des phosphorylations induites par des facteurs de croissance tels que l'EGF ("*Epidermal Growth Factor*"), l'IGF-1 ("*Insulin-like Growth Factor-1*") et le TGF- $\alpha$  ("*Transforming Growth Factor  $\alpha$* ") (Nilsson *et al.*, 2001). Le récepteur activé va après dimérisation, interagir avec l'ERE (Hart et Davie, 2002).

#### **I.1.4.2- La voie d'activation non- génomique**

La voie non génomique induit les effets très rapides des œstrogènes via un récepteur membranaire. La liaison de l'hormone à ce récepteur active de nombreuses kinases et phosphatases, conduisant à des modifications rapides de protéines cytoplasmiques ou bien à des régulations transcriptionnelles (Simoncini *et al.*, 2002 ; Filardo *et al.*, 2002 ; Levin, 2005).

### **I.1.5- Actions physiologiques des œstrogènes**

Les œstrogènes ont des actions pléiotropes aussi bien sur le développement que sur le fonctionnement des organes reproducteurs (cibles primaires) et extra-reproducteurs (os, tissus nerveux, tissu adipeux, système cardiovasculaire).

#### **I.1.5.1- Action sur l'appareil reproducteur femelle**

Les œstrogènes jouent un rôle primordial au niveau des ovaires, de l'utérus, du vagin et des glandes mammaires (Hewitt et Korach, 2003). Dans les ovaires, les œstrogènes stimulent la croissance des follicules ovariens. Au niveau de l'utérus, ils provoquent l'accroissement de la motilité utérine et l'hyperémie, l'imbibition d'eau et la prolifération cellulaire qui conduisent à l'accroissement de la masse utérine (Keshri *et al.*, 2008). Sur le vagin ils stimulent l'épaississement, la stratification et la lubrification (Gruber *et al.*, 2002).

Au niveau du tissu mammaire, les œstrogènes stimulent la croissance et la différenciation de l'épithélium canalaire ductile, induisent l'activité mitotique des cellules ductiles cylindriques et stimulent la croissance du tissu conjonctif (Porter, 1974).

#### **I.1.5.2- Le système nerveux**

Les œstrogènes ont des effets neuroprotecteurs et jouent un rôle important dans la prévention des maladies neurodégénératives à l'instar des maladies d'Alzheimer et de Parkinson et dans certains cas de dépression (Grigoriadis et Kennedy, 2002) et d'anxiété (Spencer *et al.*, 2008). Des travaux ont montré que les œstrogènes réduiraient la génération des peptides  $\beta$ -amyloïdes dont l'accumulation concourt à la formation des plaques  $\beta$ -amyloïdes qui sont en partie responsables de la maladie d'Alzheimer (Amantea *et al.*, 2005).

#### **I.1.5.3- Le métabolisme glucidique**

Les œstrogènes possèdent un effet bénéfique sur le métabolisme glucidique et plus précisément vis-à-vis du risque de survenue du diabète de type 2. Des études effectuées chez les êtres humains et les animaux suggèrent que les œstrogènes protègent contre l'insulino-résistance (Gale et Gillespie, 2001). Les résultats des travaux de Espeland *et al.* (1998) sur des femmes ménopausées non diabétiques ont suggéré que l'administration chronique d'un traitement hormonal exerce des effets favorables sur l'homéostasie glucidique et améliore la sensibilité à l'insuline.

#### **I.1.5.4- Le métabolisme lipidique**

La distribution ubiquitaire des récepteurs aux œstrogènes favorise leurs implications dans plusieurs voies métaboliques dont celle des lipides et la balance énergétique (Lemieux, 2005).

➤ **Les lipoprotéines** : Les œstrogènes augmentent la transcription de l'ApoA-1 mais ne modulent pas son catabolisme ce qui induit la synthèse de l'ApoA-1 des HDL. Godsland (2001) a montré que chez la femme, les œstrogènes augmentent le cholestérol-HDL et diminuent le cholestérol-LDL. En effet, une augmentation des LDLr par les œstrogènes a été démontrée chez le rat (Di Croce *et al.*, 1996), chez le lapin (Henriksson *et al.*, 1989) et chez l'humain (Parini *et al.*, 1997). Plusieurs études ont montré que, les œstrogènes ont la capacité de diminuer les récepteurs hépatiques des HDL (Fluiter *et al.*, 1998) et à augmenter ceux des LDL (Kovanen *et al.*, 1979) entraînant ainsi des taux bas de LDL alors que ceux de HDL sont élevés (Orshal et Khalil, 2004).

➤ **Les lipases hépatique et lipoprotéique** : La lipase hépatique (HL) joue un rôle important dans le métabolisme des VLDL et des HDL (Connelly et Hegele, 1998). Les HDL étant plus élevés chez la femme, il a été suggéré que la lipase hépatique pourrait être modulée par les œstrogènes (Gytte, 1992). Une diminution de l'activité de la HL a été observée chez des femmes ménopausées recevant des œstrogènes (Brinton, 1996). La lipoprotéique lipase (LPL) est considérée comme l'enzyme principale pour l'entrée des acides gras dérivés des triglycérides dans le tissu adipeux. Kim et Kalkhoff (1975) ont démontré que l'injection des œstrogènes diminue l'activité de la LPL. Hamosh et Hamosh (1975) ont observé une augmentation de l'activité de la LPL suite à l'ovariectomie.

#### **I.1.5.5- Le tissu adipeux**

La différence dans la distribution du tissu adipeux entre l'homme et la femme est liée en partie à une différence de l'activité de la LPL. L'homme a une activité de la LPL plus élevée au niveau des tissus adipeux viscéraux par rapport aux tissus adipeux glutéo-fémoraux alors que l'inverse est observé chez la femme (Imbeault *et al.*, 1999). En utilisant le modèle de la rate ovariectomisée, Roy et Wade (1977) ont démontré que les œstrogènes modulent la prise alimentaire et le bilan énergétique. Il est bien établi que lors du passage de la pré-ménopause à la postménopause, il y a une augmentation marquée de la quantité du tissu adipeux viscéral (Tchernof *et al.*, 2000).

### **I.1.5.6- Le système cardiovasculaire**

➤ **Le cœur** : Les hormones sexuelles ont des effets cardioprotecteurs car ils réduisent la survenue des maladies cardiaques (Baker *et al.*, 2003). De plus, les cellules du myocarde possèdent les récepteurs ER $\alpha$  et ER $\beta$  (Mendelsohn, 2000). Les femmes pré-ménopausées sont moins atteintes de maladies cardiaques comme l'hypertrophie ventriculaire gauche par rapport aux hommes du même âge. Des études cliniques et des travaux réalisés sur des modèles animaux suggèrent que les œstrogènes peuvent moduler l'hypertrophie cardiaque. Les œstrogènes influencent le niveau d'expression du gène sur les canaux calciques. Ils semblent avoir un effet cardioprotecteur dans des conditions ischémiques, probablement en raison de l'amélioration de la fonction vasculaire (Babiker *et al.*, 2002).

➤ **Les vaisseaux sanguins** : Les œstrogènes sont des agents vasoprotecteurs (Kim *et al.*, 2014). Ils causent une vasodilatation en augmentant la formation et la libération de l'oxyde nitrique (Kypreos *et al.*, 2015) et de la prostacycline par les cellules endothéliales (Gruber *et al.*, 2002). Ils réduisent le tonus du muscle lisse vasculaire en facilitant le flux de calcium à travers un mécanisme dépendant du GMPc (White *et al.*, 1995). Les œstrogènes inhibent l'apoptose des cellules endothéliales et promeuvent leur activité angiogénique *in vitro* (Morales *et al.*, 1995). Un apport en œstrogènes réduit la calcification des artères coronaires chez les femmes postménopausées (Manson *et al.*, 2007).

### **I.1.5.7- Action sur le tissu osseux**

L'action ultime des œstrogènes sur l'os est de diminuer la résorption osseuse tout en maintenant sa formation (Cauley, 2015). Ainsi, les œstrogènes jouent un rôle important sur le métabolisme et l'homéostasie osseux, produisant des effets bénéfiques sur la croissance et la maturation osseuses. Ils agissent sur les ostéoblastes et les ostéoclastes. Sur les ostéoblastes, les œstrogènes induisent des effets positifs directs sur la formation osseuse par activation de leur prolifération, de la sécrétion des protéines de la matrice extracellulaire osseuse et des facteurs de croissances tels que : ("*Insuline Growth Factor 1*" (IGF1) ; "*Transforming growth factor  $\beta$ 3*" (TGF $\beta$ 3) (Imai *et al.*, 2010)), du collagène (Jean *et al.*, 1999), de l'ostéoprotégérine (OPG) (De Vernejoul, 1996) et de la phosphatase alcaline (Ateba *et al.*, 2013 ; Zingue *et al.*, 2014)). Ces éléments sont à leurs tour responsable d'une augmentation de la multiplication et de la différenciation cellulaire (Pacifci *et al.*, 1996).

Les œstrogènes réduisent l'expression des cytokines pro-inflammatoires ("*Inter-Leukine 1*" (IL-1), "*Tumor Necrosing Factor*" (TNF) et "*Inter-Leukine 6*" (IL-6)) par les cellules

immunitaires (Pacifci *et al.*, 1996 ; Pfeilschifter *et al.*, 2002), lesquelles favorisent la résorption osseuse par stimulation de la différenciation des ostéoclastes (Jilka, 1998). Les œstrogènes réduisent le stress oxydatif au niveau de l'os, connu pour favoriser l'ostéoclastogénèse (Wauquier *et al.*, 2009).

Les œstrogènes permettent aussi l'absorption du calcium, l'activation de la vitamine D et la synthèse de la calcitonine afin de prévenir l'ostéoporose (Shuid *et al.*, 2011).

## **I.2-Tissu osseux**

### **I.2.1- Rôle**

Le tissu osseux exerce plusieurs rôles :

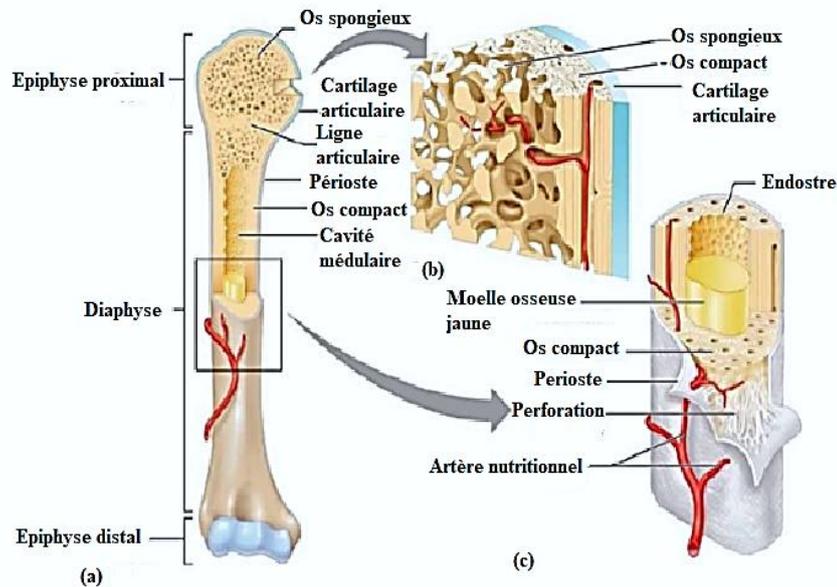
- **Soutien mécanique** : les os constituent une structure rigide servant de support aux tissus mous et de point d'attache aux tendons de la plupart des muscles ;
- **Protection** : les os protègent de nombreux organes internes tels que le cerveau, les poumons et la moelle épinière contre les traumatismes ;
- **Stockage des minéraux** : le tissu osseux constitue un réservoir des minéraux, dont les plus importants sont le calcium et le phosphore. Au besoin, ces minéraux sont libérés dans la circulation sanguine sous forme d'ions, puis distribués aux différentes parties de l'organisme ;
- **La fonction hématopoïétique** : dans l'espace médullaire des os, sont produits les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes au cours du processus de l'hématopoïèse (Noukrati, 2015).

### **I.2.2- Organisation architecturale**

Le tissu osseux est un tissu conjonctif dont la substance fondamentale est minéralisée (calcifiée). Caractérisé par sa résistance et sa rigidité, il représente le constituant essentiel de l'appareil squelettique.

Le tissu osseux non lamellaire ou primitif rencontré chez le fœtus et le jeune enfant est transformé en tissu osseux secondaire ou mature ou définitif chez l'adulte. Ce dernier peut avoir une architecture trabéculaire (os spongieux ou aéroilaire) ou compact (os cortical ou haversien) (Figure 5). Pearce *et al.*, (2007) ont montré que chez le rat adulte, le tissu osseux secondaire ne possède pas de système haversien (os cortical) comme chez l'homme. Il existe plutôt un os fibro-lamellaire résultant de l'emprisonnement des vaisseaux sanguins dans la matrice. Les travaux de Rauch et Schoenau (2002) ont montré que le rat présente une croissance osseuse plus rapide et une capacité de régénération osseuse plus élevée que l'homme. Des nombreux autres travaux ont également montré que, la durée de la phase d'hypertrophie (étape importante

la croissance longitudinale des os) varie en fonction des espèces (Anderson et Shapiro, 2010 ; Wongde *et al.*, 2012). Chez le rat par exemple, elle dure environ 48h et plusieurs années chez l'homme (Hunziker et Schenk (1989a).



**Figure 5** : Structure d'un os long : os long(a), os spongieux(b) et os cortical(c) (Marieb et Hoehn, 2010)

### ➤ Os cortical

L'os cortical ou compact est un os dense, formé d'une matrice minéralisée de type lamellaire qui représente 80% de la masse du squelette. Il délimite les pièces osseuses, et est recouvert par le périoste. Il est organisé en structures cylindriques appelées ostéons disposés autour du canal haversien par où passent des capillaires sanguins et des filets nerveux. Ces canaux haversiens sont reliés entre eux, avec la surface de l'os et avec la moelle osseuse par des canaux de Volkmann (canaux transversaux ou obliques). Chaque ostéon est aligné parallèlement à l'axe de la diaphyse avec un trajet légèrement hélicoïdal. Entre les ostéons se trouvent des lamelles osseuses provenant d'ostéons plus anciens résorbés, l'ensemble donnant une structure compacte, et hétérogène (Ashman *et al.*, 1989). La résistance de l'os cortical dépend de paramètres extrinsèques (direction et vitesse d'application des contraintes exercées) ou intrinsèques (géométrie de la pièce osseuse et propriétés de la matrice minéralisée) (Meyrueis *et al.*, 2004).

### ➤ Os spongieux

L'os spongieux ou trabéculaire représente 20% de la masse du squelette adulte. Il est logé au centre de la diaphyse mais aussi dans les extrémités des os longs (épiphyses et la métaphyse), dans le diploé des os courts et plats. L'os trabéculaire constitue une partie complètement poreuse, moins dense et moins rigide que l'os cortical. C'est un réseau tridimensionnel de plaques osseuses ou trabécules, organisées autour de cavités renfermant les vaisseaux et la moelle osseuse. C'est le lieu principal de l'activité métabolique du tissu osseux (équilibre phosphocalcique) car se renouvèle plus rapidement que l'os cortical (Toppets *et al.*, 2004).

### **I.2.3- Composition**

Le tissu osseux est fait des cellules osseuses noyées dans une matrice osseuse (substance fondamentale et fibres). Cette matrice osseuse représente 95% du volume tissulaire et est constituée d'une fraction organique et d'une fraction minérale (Giudicelli et Souberbielle, 1998 ; Aoki, 1994).

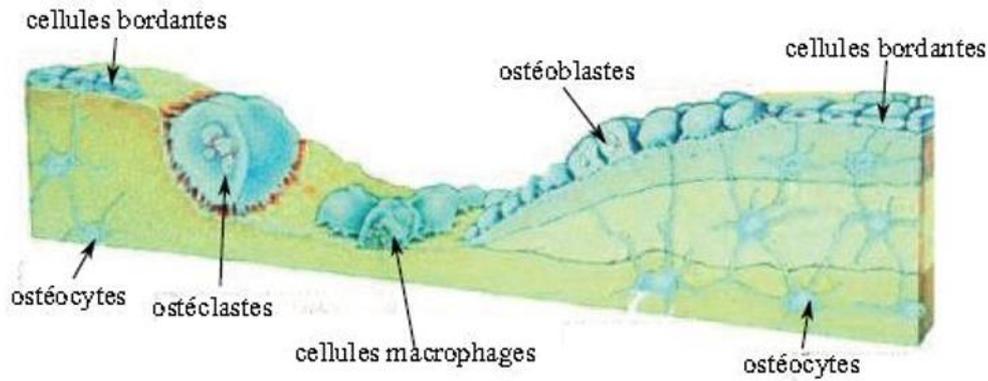
#### ➤ **Matrice osseuse**

La composante organique ou ostéoïde représente 25 à 30% de la masse osseuse. Elle est composée d'environ 90% de collagène de type I et d'environ 10% de protéines non-collagéniques (Jee and Yao, 2001). L'ensemble de ces protéines confèrent à l'os une structure flexible et ductile. Le collagène est synthétisé sous la forme de tropocollagène (Canalis *et al.*, 2003). La phase non collagénique de la matrice organique est composée de protéoglycane qui jouent un rôle dans l'organisation bi- et tri-dimensionnelle de plusieurs molécules telles que : le collagène (Praillet *et al.*, 1998), l'ostéopontine (Boskey *et al.*, 1992) ; l'ostéocalcine (Cohen, 2006) ; des sialoprotéines et la thrombospondine (Ben Marouane, 2005).

La matrice minérale ou inorganique (apatite) représente 60-70% de la masse osseuse et est constituée principalement du calcium et du phosphore (Thomas *et al.*, 2008). Elle joue un rôle important dans l'homéostasie. Les minéraux responsables de la rigidité de l'os (principalement le calcium et le phosphore, mais aussi le Na, K et Mg) se fixent sur la trame protéique de l'ostéoïde pour former des cristaux d'hydroxyapatite (apatite hydratée)  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  et du carbonate de calcium (Kuhn *et al.*, 2008 ; Jee and Yao, 2001).

#### ➤ **Cellules osseuses**

Il existe différents types de cellules osseuses (Figure 6) qui interviennent dans le développement, l'entretien des os et la régularisation de leurs taux en minéraux. On distingue les cellules ostéoformatrices (ostéoblastes, ostéocytes, cellules bordantes) et les cellules ostéorésorbantes (ostéoclastes).



**Figure 6 :** Les principales cellules osseuses (Modder et Khosla, 2008).

### ➤ Les ostéoblastes

Ce sont des cellules jeunes, ovoïdes, d'origine mésenchymateuse et situées à la surface du tissu osseux en croissance (Modder et Khosla, 2008). Elles ont pour fonction principale la synthèse du collagène, de l'ostéocalcine et la phosphatase alcaline. Les ostéoblastes sont à l'origine de la production de nombreux facteurs impliqués dans la régulation du remodelage osseux à savoir : la "*Chemokine Monocyte Chemoattractant protein-1*" (MCP-1) ; le "*Receptor Activated of Nuclear factor Kappa B Ligand*" (RANKL) et l'ostéoprotégérine (OPG) (Li *et al.*, 2011). Par la production d'ostéocalcine, les ostéoblastes favorisent la minéralisation de l'ostéoïde en régulant les concentrations locales en ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et phosphore ( $\text{PO}_4^{2-}$ ) et permettant à cet effet leur précipitation sous forme d'hydroxyapatite (Ducy *et al.*, 2000). Les ostéoblastes sont unis par des jonctions communicantes de type "*gap*" formées par les connexines (Parfitt *et al.*, 1987). Une fois l'ostéoblaste complètement enfouie dans l'ostéoïde, il devient un ostéocyte (Thomas *et al.*, 2008). A la fin de la phase de formation osseuse, les ostéoblastes peuvent être emmurés dans la trame osseuse environnante au sein de logettes appelées ostéoplastes (Bonewald., 2007).

### ➤ Les ostéocytes

Ce sont des cellules fusiformes possédant de longs prolongements cytoplasmiques qui entrent en contact avec les cellules bordantes, les ostéoblastes et les anciens ostéocytes *via* un réseau de canalicules, qui assure des échanges métabolique et d'information entre les cellules (Knothe *et al.*, 2004). Grâce à la sclérostine qu'ils produisent, les ostéocytes peuvent exercer un rétrocontrôle négatif sur la formation osseuse en inhibant la voie de signalisation "*Wingless Integration Site*" (Wnt) en se liant à la "*Lipoprotein Receptor-related Protein*" (LRP) 5/6 (Rachner *et al.*, 2011). Ils assurent également la formation du "*Transforming growth factor  $\beta$* "

(TGF- $\beta$ ) inhibiteur de l'ostéoclastogénèse (Heino *et al.*, 2002) et du RANKL qui favorisent la résorption osseuse (Kular *et al.*, 2012).

➤ **Les cellules bordantes**

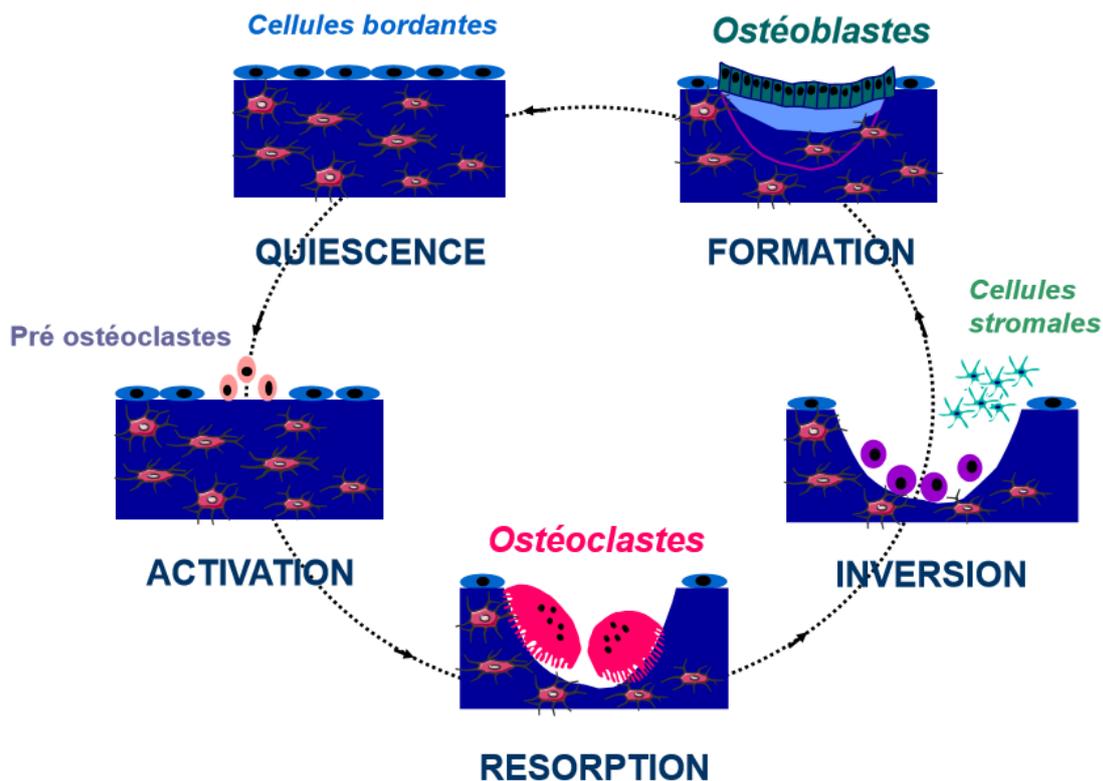
Ce sont des cellules plates et allongées qui dérivent toutes comme des ostéocytes de la différenciation des ostéoblastes. Elles se trouvent à la surface de l'os à l'état quiescent et constituent une barrière entre l'os et la moelle osseuse (Thomas *et al.*, 2008). Ces cellules sont en contact entre elles et communiquent avec les ostéocytes, les cellules stromales et les ostéoclastes (Thomas *et al.*, 2008). Les cellules bordantes peuvent, lorsqu'elles sont sollicitées redevenir des ostéoblastes actifs. Elles sont impliquées dans la réponse directe aux contraintes mécaniques (Mullender et Huiskes., 1997) et aux stimulations hormonales, notamment par la parathormone (Dobnig *et al.*, 2005).

➤ **Les ostéoclastes**

Les ostéoclastes sont d'énormes cellules plurinucléées (Lee *et al.*, 2006) qui dérivent des cellules souches hématopoïétiques (Mairet *et al.*, 2008 ; Soltanoff *et al.*, 2009 ; Chambers, 2010) sous l'action des cytokines ("*Macrophage-Colony Stimulating Factor*" (M-CSF), "*Receptor Activated of Nuclear factor Kappa B Ligand*" (RANKL) et l'OPG. Le nombre ainsi que leur activité sont déterminés par le rapport quantitatif entre le RANKL et l'OPG (Bonnet *et al.*, 2007). Les ostéoclastes assurent la résorption du tissu osseux (Gasser *et al.*, 2008).

#### **I.2.4- Le remodelage osseux**

Le remodelage osseux est le processus physiologique par lequel l'os est renouvelé pour maintenir son intégrité et sa capacité à résister aux contraintes mécaniques. Il permet à l'organisme de réguler l'homéostasie phosphocalcique et constitue un mécanisme d'adaptation du squelette à l'environnement mécanique, permettant de réduire le risque de fracture et assure la réparation des micro-dommages osseux. Le mécanisme de remodelage osseux comprend cinq phases à savoir : l'activation, la résorption, l'inversion, la formation et enfin la phase de quiescence (Figure 7) (Chapurlat et Chappard, 2009 ; Khosla *et al.*, 2010).



**Figure 7 :** Cycle du remodelage osseux (Khosla *et al.*, 2010).

➤ **La phase d'activation**

Par leur activation, les cellules bordantes tout en se rétractant, dégradent la couche collagénique sous-jacente et attirent par chimiotactisme les ostéoclastes sur la zone osseuse ainsi exposée (Thomas *et al.*, 2008). Elles joueraient donc un double rôle : recrutement des ostéoclastes et la préparation de la zone de résorption.

➤ **La résorption**

Elle dure entre 2 à 4 semaines et consiste à la dégradation de la matrice organique et la dissolution de la phase inorganique du tissu osseux, provoquant une augmentation de la concentration locale en calcium, susceptible de déclencher le détachement des ostéoclastes de la matrice (Everts *et al.*, 2002). Au cours de cette phase, l'ostéoclaste accroché à la surface osseuse, acidifie (pH : 4,5 à 4,8) le milieu qui le sépare du tissu osseux en libérant des ions  $H^+$ . Cette acidité permet de dissoudre la phase minérale (Thomas *et al.*, 2008), alors que des enzymes lysosomiales (phosphatases acides, cathepsine K, métalloprotéases) dégradent la matrice organique. L'os ainsi résorbé laisse peu à peu la place à une lacune de résorption (lacune de Howship). Le pH acide de cette lacune favorise l'activité de ces enzymes. La durée de vie d'un ostéoclaste est de 10 jours en moyenne (Cowin, 2001).

### ➤ **La phase d'inversion**

Elle dure entre 9 à 13 jours. Au cours de celle-ci, les ostéoclastes se détachent et meurent par apoptose. Ainsi des cellules macrophagiques viennent dans les lacunes de résorption et érodent les irrégularités du fond de la lacune (Schwartz *et al.*, 2000 ; Mulari *et al.*, 2004).

### ➤ **Phase de formation ou apposition**

La phase d'apposition dure 3 à 4 mois et est caractérisée par le dépôt des cristaux d'hydroxyapatite au fond de la lacune de résorption sous l'action des ostéoblastes (Mulari *et al.*, 2004).

### ➤ **La phase de quiescence**

A la fin de la synthèse de la nouvelle unité multicellulaire de base, les cellules osseuses rentrent en phase de repos (phase quiescente) et ne subissent ni résorption, ni formation osseuse jusqu'au prochain cycle. Une fois la matrice synthétisée, certains ostéoblastes, vont soit subir l'apoptose, d'autres vont être piégés au sein de la matrice et se différencier en ostéocytes et d'autres vont s'aplatir et reconstituer la couche de cellules bordantes (Matsuo et Otaki, 2012).

Le remodelage osseux est équilibré et régulé par différents facteurs, en particulier des hormones et des cytokines. Les œstrogènes y jouent un rôle important en freinant la dégradation du tissu osseux tout en favorisant sa formation. Ainsi en situation de déficit en œstrogènes comme à la ménopause, de nombreuses perturbations concourant à la perte osseuse (fragilisation de l'os) peuvent survenir. Le tissu osseux est œstrogéno-dépendant et les œstrogènes jouent un rôle majeur dans la constitution et la minéralisation osseuse.

## **I.3- Ménopause et problème d'ostéoporose**

### **I.3.1- Définition et épidémiologie**

La ménopause est l'arrêt permanent des menstruations résultant d'une perte de l'activité folliculaire ovarienne (OMS, 2015). Elle survient en moyenne chez la femme entre  $50 \pm 10$  ans et est reconnue rétrospectivement après une aménorrhée supérieure ou égale à douze mois (Agatonovic-Kustrin *et al.*, 2008). L'épuisement du capital folliculaire suivi de la carence œstrogénique, s'accompagnent d'un ensemble de troubles dont certains apparaissent à court et moyen termes (bouffées de chaleur, atrophie et dessèchement vaginal, incontinence urinaire, atrophie des seins et syndromes dépressifs (Pinkerton *et al.*, 2009 ; Freeman *et al.*, 2014) et d'autres à long terme (augmentation du risque de maladies cardiovasculaires et l'ostéoporose) (Al-Anazi *et al.*, 2011).

### I.3.2- Ménopause comme cause d'ostéoporose

La diminution de l'imprégnation œstrogénique à la ménopause est le principal facteur étiologique de l'ostéoporose chez la femme (Pisani *et al.*, 2016). Entre 30 et 80 ans, les femmes perdraient en moyenne 45% de leur capital osseux initial (Lafforgue, 2013).

Les travaux de Braidman *et al.* (2009) ont montré que œstrogènes peuvent moduler directement l'activité des cellules osseuses sur lesquelles des récepteurs spécifiques (ER) ont été identifiés. La carence en œstrogènes est corrélée à une augmentation de la résorption osseuse via la libération des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6 et TNF) qui favorisent le recrutement, la prolifération et l'activité des ostéoclastes (Jilka, 1998), et donc la résorption osseuse. Les œstrogènes sont également susceptibles d'induire la formation, la différenciation, la prolifération et l'activation des ostéoblastes (Cauley, 2015).

## I.4- Définition et types d'ostéoporose

### I.4.1- Définition

Le terme ostéoporose provient du grec *osteon* (os) et de *poros* (petit trou). C'est une affection diffuse du squelette, caractérisée par une diminution de la masse (densité) osseuse et une détérioration de la microarchitecture du tissu osseux avec augmentation de sa porosité, entraînant une augmentation de la fragilité et du risque de fractures (Ji and Yu, 2015 ; Migliorini *et al.*, 2021). Il existe une relation étroite entre la densité minérale osseuse (DMO) et le risque de fracture. En fonction de cette densité et du "T- score" (Ecart entre la valeur du patient et la valeur moyenne des jeunes adultes de même sexe, exprimé en nombre d'écart types), une classification du niveau de perte osseuse (Tableau 1) a été proposée par l'OMS (Kanis, 1994). Ainsi, les sujets dont la densité osseuse est inférieure à -2,5 écart-types de la valeur du jeune adulte ( $T \leq -2,5$ ) sont déclarés ostéoporotiques (CFER, 2007).

**Tableau I** : Définition ostéodensitométrie de l'ostéoporose, selon l'OMS (2007).

<b>T-score</b>	<b>Niveau de perte osseuse</b>
$-1 < T \leq 0$	Normale
$-2,5 < T \leq -1$	Ostéopénie
$T \leq -2,5$	Ostéoporose
$T \leq -2,5$ avec une ou plusieurs fractures	Ostéoporose sévère

## **I.4.2- Types d'ostéoporoses**

On distingue deux principaux types d'ostéoporoses : l'ostéoporose primaire et l'ostéoporose secondaire.

### **I.4.2.1- Ostéoporose primaire**

Elle représente 90% des ostéoporoses et regroupent : l'ostéoporose postménopausique (type I), l'ostéoporose sénile (type II) et l'ostéoporose idiopathique des sujets jeunes.

#### **➤ L'ostéoporose de type I ou postménopausique**

C'est la forme la plus fréquente qui touche 20 à 30% des femmes ménopausées vers 50-70 ans (Ji and Yu 2015). Elle est causée par la carence œstrogénique au cours de la ménopause et entraîne une perte osseuse trabéculaire (Ahn *et al.*, 2014) qui est accentuée en période péri et postménopausique, avec une phase rapide durant les 5 à 10 premières années suivant la ménopause.

#### **➤ L'ostéoporose de Type II ou sénile**

L'ostéoporose de type II ou ostéoporose corticale, qui survient dans les deux sexes à partir de 70 ans, se caractérise par un amincissement à la fois de l'os cortical et trabéculaire (Riggs, 1979). Elle est causée par la diminution avec l'âge de l'activité des ostéoblastes et l'absorption du calcium d'une part, et d'autre part par une augmentation secondaire du taux circulant de la parathormone (Chen *et al.*, 2004).

#### **➤ L'ostéoporose idiopathique du sujet jeune**

C'est une forme particulière d'ostéoporose sans cause connue qui affecte les sujets jeunes. Elle est diagnostiquée après que d'autres causes d'ostéoporoses juvéniles aient été exclues. Dans un cas sur deux, elle est secondaire à un hypogonadisme, une corticothérapie, une endocrinopathie sous-jacente, certaines maladies comme l'ostéogénèse imparfaite, un éthylisme et /ou la mastocytose. Les signes habituels sont : la sensation de douleur à la hanche, le genou, la cheville, les pieds et les fractures des membres inférieures (Ahn *et al.*, 2014).

### **I.4.2.2- Ostéoporose secondaire**

Elle représente 10% des ostéoporoses. Les causes les plus fréquentes sont des pathologies d'origine génétique (ostéogénèse imparfaite, mutation du récepteur aux œstrogènes, mutation du gène de l'aromatase, homocystinurie); endocrinienne (hypogonadisme, hyperthyroïdie, hyperparathyroïdie, syndrome de Cushing, hyperprolactinémie); digestive et inflammatoire (malabsorption, entéro-colopathie

inflammatoire, cirrhose biliaire I, chirurgie bariatrique) et/ou certains traitements médicamenteux (glucocorticoïdes, héparines, chimiothérapie...) ( Briot, 2012 ; Soriano *et al.*, 2014).

### **I.4.3- Ostéoporose : problème de santé publique**

L'ostéoporose est la plus courante des ostéomaladies dans le monde. Elle touche principalement les femmes âgées. La Fondation Internationale d'Ostéoporose (FIO) estimait en 2012 à environ 200 millions le nombre de femmes souffrant d'ostéoporose dans le monde (FIO, 2012).

La gravité de l'ostéoporose réside dans le risque accru des fractures, principale cause de morbidité et de mortalité chez la femme post-ménopausique (Pisani *et al.* 2016). La prévalence de l'ostéoporose chez la femme ménopausée augmente avec l'âge : 14% entre 50 et 70 ans ; 31% entre 70 et 80 ans et 51% chez les femmes de 80 ans et plus (Curran, 2010). Pour plusieurs raisons, on observe une augmentation de l'espérance de vie de la population mondiale. Ce qui conduit inexorablement à une augmentation considérable ou substantielle du nombre de femmes ménopausées (qui passent désormais plus d'un tiers de leur vie en situation de ménopause) et de l'incidence des fractures ostéoporotiques. D'après Abdellah en 2012, les fractures ostéoporotiques touchent 30 à 40% des femmes et 5 à 6% des hommes âgés de plus de 50 ans. A plus de 80 ans cette prévalence augmente jusqu'à environ 70% chez les femmes (Svedbom *et al.*, 2013). En 2000, le nombre total de femmes souffrant de fractures ostéoporotiques étaient estimé à plus de 56 millions dans le monde (Curran, 2010). En 2013, elle était estimée à 10 millions le nombre annuel de nouveaux cas de fractures ostéoporotiques dans le monde, dont les 2/3 chez la femme (Hernlund *et al.*, 2013). Au Cameroun, bien que des études récentes ne soient pas disponibles, les données disponibles sur une étude réalisée en 2003 par Zebaze et Seeman ont montré que sur 192 femmes camerounaises de la ville de Yaoundé âgées de 35 ans et plus, 13,5% entre elles souffrent des fractures de la hanche, 4,7% des fractures des poignets et 81,8% d'autres types de fractures donc les fractures du tibia et du fémur. Une autre étude réalisée en 2008 par Ngandeu et Amvene a montré que sur 218 femmes ménopausées de la ville de Yaoundé, 17,9% des femmes âgées de 50 ans souffraient de fracture osseuse et au-delà de 70 ans la prévalence augmentait jusqu'à 55,8%. Ces nombres étant corrélés au vieillissement de la population, sont évidemment plus importants de nos jours et devraient augmenter au cours des prochaines années ou décennies.

#### **I.4.4- Impacts des fractures ostéoporotiques**

La ménopause, liée à une déficience en œstrogène est à l'origine de l'activation des Lymphocytes T et la libération de cytokines pro-inflammatoires (l'IL-7, TNF $\alpha$  et l'IL-1) (Weitzmann *et al.*, 2005). Ces cytokines induisent la résorption osseuse, en provoquant le recrutement, la différenciation et l'activation des ostéoclastes. L'augmentation de l'activité des ostéoclastes couplée à la réduction de l'activité des ostéoblastes entraîne un déséquilibre de la balance formation/résorption osseuse en faveur de la résorption, marquée par une diminution de la masse ou de la densité, un amincissement et des perforations des travées osseuses (Blain *et al.*, 2008). Ces altérations du tissu osseux entraînent la baisse de la résistance mécanique osseuse et la survenue des fractures dites de fragilité chez les patients (Levasseur *et al.*, 2004).

L'augmentation du nombre de personnes âgées au fil du temps fait croître le nombre d'épisodes de fractures. Cette augmentation du nombre de fractures est étroitement associée à des conséquences économiques, médicales et à une surmortalité quel que soit le site concerné. Les travaux de Strom *et al.* (2011) ont montré que les fractures ostéoporotiques étaient à l'origine d'environ 30% de décès dans le monde dont 34 000 décès en Europe. Parmi ces décès recensés en Europe, les fractures de la hanche et des vertèbres comptaient respectivement pour 49% et 26 % (Chang *et al.*, 2004). Au regard des effets néfastes des fractures ostéoporotiques, la prise en charge était une nécessité impérieuse bien qu'elle nécessitât des moyens colossaux. Clunie *et al.* (2009) ont montré que le coût annuel de prise en charge des fractures ostéoporotiques était estimé à 1,7 milliards de livres en 2009 au royaume Uni. Les travaux de Williamson *et al.* (2017) ont montré que, le coût global des soins de santé et des soins sociaux par patient au cours de la première année suivant une fracture de la hanche aux Etats-Unis était estimé à 43669 USD, soit 13331 USD pour les soins hospitaliers immédiats, dont 3000 \$ sont payés par le patient. Toujours en 2017, on estimait à 2,7 millions le nombre de nouvelles fractures ostéoporotiques pour un coût annuel de 37,5 milliards d'euros (Williamson *et al.*, 2017). Ces fractures entraînaient des nombreuses pertes en vie humaine dans les cinq plus grands pays de l'Union Européenne (France, Allemagne, Italie, Espagne et UK) plus la Suède (Williams *et al.*, 2020). D'après les estimations de l' "*International Osteoporosis Foundation* " parue en 2019, d'ici 2025, l'incidence annuelle des fractures ostéoporotiques dans ces pays devrait dépasser 3 millions de cas, pour un coût de 25 milliards de dollars américain.

#### **I.4.5- Facteurs de risque d'ostéoporose**

Il existe plusieurs facteurs de risque reconnu comme promettant l'ostéoporose parmi lesquels :

### ➤ **Facteurs génétiques**

Le déterminisme de la masse osseuse est multigénique, impliquant par exemple des gènes codant pour le récepteur à la vitamine D, le collagène de type I et des cytokines (Chapurlat *et al.*, 2007). Les travaux de Fox *et al.* (1998) ont montré qu'il existe des antécédents familiaux sur la survenue de l'ostéoporose. Des enfants nés des parents ayant une DMO basse peuvent à leur tour présenter une DMO basse (Seeman *et al.*, 1989).

### ➤ **Facteurs hormonaux**

L'hormone de croissance (GH) est un facteur important de l'augmentation de la masse osseuse pendant les années de croissance jusqu'à la puberté (Wang *et al.*, 2006). L'augmentation des androgènes surrénaliens lors de l'adrénarchie a aussi un effet bénéfique sur la masse osseuse dans les deux sexes (Wang *et al.*, 2006). Les œstrogènes favorisent chez la fille une accumulation d'os endo-cortical, afin de prévoir les mobilisations rapides demandées par les grossesses et l'allaitement, ceci sans risque secondaire de diminution de la résistance osseuse (Abdellah, 2012).

#### ➤ **Facteurs mécaniques**

L'acquisition du pic de la masse musculaire à la puberté chez le garçon et la fille survient 6 à 7 mois avant le développement de la masse osseuse aux différents sites. Cette période précédant la croissance osseuse périostée, permet une résistance osseuse maximale et adaptée au développement musculaire et pourrait être une possible explication du taux élevé de fractures rencontré à la puberté (Abdellah, 2012).

Des études menées chez les sportifs ont montré que, la course à pied, la gymnastique et l'haltérophilie induisent un gain osseux, alors que le cyclisme et la natation sont peut ostéogéniques (Chapurlat *et al.*, 2007).

#### ➤ **D'autres facteurs**

La perte risque d'ostéoporose s'accroît avec l'âge (Kanis, 2002), la prise de certains médicaments comme les corticoïdes (Chapurlat *et al.*, 2007), l'alcoolisme (Kanis *et al.*, 2005), le tabagisme (Wang *et al.*, 2006). Certaines maladies dont l'hyperthyroïdie, la maladie de Cushing, l'hyperparathyroïdie primitive, l'hypogonadisme, et les rhumatismes inflammatoires chroniques sont souvent à l'origine des ostéoporoses secondaires (Chapurlat *et al.*, 2007). Par ailleurs, la carence en vitamine D et en calcium peut entraîner une diminution de la calcémie et donc une hyperparathyroïdie réactionnelle, favorisant la résorption osseuse et donc la baisse de la DMO (Nordin, 2009). Il est également bien connu que, durant la période de croissance, une

carence en calcium est un facteur d'ostéopénie ultérieure et un régime alimentaire riche en calcium permet d'optimiser le pic de masse osseuse à l'âge adulte (Chapurlat *et al.*, 2007).

#### **I.4.6- Méthodes de détection de l'ostéoporose**

L'ostéoporose est une « maladie silencieuse », asymptomatique avant le stade de la fracture. Le défi lancé aux cliniciens est de poser précocement le diagnostic avant la survenue des fractures. Toute fracture survenant en dehors d'un traumatisme violent doit faire évoquer le diagnostic d'ostéoporose (sauf les fractures du crâne, rachis cervical, de la main et des orteils qui ne sont jamais ostéoporotiques).

##### **I.4.6.1- Examens paracliniques**

Les techniques usuelles de la mesure de la densité minérale osseuse sont :

- **L'absorptiométrie biphotonique au rayon** : c'est la technique précise et reproductible recommandée pour la mesure de la DMO dans le cadre du diagnostic et du suivi de l'ostéoporose.
- **L'absorptiométrie monophotonique à rayons X** : c'est une méthode peu onéreuse, reproductible et réservée à l'étude des os superficiels (radius, calcaneum).
- **La tomodensitométrie quantitative** : elle permet de mesurer une DMO (par unité de volume) et une étude séparée du tissu osseux trabéculaire et cortical. Ses performances en termes de reproductibilité et d'irradiation sont inférieures à celles de l'absorptiométrie.
- **L'exploration par les ultrasons** : cette technique n'apprécie pas réellement la qualité osseuse. Plusieurs travaux ont montré que les patients ostéoporotiques ont des valeurs ultrasoniques plus basses (Roux et Thomas, 2009).

##### **I.4.6.2- La radiographie standard**

La radiographie standard de la fracture montre une raréfaction osseuse homogène sans signes d'ostéolyse. La radiographie montre une hypertransparence osseuse qui est une observation peu fiable car elle dépend des constantes radiologiques et de la corpulence. Une diminution apparente de la DMO ne se voit que lorsque la perte osseuse atteint 30% du contenu minéral osseux (Guyène *et al.*, 2023).

##### **I.4.6.3- Les explorations biologiques**

Devant une raréfaction osseuse, les examens de première intention à demander sont : un hémogramme, un bilan inflammatoire et un bilan phosphocalcique. Les autres examens sont demandés en fonction de l'orientation étiologique et les résultats du premier bilan. Toutefois, des marqueurs biologiques du remodelage osseux capables d'évaluer l'activité de formation

osseuse (ostéocalcine, phosphatases alcalines) ou l'activité de résorption osseuse (télopeptides du collagène) sont connus (Ehnert *et al.*, 2015 ; Nollet *et al.*, 2015).

#### **I.4.7- Complications de l'ostéoporose : les fractures**

La fracture osseuse est par définition une rupture de la continuité de l'os (Odokuma *et al.*, 2015). Tous les os sont susceptibles à des fractures ostéoporotiques. Parmi celles qui constituent un fardeau majeur pour la santé dans le monde, on distingue les fractures de l'extrémité supérieure du fémur, de la hanche et des vertèbres sont. L'incidence de ces fractures augmente de façon exponentielle avec l'âge. Les formes les plus fréquentes sont :

##### **➤ La fracture de l'extrémité supérieure du fémur**

La fracture de l'extrémité supérieure du fémur (FESF) représente la complication la plus grave et la plus fréquente chez les personnes âgées souffrant d'ostéoporose. Près de 90% des femmes et 70% des hommes présentent une FESF lorsqu'ils sont âgés d'au moins 70 ans (Curran, 2010). En dehors de la forte douleur, la FESF se manifeste par une impotence fonctionnelle totale du membre inférieur atteint et est responsable d'environ 20% de décès dans les mois qui suivent la fracture (Abdellah, 2012).

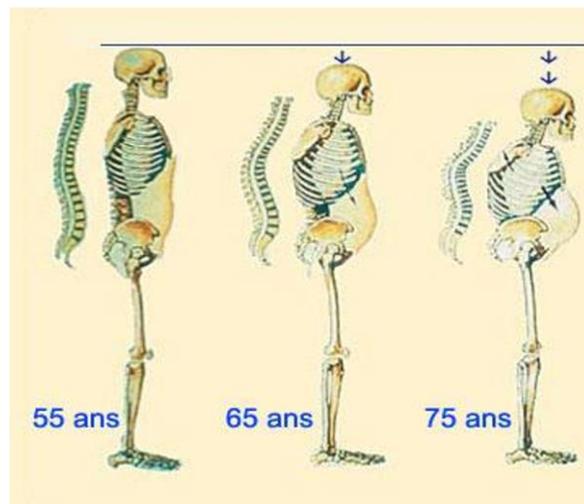
##### **➤ La fracture de la hanche**

L'incidence de la fracture de la hanche (FH) augmente de façon exponentielle avec l'âge (Cooper *et al.*, 2011). Chez les femmes, elle passe de 2/100 000 à l'âge de 35 ans à 3 032/100 000 à 85 ans (Abdellah, 2012). Aussi, il existe une grande variabilité géographique et ethnique dans l'épidémiologie des fractures de hanche. Les chiffres les plus élevés étant rapportés chez les femmes blanches des pays scandinaves suivis par l'Amérique du Nord et l'Océanie (Cheng *et al.*, 2011). Aux Etas- Unis, des différences géographiques existent avec des fréquences plus élevées dans les régions du sud par rapport aux régions du Nord et de l'Ouest. Toujours aux Etats-Unis, l'incidence des FH chez les femmes blanches augmente avec la précarité, le faible niveau socioéconomique et la diminution de l'ensoleillement. Elle est plus faible dans les populations noires et asiatiques (Chapurlat, 2008).

##### **➤ La fracture vertébrale**

La fracture vertébrale (FV) est plus élevée chez les femmes asiatiques par rapport aux femmes blanches (Abdellah, 2012). Les chiffres les plus bas ont été rapportés chez les femmes noirs et chez les hispaniques (Abdellah, 2012). La FV engendre des troubles tels que : les rachialgies chroniques mécaniques, cyphose dorsale altérant l'esthétique corporelle avec relâchement de la sangle abdominale et rapprochement entre les côtes et la crête iliaque avec

altération de la fonction pulmonaire, de la qualité de vie et parfois une dépression réactionnelle (Abdellah, 2012). Il est admis que la présence d'une fracture vertébrale multiplie par 5 le risque d'une nouvelle fracture vertébrale et d'autres fractures quel qu'en soit le site à court terme. Cependant, les FV peuvent être asymptomatiques dans pratiquement deux tiers des cas et ne se manifestent que par la perte de taille et la cyphose dorsale secondaire (Abdellah, 2012) (Figure 8).



**Figure 8** : Conséquences statiques des fractures vertébrales (Abdellah, 2012).

#### **I.4.8- Ostéoporose et stress oxydant**

Un antioxydant est une substance qui retarde ou empêche l'oxydation d'un substrat oxydable (protéines, hydrates de carbones, acides gras) (Dekkers *et al.*, 1996). Plusieurs travaux ont montré que, les femmes atteintes d'ostéoporose ont un taux plasmatique d'antioxydants réduit. Zhang *et al.* (2013) ont montré que les femmes ostéoporotiques présentent un taux accru de la 8-iso-prostaglandine F alpha (8iso-PGF), un biomarqueur du stress oxydatif qui est lié biochimiquement à une densité osseuse réduite. D'après Pegrum *et al.*, (2012), la gravité de l'ostéoporose est positivement corrélée avec le taux du stress oxydatif. Par exemple, le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) favorise la résorption osseuse via la formation des ostéoclastes, la différenciation des cellules clonales de la lignée HD-11 issues des précurseurs ostéoclastiques et la motilité des ostéoclastes. La production des espèces réactives à l'oxygène dans les ostéoclastes est inhibée après traitement des cellules avec des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT) et les œstrogènes (Zhang *et al.*, 2013). On distingue : les antioxydants endogènes et les antioxydants exogènes.

##### ➤ **Antioxydants endogènes**

- **La superoxyde dismutase (SOD)** est une enzyme qui, dans les mitochondries, catalyse la transformation des radicaux superoxydes ( $O_2^-$ ) en peroxydes d'hydrogène et en dioxygène

(Faraci et Didion, 2004). Le peroxyde d'hydrogène ainsi formé contribue à la formation du radical hydroxyle potentiellement toxique pour la cellule. Ainsi, en cas de stress oxydant modéré, on observe une surexpression de SOD et si le stress oxydant persiste, la SOD est détruite et son expression diminue. Les travaux de Loeser *et al.* (2002) et de Afonso *et al.* (2007) ont montré que la SOD joue un rôle protecteur contre l'arthrose chez les personnes âgées.

- **La catalase** est localisée dans le foie, les globules rouges et préférentiellement dans le peroxysome. Elle possède une très forte affinité pour le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) permettant de limiter sa diffusion dans la cellule (Scandalios, 2005). En cas de stress impliquant une surproduction du peroxyde d'hydrogène, elle catalyse directement la réduction du peroxyde d'hydrogène et protège ainsi les tissus des radicaux hydroxyles hautement réactifs (Scandalios, 2005).

- **La glutathion peroxydase (GPx)** joue un rôle important dans le catabolisme du peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène (Sajeeth *et al.*, 2011). Une autre enzyme qui possède un rôle clé est la glutathion réductase, son rôle est de régénérer le glutathion en utilisant le NADPH (Nicotinamide Adénosine Dinucléotide Phosphate) comme cofacteur. La glutathion réductase permet également la régénération du glutathion réduit (GSH) (Arousseau, 2002).

- **Le glutathion réduit (GSH)** est l'antioxydant endogène le plus abondant dans les cellules eucaryotes qui interagit avec les espèces réactives de l'oxygène (ERO), empêchant ainsi l'oxydation des substrats organiques. Il participe également à la réduction des hydroperoxydes et à l'élimination des xénobiotiques (Nicotera et Orrenius, 1986). Le GSH est un piègeur des radicaux superoxydes et protège les groupes thiol des protéines contre l'oxydation (Stein *et al.*, 1989). Une diminution de GSH peut-être la conséquence de son utilisation par la glutathionne peroxydase et/ou la glutathionne transférase comme substrat (Stein *et al.*, 1989).

- **L'acide urique** est un produit final du métabolisme des bases puriques. Il est présent à des concentrations beaucoup plus élevées que l'acide ascorbique et apporte les deux tiers de la capacité antioxydante du plasma (Johnson *et al.*, 2009). L'acide urique représente à lui seul 60% de l'activité antioxydante (Fairbrother and Warn., 2003). En cas de stress oxydant, la concentration de l'acide urique augmente, en particulier lors du phénomène d'ischémie-reperfusion.

#### ➤ **Antioxydants exogènes**

- **Les caroténoïdes** sont des pigments liposolubles de couleur jaune, orangée ou rouge. Seul un nombre limité d'entre eux est présente dans le sang et les tissus (Beecher et Khachik, 1992). Les principaux caroténoïdes sont le 9-cis et le trans-β-carotène (provitamine A), le lycopène et

la lutéine. Les caroténoïdes et les vitamines A interagissent avec l'oxygène singlet et empêchent l'oxydation des acides gras polyinsaturés (Beecher et Khachik, 1992).

- **Vitamines C et E** : la vitamine C est un antioxydant hydrosoluble situé dans toutes les membranes cellulaires. Elle empêche l'oxydation des LDL produits par divers systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et participe dans la régénération de la vitamine E oxydée et du glutathion (Chen *et al.*, 2005). La vitamine E est un antioxydant liposoluble qui permet d'éviter la propagation des chaînes radicalaires dans les lipides (Traber *et al.*, 2007). Elle augmenterait l'activité des SOD et des catalases (Margaritis *et al.*, 2003)

- **Le sélénium, le Zinc et le thiol** sont aussi des antioxydants exogènes (Therond *et al.*, 2003). Le sélénium est le constituant de la GPx qui participe à la protection de l'organisme contre l'attaque radicalaire. Ces effets antioxydants seraient responsable des effets anticancéreux et anti-âge (Ducros et Favier, 2004). Le Zinc quant à lui induit la formation des protéines antioxydantes comme les métalloprotéines. Il protège également les groupements thiols des protéines, lesquels groupements inhibent la formation d'espèces oxygénées (Mezzetti *et al.*, 1998), participant ainsi à la détoxification des nombreux tissus à l'exemple du tissu osseux (Seve, 2002). Ainsi la carence en zinc peut provoquer des anomalies osseuses en relation avec une baisse des phosphatases alcalines (nécessaire à la calcification), du nombre des ostéoblastes et des chondrocytes ainsi qu'une réduction de la multiplication des fibroblastes osseux (Seve, 2002).

#### **I.4.9- Prise en charge de l'ostéoporose postménopausique**

##### **I.4.9.1- Moyens hygiéno-diététiques**

Les facteurs de risque d'ostéoporose tels que l'âge, le sexe, ou les antécédents familiaux ne sont pas modifiables. D'autres facteurs de risque complémentaires aux traitements pharmacologiques peuvent être limités et inclus. Il s'agit de :

➤ **Le style de vie** (lutte contre l'alcoolisme et le tabagisme, la pratique régulière d'une activité physique, le maintien du poids corporel et la prévention des chutes). Ces facteurs permettront de maintenir la densité minérale osseuse, et de prévenir l'ostéoporose postménopausique (Chapurlat *et al.*, 2007).

➤ **Supplémentation calcique** : un apport adéquat de calcium est essentiel pour l'acquisition optimale du pic de masse osseuse et la réduction du taux de perte osseuse associée au vieillissement (Nieves *et al.*, 2008).

➤ **La vitamine D** : elle contribue à l'absorption du calcium au niveau intestinal et agit

également sur le squelette pour favoriser l'accrétion minérale. Un apport insuffisant en vitamine D est bien décrit comme étant un facteur important de l'ostéoporose. Les travaux de Nieves *et al.* (2008) conduite chez des femmes ménopausées caucasiennes ont révélé qu'un apport adéquat de vitamine D tout au long de la vie est associé à une réduction d'ostéoporose. Plusieurs autres analyses ont montré que l'apport de 700-800 UI/jour de vitamine D réduit le risque relatif de fracture de hanche de 26% et de 23% pour les autres fractures chez les personnes âgées. Une dose de 700-1000 UI/jour réduit également le risque de chutes de 19% chez la personne âgée (Bischoff *et al.*, 2009). Les concentrations sériques optimales de la vitamine D3 pour un effet ostéoprotecteur avéré se trouvent entre 90 et 100 nmol/L (Bischoff *et al.*, 2006).

➤ **Les protéines** : les protéines sont également des constituants essentiels du tissu osseux. Chez des patients âgés souffrant d'une fracture du col fémoral, il a été établi qu'une supplémentation protéique permet d'améliorer le pronostic vital. Toutefois, bien que l'on puisse considérer qu'une surcharge protéique soit délétère pour le squelette, la carence protéique est aussi un vecteur de perte osseuse, chez les seniors (Bonjour, 2005 ; Rizzoli, 2008).

#### **I.4.9.2- Traitements médicamenteux**

➤ **Le traitement hormonal substitutif (THS)**

Il évite l'ostéopénie et réduit le risque de fractures (Luhmann *et al.*, 2012 ; Liang *et al.*, 2022). Toutefois, en raison d'un rapport bénéfice/risque jugé défavorable, il n'est plus proposé en première intention dans le cadre de la prise en charge de l'ostéoporose. Le THS augmenterait le risque de cancer du sein et les accidents cardiovasculaires (Abdellah, 2012 ; Levin *et al.*, 2018).

➤ **Les Modulateurs Sélectifs des Récepteurs aux œstrogènes (MSRO)**

Parmi les modulateurs sélectifs de l'activation des récepteurs des œstrogènes, le tamoxifène est le produit anti-ostéoporotique le plus commercialisé (Barrett *et al.*, 2006). Il est particulièrement utilisé pour le traitement de l'ostéoporose peu sévère en raison de son action modérée sur le remodelage osseux et sur l'incidence des fractures vertébrales (Thomson *et al.*, 2017). Le tamoxifène a un effet agoniste sur l'os et le métabolisme lipidique, et antagoniste sur les cellules mammaires et endométriales. Il est prescrit aux femmes de 60 ans, chez qui les signes climatiques sont le plus souvent disparus et ne constituent plus un obstacle pour une observance au long cours (Abdellah, 2012). Tout comme pour les œstrogènes, la prise du tamoxifène est associée à une augmentation du risque de maladies thromboemboliques (Barrett *et al.*, 2006 ; Migliorini *et al.*, 2021).

### ➤ **Les bisphosphonates**

Ce sont des antirésorptifs, inhibiteurs du remodelage osseux qui possèdent une grande spécificité pour les cristaux d'hydroxyapatite de la matrice osseuse. Ils entraînent une diminution du nombre d'ostéoclastes, de la résorption osseuse et limitent donc l'occurrence de certaines fractures ostéoporotiques (fémur et vertèbres). Les bisphosphonates sont caractérisés par leur très faible absorption orale (< 3%) et cette faible absorption est en plus limitée par le calcium et les aliments. L'administration par voie veineuse assure une meilleure biodisponibilité (Luhmann *et al.*, 2012). Malheureusement, la prescription des bisphosphonates est associée à l'apparition de l'ostéonécrose de la mâchoire (Khosla *et al.*, 2007) et à une œsophagite (Luhmann *et al.*, 2012).

### ➤ **Le dénosumab : l'immunothérapie :**

Le dénosumab est la première biothérapie anti-catabolique pour le traitement de l'ostéoporose post-ménopausique (Abdellah, 2012). Le dénosumab est un anticorps monoclonal (IgG<sub>2</sub>) liant le RANK-L, et empêchant sa liaison à son récepteur spécifique RANK nécessaire à la formation des ostéoclastes. Cette inhibition réduit la résorption osseuse et le risque de fracture avec la même efficacité que les bisphosphonates (Luhmann *et al.*, 2012). Le dénosumab est administré en une seule injection sous cutanée de 60 mg tous les 6 mois. La tolérance du dénosumab est excellente. Un meilleur ciblage de l'os par ces molécules semble cependant nécessaire à cause des effets secondaires observés : eczéma, cellulite, et risque de nécrose de la mâchoire (Pichardo *et al.*, 2012).

### **I.4.10- Phytothérapie et ostéoporose**

L'utilisation des plantes médicinales pour le traitement de l'ostéoporose post-ménopausique est très répandue. Les travaux de Yang *et al.* (2002) ont montré que le ginseng régule le métabolisme des cellules osseuses. Plusieurs travaux ont montré que le thé et ses composants bioactifs augmentent la densité minérale osseuse et active les cellules ostéoblastiques tout en inhibant l'activité des ostéoclastes (Chen *et al.*, 2005, Das *et al.*, 2005). Franklin *et al.* (2007) et Bu *et al.* (2007) ont montré que, la consommation fréquente des prunes séchées module la masse osseuse et favorise l'ostéoformation chez les femmes ménopausées (Arjmandi *et al.*, 2002). Les résultats des travaux de Soung *et al.* (2006) et Devareddy *et al.* (2006) ont montré que les phytoestrogènes augmentent la DMO et restaurent la masse osseuse chez les souris ovariectomisées. Chez les femmes ostéoporotiques, les phytoestrogènes augmentent le taux d'IGF-I, de l'alcaline phosphatase, de l'ostéocalcine et stimulent l'activité des ostéoblastes (Arjmandi *et al.*, 2003). Mackinnon *et al.* (2011) ont montré que, la

consommation de tomates et de son polyphénol (le lycopène) génère chez la femme, une diminution du N-télopeptide et de collagène de type 1 (marqueur de résorption osseuse) et augmente la masse osseuse, ainsi que le taux de calcium et une résistance osseuse chez les rates ovariectomisées (Cheong and Chang, 2009). D'autres travaux ont montré que, le resvératrol et la myrtille (stilbène) provenant du raisin, augmentent la résistance de l'os à la fracture, la densité minérale osseuse, préserve la microarchitecture de l'os trabéculaire chez la rate ovariectomisée (Habold *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2011) et augmentent la prolifération et la différenciation des ostéoblastes (Chen *et al.*, 2010).

Les travaux de Ateba *et al.* (2013) et Zingué *et al.* (2014) ont montré que les extraits au méthanol de *Eriosema laurentii* De Wild (Leguminosae) et de *Millettia macrophylla* Benth (Fabaceae) préviennent respectivement la perte de la masse osseuse et protège la microarchitecture des os chez la rate ovariectomisée de souche Wistar. Nguéguim *et al.* (2017) ont montré que, l'extrait aqueux de *Peperomia pellucida* (L.) HBK accélère la cicatrisation osseuse chez la rate Wistar non ovariectomisée.

## **I.5- La plante : *Lannea acida***

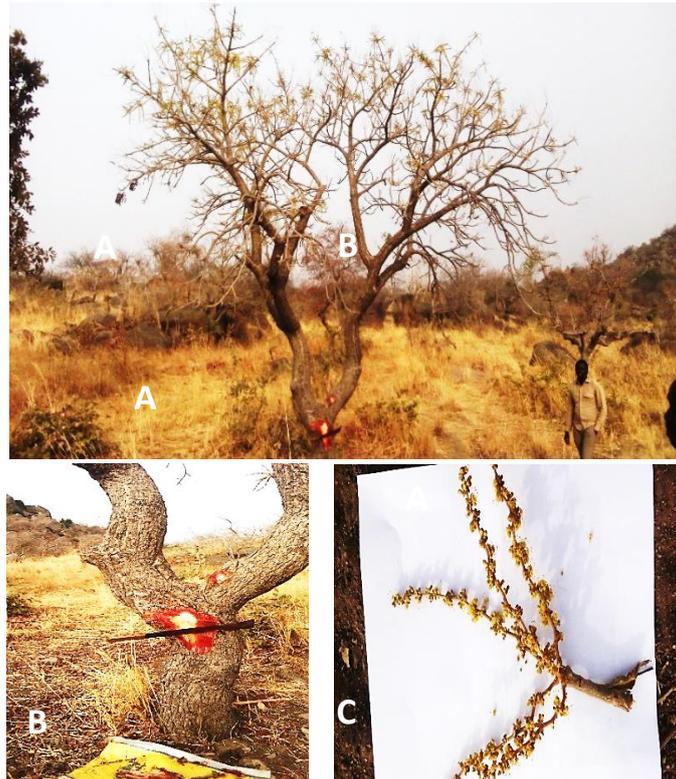
### **I.5.1- Classification et synonymes**

*Lannea acida* A. Rich est une plante de la famille des Anacardiaceae. Le nom du genre *Lannea* provient du mot latin " lana " qui veut dire " laine " en référence aux jeunes plantes poilues (Schmidt *et al.*, 2002). Les synonymes de *Lannea acida* sont : *Lannea buettneri* Engl. ; *Lannea djalonica* A. Chev. ; *Lannea glaucescens* Engl. ; *Lannea lagdoensis* (Engl et K. Krause) Mildbr. ; *Lannea oleosa* A. Chev. ; *Odina acida* (A. Chev.) Walp., et *Sorindeia lagdoensis* Engl et K. Krause (Pell *et al.*, 2011). La classification de *Lannea acida* d'après le système APG III, (2009) est la suivante :

**Règne** : .....Végétal  
**Embranchement** : .....Angiospermes  
**Division** : .....Magnoliophyla  
**Classe** : .....Magnoliopsida  
**Ordre** : .....Sapindales  
**Famille** : .....Anacardiaceae  
**Genre** : .....*Lannea*  
**Espèce** : .....*Lannea acida*

### I.5.2- Répartition géographique et description

Le genre *Lannea* comporte environ 40 espèces qui sont en général des arbres ou des arbustes, occupant différents habitats de l'Afrique sub-saharienne (Pell *et al.*, 2011). *L. acida* est retrouvée en Gambie, au Bénin, Ghana, en Côte d'Ivoire, au Burkina Faso, Niger, Mali, Nigeria, Guinée équatoriale, République Centrafrique et au Cameroun (Burkill *et al.*, 1995). La figure ci-dessous indique la photo de *L. acida* (Figure 9).



**Figure 9** : Photos de *Lannea acida* ; A : arbre entier B : tronc d'arbre ; C : fruits ; Photos prises par M. RIEPOUO MOUCHILI Oumarou à Moutourwa (Extrême Nord, Cameroun) : le 11/07/2017

Elle est appelée "Mipaodi" en Guiziga ou "Timbiya" en Moundang (Cameroun), ou encore "faruhi" en fulani-fulfulde (Nigeria) ; "faàrú" en Hausa (Gill, 1992) et "kikié" en Bamoun (Tetsassi *et al.*, 2019). *L. acida* mesure 8 à 12 m de haut, son écorce est crevassée, écailleuse et noirâtre, à tranches rouges rayée de jaune et fibreuse. Ses feuilles sont alternes, imparipennées, glabres atteignant 30 cm de long, à rachis plus ou moins rouge (surtout à l'état jeune). Les fruits sont des drupes jaunes ou rouges à maturité, légèrement acides, résineux avec un goût agréable et consommés cru ou utilisés pour fabriquer le jus (Arbonier, 2009).

### **I.5.3- Utilisation traditionnelle**

Les écorces du tronc de *Lannea acida* sont utilisées pour traiter la dysménorrhée, l'aménorrhée et l'infertilité (Arbonier, 2009). Les feuilles, les écorces et les racines de *L. acida* sont utilisées pour traiter les blessures, l'inflammation, la goutte, les ulcères et le rhumatisme (Burkill *et al.*, 1995 ; Ellenberg *et al.*, 1998 ; Arbonier, 2009 ; Yaoitcha *et al.*, 2015). Lors de l'enquête ethnobotanique à Moutourwa (Extrême Nord, Cameroun), les populations ont indiqué qu'elles macèrent les écorces du tronc dans une boisson locale pour soigner la diarrhée, le mal du bas ventre et les douleurs osseuses chez les femmes ménopausées. *L. acida* est utilisée dans la pharmacopée Africaine pour soigner des blessures, l'inflammation et les douleurs, les hémorroïdes, les problèmes gastro-intestinaux, la fièvre, le paludisme et les problèmes gynécologiques (Nadembega *et al.*, 2011 ; Oluranti *et al.*, 2012 ; Buochuama *et al.*, 2018).

Les écorces de *L. acida* sont mélangées avec la gousse de *Parkia biglobosa* (Jacq.) R. Br. ex G. Don pour soigner les enflures, alors que ses feuilles sont mélangées avec les feuilles de *Alafia barteri* Oliv., les racines de *Flueggea virosa* (Roxb. ex Willd.) Royle et les grenades de *Xylopiya aethiopica* (Dunal) A. Rich pour soigner le cancer (Soladoye *et al.*, 2010). Au Ghana, les feuilles de *L. acida* sont mélangées avec celles de *Azadirachta indica* A. Juss et *Mangifera indica* pour soigner le paludisme (Asase *et al.*, 2005). Les travaux de Djoueche *et al.* (2011) ont montré que les écorces de *L. acida* sont mélangées à celles de *Guiera senegalensis* J.F. Gmel pour éliminer les parasites intestinaux.

### **I.5.4- Travaux pharmacologiques antérieurs**

De nombreux travaux ont été réalisés *in vitro* et *in vivo* avec différentes parties et extraits de *L. acida*. *In vitro*, la fraction enrichie en polyphénols des écorces du tronc a montré des propriétés antihelminthiques et antifongiques (Konaté *et al.*, 2018). Kone *et al.* (2004) ont montré que l'extrait éthanolique des racines possède des activités antibactériennes notamment contre les souches de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, et *Bacillus subtilis*. Les travaux de Akinsinde et Olukoya (1995) ont révélé que, les extraits éthanolique et aqueux de *L. acida* possèdent des activités viricides contre les vibrions cholériques. Les travaux réalisés par Ouattara *et al.* (2011a ; 2011b) ont montré que *L. acida* possède des activités antioxydantes, immunostimulantes et antibactériennes notamment contre la souche *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, agent responsable de la tuberculose. Molander *et al.* (2014) ont montré que, les extraits aqueux et éthanolique de *L. acida* possèdent des activités protéolytiques.

*In vivo*, les études de Etuk *et al.* (2009) ont révélé que l'extrait aqueux des écorces du tronc de *L. acida* est utilisée pour soigner la diarrhée, la dysenterie et le mal d'estomac (Yaoitcha *et al.*, 2015). Owusu et Ofori, (2017) ont montré que l'extrait aqueux des écorces du tronc de *L. acida* aux doses de 30 et 300 mg/kg possède des activités anti-inflammatoires et analgésiques. Des travaux *in vivo* ont montré que *L. acida* possède des propriétés anticonvulsivantes (Imoro *et al.*, 2013) ; hypoglycémiant et antioxydant (Sarwar *et al.*, 2011). Les travaux de Ahmed *et al.* (2010) ont montré que l'extrait au méthanol des écorces du tronc de *L. acida* aux doses de 50, 100, 200 et 400 mg/kg PC possède des propriétés profertilisantes (augmentation du nombre, de la mobilité des spermatozoïdes ainsi que du taux de testostérone sérique) chez les rats de souche Wistar. Tetsassi *et al.* (2019) ont montré que *L. acida* possède des effets curatifs contre la toxicité reproductive masculine induite par l'imidaclopride chez le mâle.

### **I.5.5- Investigations phytochimiques**

Les travaux de Leung *et al.* (1968) ont montré que les feuilles de *L. acida* sont riches en calcium, hydrates de carbone, lipides, protéines et du phosphore inorganique. De nombreuses autres études ont montré que les feuilles, écorces et racines de *L. acida* contiennent des alcaloïdes, des glycosides, des saponines, les phénols, les tannins et les terpénoïdes (Manzo *et al.*, 2017 ; Onoshe *et al.*, 2018). Dans leurs études, Sultana et Ilyas (1986) ont identifié dans l'extrait à l'acétone des feuilles un flavanone nommé 6,7-(2'',2''-dimethyl chromeno) -8- $\gamma\gamma$ ,  $\gamma$ -dimethyl allyl flavanone 1. Muhaisen, (2013) a isolé des écorces du tronc quatre composés polyphénoliques nommés : 6,7-(2'',2''-dimethyl chromeno) -8-g, g-dimethyl allyl flavanone 1 ; 3',4'-dihydroxy-7,8(2'',2''- dimethyl chromeno) -6-g, g dimethyl allyl flavonol ; 7-methyltectorigenin et l'Irisolidone.



**CHAPITRE II**  
**MATERIEL ET METHODES**

## **II.1- MATERIEL**

### **II.1.1- Matériel végétal**

Les écorces du tronc de *Lannea acida* ont été récoltées à Moutourwoua (Extrême Nord, Cameroun) le 11 juillet 2017. La plante localisée aux coordonnées géographiques de N10° 12,681', et E0 14° 11,623' à l'aide d'un GPS de marque "ESTREX" a été authentifiée à l'Herbier National du Cameroun (HNC-IRA, Cameroun) par Mr NANA en comparaison avec un spécimen déposé au numéro de référence N°40942/ HNC.

### **II.1.2- Animaux expérimentaux**

Les animaux utilisés dans cette étude étaient des rates albinos de souche Wistar, âgées entre 10 et 12 semaines et pesant en moyen 200 g. Elles ont été élevées dans l'animalerie du Laboratoire de Physiologie Animale, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé I (Cameroun). Elles ont été soumises à un cycle d'éclairage naturel (12 h jour/12h nuit) et à une température ambiante. Les rates avaient un accès libre à l'eau et à un régime alimentaire composé de : farine de maïs (36,7%), farine d'os (14,5%), farine de blé (36,6 %), farine de poisson (4,8 %), tourteaux de palmiste (7,3%), chlorure de sodium (0,3%), complexe vitaminiq (vitamine D<sub>3</sub>, vitamine A, vitamine E) (Olivitazol, 0,01%). Toutes les expérimentations *in vivo* ont été réalisées suivant les lignes directrices 86/609/CEE de l'Union Européenne (UE) adoptées par le Comité National d'Ethique du Cameroun (CNEC) du Ministère de la Recherche Scientifique et Technologique de l'Innovation du Cameroun (Reg. Numéro : FWA-IRD0001954).

### **II.1.3- Lignées cellulaires**

Les lignées cellulaires suivantes ont été utilisées dans ce travail :

#### ➤ **Lignée cellulaire MCF-7**

La lignée cellulaire MCF-7 provenant de l'adénocarcinome des cellules mammaires exprimant des récepteurs aux œstrogènes a été obtenue de la banque des cellules de l'Université Fédérale de Rio de Janeiro au Brésil.

#### ➤ **La lignée cellulaire HEK293T**

La lignée cellulaire embryonnaire du rein humain 293T (HEK293T) contenant l'antigène SV40 a été obtenu de ATCC (Centre Globale de Bioressources, Australie).

### **II.1.4- Substances pharmacologiques**

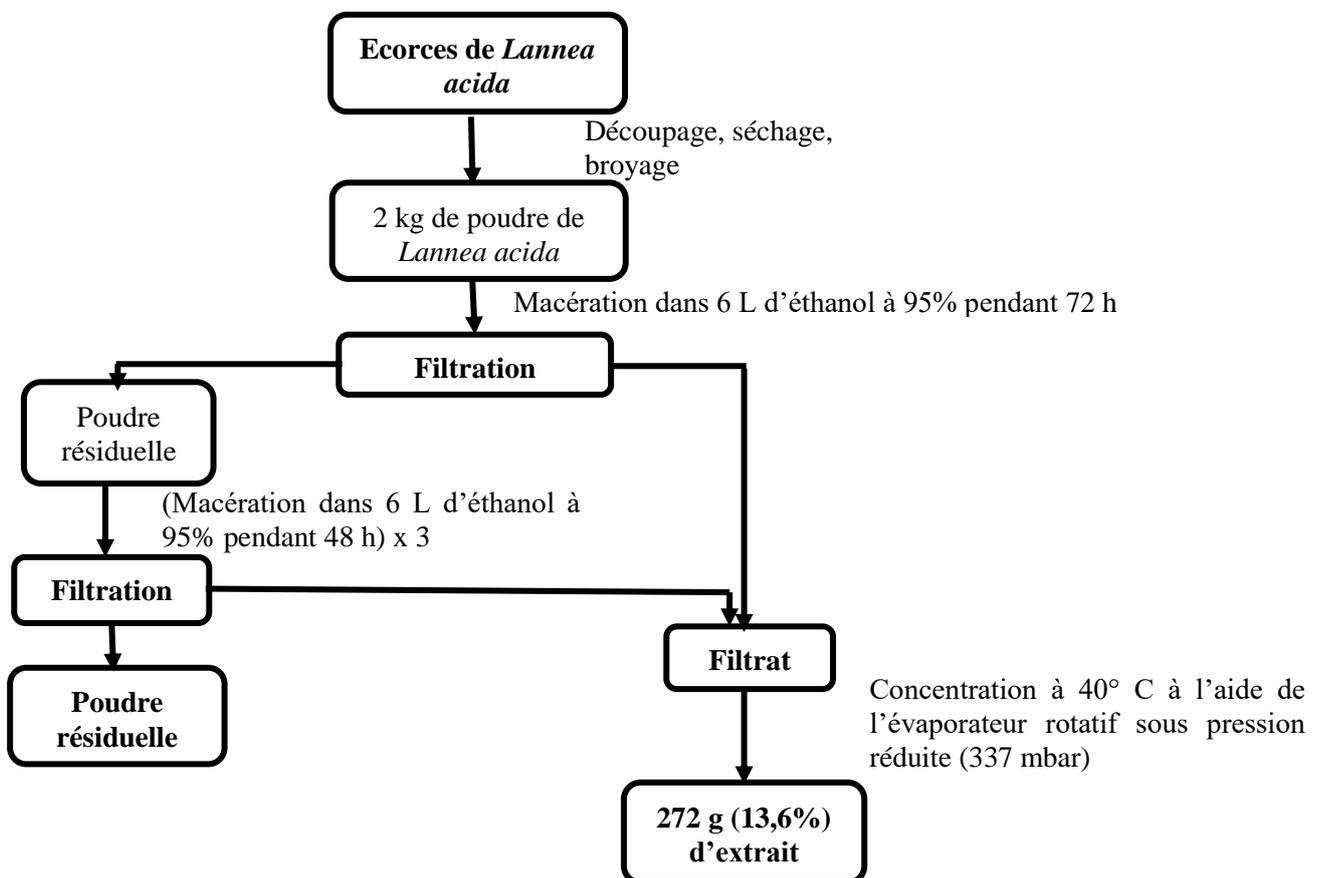
Le 17β-œstradiol Valérate (E<sub>2</sub>V) (Progynova® 2 mg), fabriqué par Delpharm (Lille, France), a été acheté en pharmacie. Le Fulvestrant (ICI 182,780) et l'œstradiol benzoate (Estr-1,3,5(10) -trien-3,16α,17β-triol) ont été fournis par Sigma-Aldrich (Hambourg, Allemagne).

Les deux sous-types de récepteurs aux œstrogènes humains alpha (ER $\alpha$ ) et beta (ER $\beta$ ), de même que l'œstradiol fluorescent ES<sub>2</sub> ont été fournis par Invitrogen® (Sydney, Australie).

## II.2- METHODES

### II.2.1- Protocole d'extraction de la plante

Les écorces du tronc de *L. acida* ont été découpées, séchées à l'ombre et broyées. En suite, 2000 g de poudre ont été macérés pendant 72 h dans 6 L d'éthanol à 95%. La solution obtenue a été filtrée à l'aide du papier Whatman numéro 4. La poudre résiduelle a été à nouveau macérée dans 6 L d'éthanol pendant 48 h. La procédure a été répétée trois fois sur la même poudre. Les filtrats obtenus ont été concentrés à l'évaporateur rotatif sous pression réduite (337 mbar à 40°C). Un total de 272 g d'extrait a été obtenu, soit un rendement de 13,6 % et conservé à 4°C (Figure 10).

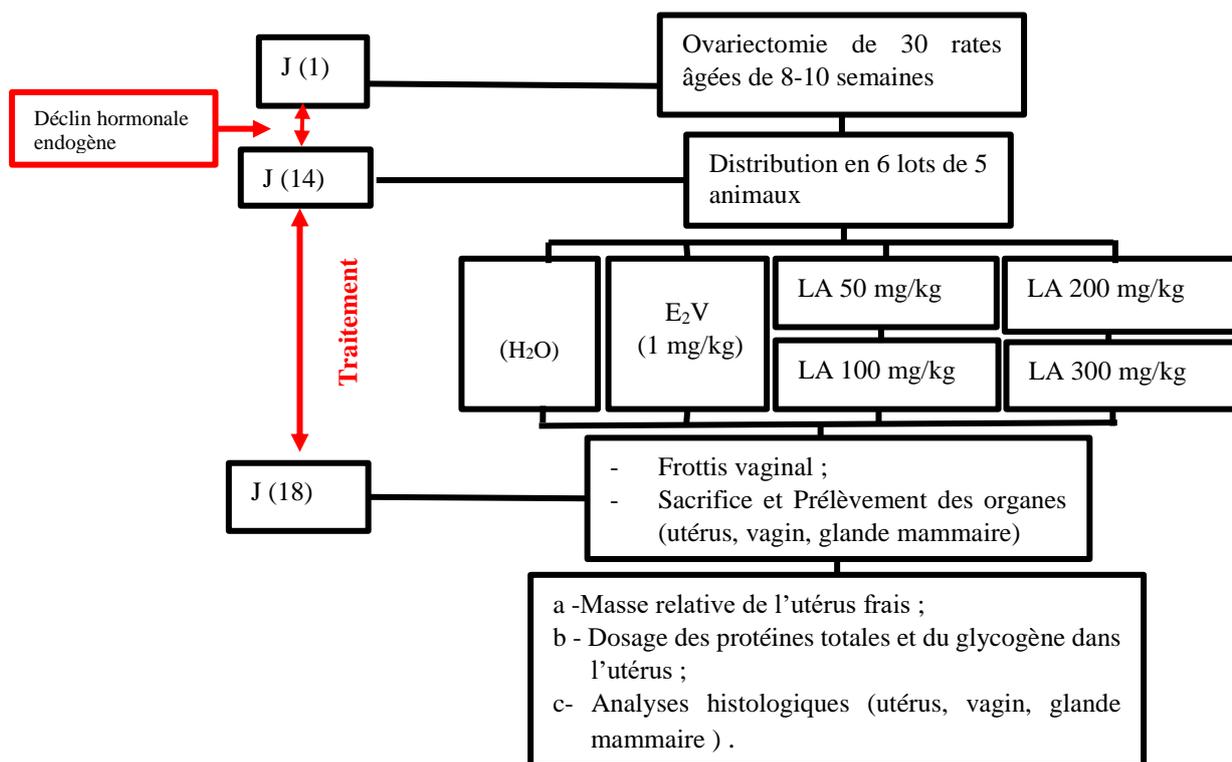


**Figure 10** : Protocole d'extraction à l'éthanol des écorces du tronc de *Lannea acida*

### II.2.2- Evaluation de l'effet œstrogénique *in vivo* de l'extrait éthanolique de *L. acida* chez la rate

Le test utéro-trophique a été réalisé suivant la recommandation de l'OCDE (2007). Trente (30) rates âgées d'environ 10 semaines ont été ovariectomisées par l'approche dorsale (Lane *et al.*, 2003). Quatorze jours après ovariectomie, temps nécessaire pour observer le déclin

d'œstrogènes endogènes (OCDE,2007), les animaux ont été répartis en 6 groupes de cinq (5) animaux chacun et traités par voie orale entre (15h et 16h) pendant trois jours (3 jours) comme suit : le groupe 1 (OVX), servait de témoin négatif et a reçu de l'eau distillée, le groupe 2, servait de témoin positif et a reçu l'œstradiol valérate (Progynova®) à la dose de 1 mg/kg PC, les quatre derniers groupes, ont été traités à l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses respectives de 50, 100, 200 et de 300 mg/kg PC, respectivement. Ces doses ont été obtenues à partir des travaux de Ahmed *et al.*, (2010). Vingt-quatre heures (24h) après la dernière administration des substances, un jeûne nocturne non hydrique (de 12h) a été imposé aux animaux. Le frottis vaginal a été réalisé et tous les animaux ont été sacrifiés sous anesthésie [kétamine (10 mg/kg PC, *ip*) /valium (15 mg/kg PC, *ip*)]. La glande mammaire (GM), le vagin et l'utérus ont été aussitôt prélevés. L'utérus a été pesé et une portion des cornes utérines de tous les animaux a été prélevée, pesée et broyée dans du tampon phosphate (0,1 M, pH 7,5) à l'aide du porter téflon sur un bac de glace en vue de préparer les homogénats (Figure 11).



**Figure 11** : Protocole expérimental d'évaluation des propriétés œstrogéniques de l'extrait éthanolique de *L. acida*.

OVX = animaux ovariectomisés, H<sub>2</sub>O = eau distillée ; E<sub>2</sub>V = œstradiol valérate à la dose de 1mg/kg ; LA = extrait éthanolique de *Lankea acida* administré aux doses de 50, 100, 200 et de 300 mg/kg PC.

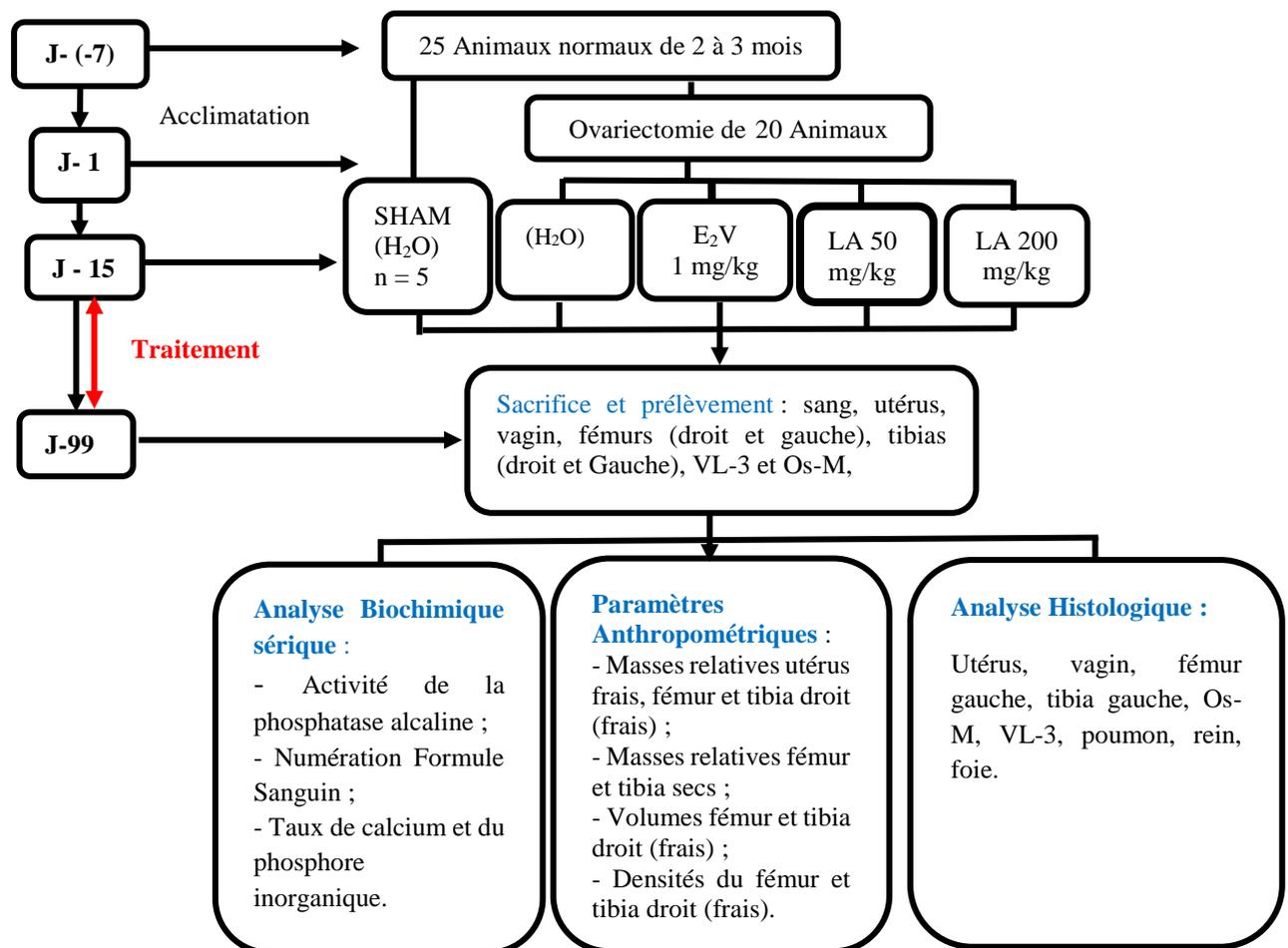
Après centrifugation à 3000 trs /min pendant 15 minutes, les surnageants ont été prélevés, puis introduit dans les tubes secs et conservés à -20 °C pour le dosage du taux de

protéine totale et de glycogène dans l'utérus. Tous les organes prélevés (utérus, vagin et glande mammaire) ont été fixés dans du formol à 10% pour les analyses histologiques

### **II.2.3- Evaluation des effets préventifs de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur un modèle d'ostéoporose induite par l'ovariectomie chez la rate**

Pour cette expérience, 25 rates âgées de 10 à 12 semaines ont été utilisées. Après 7 jours d'acclimatation, 20 rates ont été ovariectomisées le premier jour de l'expérimentation, en utilisant l'approche dorsale (Lane *et al.*, 2003) et 5 autres ont subi une chirurgie dorsale (blanche). Quatorze (14) jours après, temps nécessaire pour le déclin hormonal endogène (OCDE, 2007), les animaux ont été répartis en 5 groupes de cinq animaux chacun et soumis à un traitement oral (16h et 17h) quotidien pendant 12 semaines de la manière suivante : le groupe Sham servant de témoin normal et le groupe OVX servant de témoin négatif ont reçu de l'eau distillée (2 mL/kg PC). Le groupe 3 (E<sub>2</sub>V), servait de témoin positif et a reçu l'œstradiol valérate à la dose de 1 mg/kg PC. Les deux derniers groupes ont reçu l'extrait éthanolique de *L. acida* respectivement aux doses de 50 et de 200 mg/kg PC (doses ayant montré des meilleurs effets œstrogéniques). Le suivi de l'évolution pondérale des rates s'est fait hebdomadairement. Vingt-quatre heures après le dernier traitement, un jeûne nocturne non hydrique (de 12 h) a été imposé aux animaux, qui ont par la suite été sacrifiés sous anesthésie [kétamine (10 mg/kg PC, *ip*) et valium (15 mg/kg PC, *ip*)]. Le sang artéro-veineux a été recueilli dans deux types de tubes : une partie a été introduite dans les tubes secs et centrifugée à 3000 trs /min pendant 15 minutes et les séra collectés ont été conservés à -20°C dans les tubes secs en vue des analyses biochimiques (taux de calcium, du phosphore inorganique, et l'estimation de l'activité de la phosphatase alcaline. L'autre partie du sang a été recueillie dans les tubes contenant un anticoagulant (EDTA) en vue de l'analyse hématologique. Les fémurs (droit et gauche), les tibia (droit et gauche), la vertèbre lombaire numéro trois (VL-3), l'os mandibulaire (Os-M), l'utérus et le vagin ont été prélevés. Les masses des utéri, du tibia droit et du fémur droit à l'état frais ont été déterminées et leurs masses relatives calculées. Les utéri, vagins, l'Os-M, VL-3, le tibia gauche et fémur gauche ont été fixés dans le formol 10%, pour analyses histologiques. Le fémur droit, la VL-3 et l'Os-M [prélevé au niveau du septum inter-radiculaire de la deuxième molaire tel que décrit par Lucinda *et al.* (2010)], après une semaine de fixation dans du formol à 10%, ont été décalcifiés dans l'acide nitrique à 10% pendant 24 h et fixés de nouveau dans du formol 10% tel que recommandé par Cannet, (2006), pour des analyses histologiques ultérieures. Les volumes du tibia droit et du fémur droit ont été mesurés à l'aide d'un Pléthysmomètre (model 7150 Ugo Basile, Italie) et leurs densités minérales calculées à partir de la formule : densité =

(masse de l'os frais (kg)  $\times$  1000 (kg/mm<sup>3</sup>) / volume de l'os (mm<sup>3</sup>) (Yoon-Bok *et al.*, 2004). Après évaluation de ces paramètres, les os ont été séchés à l'étuve à ventilation à 110 °C pendant 48 h et pesés de nouveau pour obtenir la masse sèche des os. Ces os ont été incinérés à l'étuve à 200 °C puis broyés. La poudre obtenue a été dissoute dans de l'eau déionisée (0,5 g pour 2 mL) et conservée à -20°C en vue d'estimer les taux de calcium et du phosphore inorganique dans les os (Figure 12).



**Figure 12 :** Protocole expérimental d'évaluation des effets préventifs de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur un modèle d'ostéoporose post-ovariectomie chez la rate Wistar.

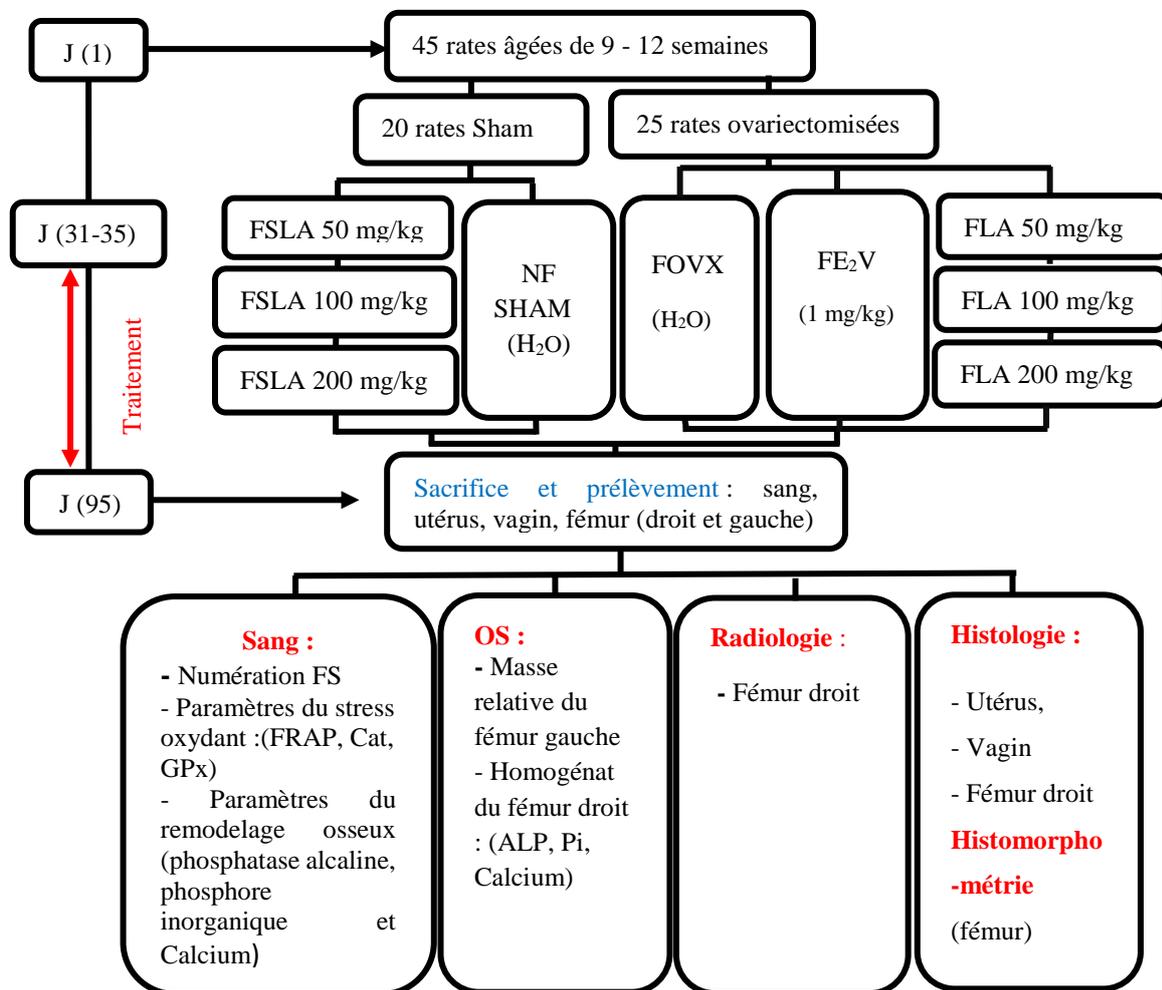
Os-M = os mandibulaire ; VL-3 = vertèbre lombaire numéro 3 ; OVX= animaux ovariectomisés ; H<sub>2</sub>O = eau distillée ; SHAM= chirurgie blanche ; E<sub>2</sub>V = œstradiol valérate ; LA = extrait éthanolique de *Lannea acida* aux doses de 50 et de 200 mg/kg PC.

#### II.2.4- Evaluation des effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur la cicatrisation de la fracture fémur chez la rate Wistar

Les rates matures (45), âgées d'environ 12 semaines et pesant de 190 à 210 g ont été utilisées. Après sept jours d'acclimatation, les animaux ont été répartis en deux groupes. Le premier groupe était constitué de 20 rates, qui ont subi une chirurgie blanche (Sham) et ont été

réparties en 4 groupes de cinq animaux chacun. Le deuxième groupe comptait 25 rates qui ont été ovariectomisées en utilisant l'approche dorsale (Lane *et al.*, 2003) et distribuées en 5 groupes de cinq animaux chacun. Après 30 jours, temps nécessaire pour induire l'ostéoporose sur le fémur de la rate après ovariectomie bilatérale (Yousefzadeh *et al.*, 2020), la fracture a été induite à l'extrémité supérieure du fémur de la patte postérieure droite de tous les animaux exceptés ceux du groupe Sham (ayant reçu de l'eau distillée) tel que décrit par Ngueguim *et al.* (2017) : [Après anesthésie à l'aide de la kétamine (10 mg/kg PC, *ip*) et du valium (15 mg/kg PC, *ip*), une incision longitudinale (1 cm) a été réalisée à l'aide d'un bistouri respectivement sur la peau et les muscles de la cuisse. Les muscles ont été ensuite dégagés et la surface osseuse bien exposée. À l'aide d'une perceuse électrique portant une mèche (2 mm de diamètre), un trou a été réalisé à l'extrémité supérieure du fémur. Après cette opération les muscles et la peau ont été fermés à l'aide des files résorbables compartiment par compartiment]. Les animaux ont été en suite traités à la gentamicine *per os* (70 mg/ kg PC) et observés pendant quatre jours à cause de la douleur provoquée au cours de la fracturation. Au jour 35, les animaux ont été soumis à un traitement quotidien (par gavage, entre 16 h et 17 h) pendant huit semaines consécutives (Mélania *et al.*, 2014). Les animaux du premier groupe (animaux Sham-fracturés) ont été traités comme suit : Les lots I, II et III ont reçu l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses respectives de 50, 100 et de 200 mg/kg PC. Le dernier groupe ayant servi de témoin non fracturé (NF-SHAM) a reçu de l'eau distillée. Les animaux du deuxième groupe ont été traités comme suit : animaux ovariectomisés et fracturés (FOVX) servant de témoin négatif ont reçu de l'eau distillée (lot I), les animaux ovariectomisés et fracturés du lot II ont reçu l'œstradiol valérate (FE<sub>2</sub>V) à la dose de 1 mg/kg (témoin positif) et les trois derniers lots tests (III, IV et V) étaient des animaux ovariectomisés et fracturés ayant reçu l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses respectives de 50, 100 et de 200 mg/kg PC. Le suivi de l'évolution pondérale des rates s'est fait de manière hebdomadaire. Vingt-quatre heures après la dernière administration des substances, les animaux ont été soumis à un jeûne non hydrique (12 h), et ont été sacrifiés sous anesthésie [kétamine (10 mg/kg PC, *ip*) et valium (15 mg/kg PC, *ip*)]. Le sang artéro-veineux a été recueilli dans deux types de tubes : Une partie a été récupérée dans les tubes contenant l'anticoagulant EDTA en vue de l'analyse hématologique. L'autre partie a été recueillie dans les tubes secs. Après centrifugation à 3000 trs /min pendant 15 minutes les surnageants (séras) ont été prélevés et conservés à - 20°C pour des analyses biochimiques [(taux de calcium, de phosphore inorganique, de l'estimation de l'activité de la phosphatase alcaline) et de quelques paramètres du stress oxydant [pouvoir antioxydant total (FRAP), les activités de la catalase et de la Glutathion peroxydase]. Les fémurs (droit et gauche), l'utérus et le vagin ont

été prélevés. Les masses relatives des utéri et du fémur gauche (à l'état frais) ont été déterminées. L'utérus, le vagin et le fémur droit ont été fixés dans du formol 10%, pour analyses histologiques (Figure 13).



**Figure 13** : Protocole d'évaluation des effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur la cicatrisation de la fracture fémur chez la rate Wistar

FOVX = animaux ovariectomisés et Fracturés, H<sub>2</sub>O = eau distillée, FE<sub>2</sub>V = animaux OVX fracturés et traités à l'œstradiol valérate à la dose de 1 mg/kg ; NFSham = animaux non ovariectomisés et non fracturés recevant de l'eau distillée ; FLA = animaux OVX fracturés et traités à l'extrait éthanolique de *Lannea acida* aux doses de 50 ,100 et 200 mg/kg PC ; FSLA = animaux normaux, fracturés et recevant l'extrait éthanolique de *L. acida* aux respectives de 50,100 et de 200 mg/Kg PC. FRAP= capacité antioxydante totale ; CAT= catalase ; GPx= glutathion peroxydase ; ALP= alcaline phosphatase.

Les fémurs droits des animaux après avoir séjourné une semaine dans du formol à 10%, ont été retirés et leur radiographie réalisée. Ils ont été ensuite décalcifiés dans l'acide nitrique à 10% pendant 24 h (Cannet, 2006) pour les analyses histologiques ultérieures. Le fémur gauche de chaque animal a été séché à l'étuve (à 110°C), puis pesé et broyée et la poudre obtenue a été

dissoute dans de l'eau déionisée (0,5 g pour 2 mL). La solution finale a été centrifugée (à 3000 trs /min pendant 15 minutes) et les surnageants ont été prélevés et conservés dans les microtubes Eppendorf à -20°C en vue des dosages des taux de calcium, du phosphore inorganique, de l'activité de la phosphatase alcaline osseuse et de certains paramètres du stress oxydatif tels que la catalase, la glutathion peroxydase et la capacité antioxydante totale (FRAP)

### **II.2.5-Evaluation *in vivo* et *in vitro* des effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur les récepteurs aux œstrogènes**

Dans le souci de mettre en évidence les possibles modes d'actions cellulaires, l'extrait éthanolique de *L. acida* a été testé *in vitro* sur des lignées cellulaires MCF-7 et HEK293T en culture.

#### **II.2.5.1- Cultures cellulaires**

##### **➤ Culture des cellules MCF-7**

Les cellules MCF-7 ont été cultivées dans un milieu de culture RPMI-1640 supplémenté avec du sérum bovin Fœtal (FBS) à 10%, de la pénicillium 100 U/mL, de la streptomycine à 100 µg/mL et du tampon HEPES à 10 mM. La culture cellulaire a été réalisée à une température maintenue à 37°C dans le CO<sub>2</sub> à 5% d'humidité atmosphérique et à un pH 7,4. Tous les deux jours, environ 90% de surnageant étaient remplacés. La viabilité cellulaire (minimum 95%) a été vérifiée au début de l'expérience par la méthode de "Trypan Blue" (Zingué *et al.*, 2017).

##### **➤ Cultures des cellules HEK293T et transfection des récepteurs aux œstrogènes**

La culture des cellules embryonnaires du rein humaine 293T (HEK293T) a été réalisée dans un milieu stérile sous une hotte à flux laminaire, sous une atmosphère de 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C avec 80% d'humidité dans un incubateur à CO<sub>2</sub> de marque "Thermo Scientific" (Melbourne, Australie). Les cellules ont été cultivées de façon routinière dans des boîtes de pétri en plastique de 75 cm<sup>2</sup> contenant en moyenne 15 mL de milieu de culture RPMI-1640.

Les cellules HEK293T ont été transfectées de manière stable avec le plasmide du récepteur  $\alpha$  ou celui du récepteur  $\beta$  (cellules HEK293T-ER $\alpha$  ou HEK293T-ER $\beta$ ) et un plasmide d'expression portant l'élément de réponse aux œstrogènes couplé à un plasmide rapporteur de la luciférase ((ERE)<sub>2</sub>-tk-Luc) gracieusement fourni par le Dr. Simon Chu (Institut de recherche médical Hudson, Melbourne, Australie) et un plasmide rapporteur de la  $\beta$ -galactosidase utilisant la lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, C A, U.S.A.).

### **II.2.5.2- Test de Viabilité cellulaire *in vitro***

Le test de résazurine est basé sur le fait que toute cellule vivante possède une activité mitochondriale alors qu'il n'en est pas de même pour les cellules mortes. Le test de viabilité cellulaire en présence de l'extrait de *L. acida* a été effectué sur les cellules de l'adénocarcinome mammaire MCF-7 et sur les cellules embryonnaires du rein humain HEK293T par la méthode de "Alamar Blue". Techniquement, les différentes cellules ont étéensemencées (environ 10000 cellules) dans une microplaque de 96 puits dans un volume de 100 µL de véhicule. Elles ont été incubées pendant 24 heures pour permettre leur adhésion au support. Ces cellules ont été traitées comme suit : Le groupe I (témoin) a reçu le DMSO (solvant dans lequel l'extrait a été préparé) à une concentration de 0,01%. Les autres groupes (II, III, IV, V et VI) servant de groupes tests ont été traités à l'extrait éthanolique de *L. acida* à des concentrations respectives de 0,1, 1, 10,100 et de 200 µg/mL. Le traitement a duré 24 h. La CC50 (concentration nécessaire pour réduire le nombre de cellules de 50%) a été déterminée par analyse de la régression non linéaire du logarithme de concentration en fonction de la réponse normalisée (pourcentage de viabilité cellulaire) à l'aide du logiciel graph Pad Prism 5.0. Chaque expérience a été effectuée en triplicata et répétée trois fois.

### **II.2.5.3- Evaluation *in vitro* de l'activité œstrogénicité/antiœstrogénique de l'extrait éthanolique de *L. acida***

L'évaluation de l'activité œstrogénique/antiœstrogénique de l'extrait éthanolique de *L. acida* a été réalisée sur les cellules MCF-7 par la méthode "*E-Screen*". Le test "*E-Screen*" est un test qui consiste à mesurer l'effet d'une substance sur la prolifération des cellules cancéreuses du sein (ERα<sup>+</sup>) œstrogénosensibles (Soto *et al.*, 1995). Dans le milieu de culture RPMI-1640 supplémenté avec le sérum fœtal bovin à 10%, environ 50000 cellules ont été introduites dans chaque puit, d'une plaque de 24 puits. Ensuite, la trypsine a été ajoutée dans les puits pour permettre l'adhésion des cellules à la paroi. Après 24 h d'incubation à 37°C, à 5% de CO<sub>2</sub> et pH 7,4, les cellules ont été lavées avec une solution de tampon phosphate saline et le sérum de remplacement (0,5 × 2) contenant du rouge phénol a été ajouté dans chaque milieu de culture. Dans le volume final de chaque puit, la concentration du DMSO était de 0,01%.

Pour évaluer l'activité œstrogénique, le stock de l'extrait éthanolique de *L. acida* [(100 mg/mL) préparée dans le DMSO] a été ajouté dans les différents milieu de culture à des concentrations croissantes de 0,1, 10, 100 à 200 µg/mL finale. Les cellules traitées avec le

DMSO (0,01%) ont servi de témoin normal et d'autres traitées à la quercétine (10 nM) ou avec le 17 $\beta$ -œstradiol (10 nM) ont servi de témoins positifs.

Pour évaluer l'activité antiœstrogénique, le 17 $\beta$ -œstradiol à la concentration de 10 nM a été associé à l'extrait éthanolique de *L. acida* à des concentrations croissantes (0,1, 10, 100 et 200  $\mu$ g/mL) ont été ajoutés dans chaque puits, avant incubation des cellules. L'expérience a été stoppée après 144 h d'incubation par retrait du milieu de culture, fixation des cellules avec l'acide trichloroacétique (10%) et incubation à 4°C pendant 1 h. Par la suite, les cellules ont été lavées (4 fois) avec de l'eau du robinet puis séchées et en fin colorées avec le sulforhodamine-B (SRB) 0,057% (m/v) dissoute dans l'acide acétique pendant 30 min. Le colorant ainsi lié a été solubilisé avec une base (Tris) 10 mM à un pH 10,5 et les absorbances ont été lues dans un lecteur ELISA Biotek EL800 (Winooski, USA) à 510 nm. Les résultats de l'activité œstrogénique ont été exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard sur la moyenne des effets prolifératifs (EP) calculés selon la formule suivante : EP = nombre totale des cellules dans les groupes tests / Nombre des cellules des groupes contrôle (Schiliro *et al.*, 2011). L'activité anti-œstrogénique des groupes essais a été déterminée comme étant les effets prolifératifs relative (EPR%). La prolifération cellulaire dans les puits tests induite par *L. acida* a été comparée à celle induite par le 17 $\beta$ -œstradiol. EPR% = [EP des échantillons / EP du 17 $\beta$ -œstradiol] x 100 tel que décrit par Resende *et al.* (2013).

#### **II.2.5.4- Evaluation *in vitro* des effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur les deux sous-types de récepteurs aux œstrogènes $\alpha$ et $\beta$**

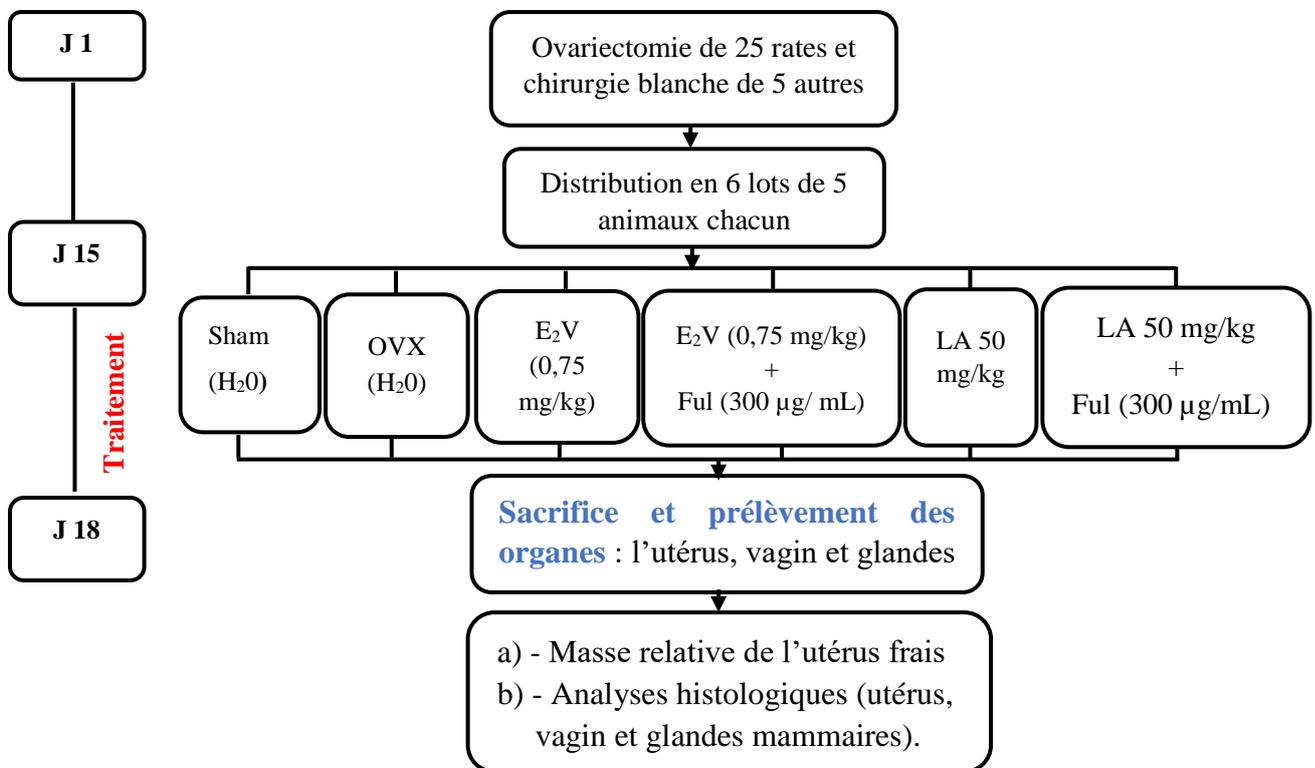
L'habilité de l'extrait éthanolique de *L. acida* à activer les récepteurs aux œstrogènes (ER $\alpha$  et ER $\beta$ ) a été évaluée sur la lignée cellulaire embryonnaire du rein humaine (HEK 293T) contenant l'antigène SV40 et transfectée de manière stable avec le plasmide du récepteur  $\alpha$  ou celui du récepteur  $\beta$ . Ces cellules ont été traitées pendant 24 heures à l'extrait éthanolique de *L. acida* à des concentrations de 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-2</sup> et 10<sup>-1</sup>  $\mu$ g/mL. Les cellules traitées uniquement avec l'E<sub>2</sub>B ont servi de témoin positif

Dans le but d'évaluer l'activité antiœstrogénique ou antagoniste de l'extrait, les différentes substances de traitement ont été respectivement combinées à l'E<sub>2</sub>B à la dose de 10 nM (HEK293T-ER $\alpha$ ) ou 10 nM (HEK293T -ER $\beta$ ) pendant 24 h. Le control positif du test antiœstrogénique était constitué des cellules cotraitées à l'E<sub>2</sub>B et au fulvestrant (anti-œstrogène pur) à la dose de 300  $\mu$ g/mL. Ce test a été réalisé à l'aide d'un kit commercial (Promega®, Australie) en suivant les instructions du fabricant. L'activité de la luciférase a été mesurée et normalisée contre l'activité de la  $\beta$ -galactosidase, déterminée en utilisant la 2-nitrophenyl  $\beta$ -D-

galactopyranoside (ONPG). Chaque expérimentation a été réalisée en triplicata et répétée trois fois.

### II.2.5.5- Evaluation *in vivo* des effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* en présence d'un antagoniste (le fulvestrant)

Vingt-cinq (25) rates âgées d'environ 9 semaines ont été ovariectomisées en utilisant l'approche dorsale (Lane *et al.*, 2003) et cinq (5) autres ont subi une chirurgie blanche. Quatorze jours après ovariectomie (temps nécessaire pour observer le déclin d'œstrogènes endogènes) (OCDE,2007), les animaux ont été distribués en 6 groupes de cinq (n= 5) animaux chacun et traités entre 16 h et 17 h pendant trois jours. Les groupes I et II servant respectivement de témoin normal (SHAM) et de témoin négatif (OVX) ont reçu de l'eau distillée (Figure 14).



**Figure 14 :** Protocole d'évaluation *in vivo* des effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* en présence d'un antagoniste (le fulvestrant)

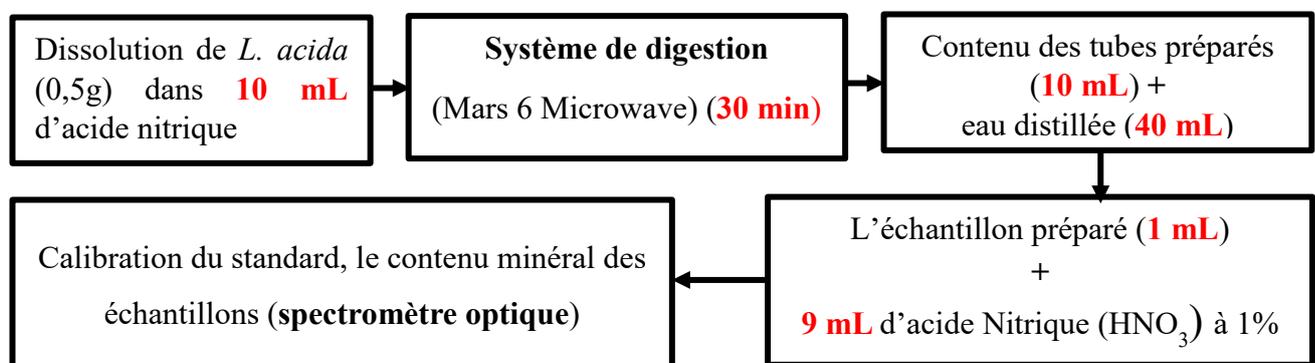
H<sub>2</sub>O = eau distillée, Sham = animaux ayant subi une chirurgie blanche et ayant reçu de l'eau distillée, OVX = animaux ovariectomisés, recevant de l'eau distillée, E<sub>2</sub>V = animaux OVX ayant reçu le 17 β-œstradiol à la dose de 0,75 mg/kg PC ; Ful = animaux OVX, ayant reçu le fulvestrant (ICI 182, 780) à la concentration de 300 µg/mL ; E<sub>2</sub>B + Ful = animaux OVX, cotraités avec l'œstradiol valérate à la dose de 0,75 mg/kg et le fulvestrant (ICI 182, 780) à la concentration de 300 µg/mL ; LA 50 = animaux OVX, ayant reçu l'extrait éthanolique de *L. acida* à la dose de 50 mg/kg PC ; LA50 + Ful = animaux OVX, cotraités avec l'extrait éthanolique de *L. acida* à la dose de 50 mg/kg PC et le fulvestrant (ICI 182, 780) à la concentration de 300 µg/mL.

Le groupe III servant de témoin positif a reçu l'œstradiol valérate (Progynova®) à la dose de 0,75 mg/kg PC, le groupe IV a reçu l'E<sub>2</sub>V (0,75 mg/kg PC) et le fulvestrant (ICI 182, 720) à la dose de 300 µg/mL. Le groupe V a reçu l'extrait éthanolique de *L. acida* à la dose de 50 mg/kg PC (la plus petite dose ayant montré des effets œstrogéniques probants) et le dernier groupe (groupe VI) a reçu l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 50 mg/kg PC et le fulvestrant à la dose de 300 µg/mL. A l'exception du fulvestrant qui a été administré par voie sous cutanée, les autres substances ont été administrées par voie orale. Vingt-quatre heures après la dernière administration des substances, un jeûne nocturne non hydrique de 12 h a été imposé aux animaux, qui ont par la suite été sacrifiés par dislocation cervicale. La glande mammaire (GM), le vagin et l'utérus ont été prélevés. Les utéri ont été pesés et leur masse relative a été calculée. Tous les organes prélevés (utérus, vagin et glande mammaire) ont été fixés dans du formol à 10% pour les analyses histologiques ultérieures

## II.2.6- Caractérisation phytochimique de l'extrait éthanolique de *L. acida*

### III.2.6.1- Détermination de la composition minérale de l'extrait éthanolique de *L. acida*

La détermination des constituants minéraux (calcium, magnésium, potassium, sodium et phosphores) dans l'extrait éthanolique de *L. acida* a été réalisée dans le Centre d'Analyse de la Faculté des Sciences de l'Université de Johannesburg (Afrique du Sud). L'extrait éthanolique de *L. acida* a été pesé et 0,5 g d'extrait a été introduit dans chaque tube de digestion contenant au préalable 10 mL d'acide nitrique (HNO<sub>3</sub>). Ces tubes ont été ensuite placés dans le système de digestion MARS 6 microwave (CEM Matthew, USA) pendant 30 minutes et leur contenu complété à 50 mL par ajout d'eau déionisée (40 mL). Après cette étape, 1 mL de chaque tube préparé a été prélevé et introduit chacun dans un tube de 15 mL et le volume complété à 10 mL par ajout de l'acide nitrique (HNO<sub>3</sub>) à 1%. En fin, le contenu minéral des échantillons a été déterminé à l'aide du spectrophotomètre (SPECTRO Analytical Instruments, Germany) (Figure 15).



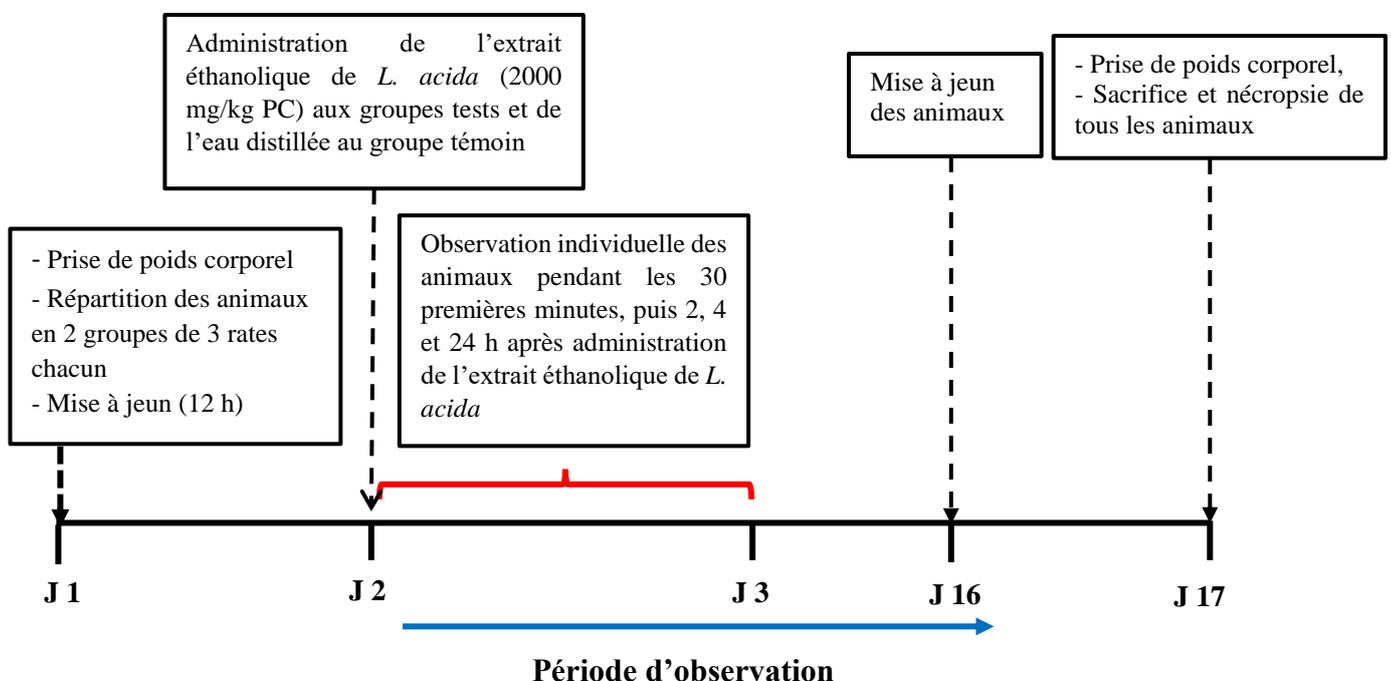
**Figure 15** : Protocole de détermination de la composition minérale de l'extrait éthanolique de *L. acida*.

## II.2.6.2- Détermination de la concentration en polyphénols totaux et en flavonoïdes dans l'extrait éthanolique de *L. acida* et de l'activité antiradicalaire *in vitro*

La détermination de la concentration en polyphénols totaux et en flavonoïdes dans l'extrait éthanolique de *L. acida* a été effectuée suivant les méthodes décrites respectivement par Singleton et Rossi, (1999) et Zhishen *et al.* (1999). Le potentiel antioxydant *in vitro* de l'extrait a été déterminé par la méthode « *Ferric Reducing Antioxydant Power* » (FRAP) décrite par Benzie et Strain, (1996) et l'activité antiradicalaire 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) de l'extrait de *L. acida* suivant le protocole décrit par Katalinié *et al.* (2003). Les différents dosages ont été effectués en triplicata et les standards utilisés étaient la quercétine (pour les polyphénols totaux et flavonoides) et l'acide gallique (pour l'activité antiradicalaire DPPH).

## II.2.7- Evaluation de la toxicité orale aiguë de l'extrait éthanolique de *Lannea acida*

La toxicité aiguë par voie orale de l'extrait éthanolique de *L. acida* a été évaluée chez la rate suivant la méthode du protocole de l'OCDE, ligne directrice n° 423 pour les essais des substances chimiques (méthode par classe de toxicité aiguë) adoptés le 17 décembre 2001 (OCDE, 2001a). Six (6) rates saines, âgées d'environ 10 semaines et de masse corporelle moyenne  $130 \pm 10$  g ont été réparties en deux groupes de trois rates chacun. Elles ont été soumises à un jeûne non hydrique pendant la nuit précédant l'administration des substances (Figure 16).



**Figure 16** : Evaluation de la toxicité aiguë par voie orale de l'extrait éthanolique de *L. acida* selon la ligne directrice n° 423 de l'OCDE, (2001).

Après la période de jeûne, les animaux ont été pesés et le groupe témoin a été traité avec de l'eau distillée tandis que le groupe test recevait l'extrait éthanolique de *L. acida* à la dose de 2000 mg/kg PC (Figure 16). Après l'administration des différentes substances, les animaux ont été de nouveau privés de nourriture pendant 3 à 4 heures et ont été observés individuellement au moins une fois pendant les premières 30 minutes, puis, 2, 4 et 24 heures, avec une attention particulière pendant les 4 premières heures. Ils ont été ensuite observés quotidiennement pendant 14 jours après l'administration des substances. La prise du poids corporel s'est faite tous les 3 jours. Les signes cliniques de toxicité portaient sur la respiration, les observations des modifications au niveau du comportement, de la peau, des poils, des yeux et de l'activité somato-motrice. L'attention a été aussi portée sur les observations éventuelles de convulsion, salivation, diarrhée et la mortalité. Au 15<sup>e</sup> jour, les animaux ont été pesés et sacrifiés sous anesthésie [Kétamine 10 mg/kg PC, *ip* /valium 15 mg/kg PC, *ip*] et soumis à la nécropsie. Les organes (foie, poumons, cœur, estomac, rate, reins et surrénales) ont été prélevés, puis pesés immédiatement et leurs masses relatives ont été calculées. L'histologie du foie, du rein et du poumon a été également effectuée

#### **II.2.8- Frottis vaginal**

Pour réaliser le frottis, 0,5 mL de NaCl 0,9% a été injecté à l'aide d'une micropipette dans le vagin. Ensuite, 10 µL de ce contenu vaginal ont été prélevés à l'aide d'une micropipette puis étalés sur une lame à bord rodé et colorés suivant la méthode de Papanicolaou : [les cellules contenues dans le prélèvement ont subi une fixation humide dans trois bains d'éthanol de degrés décroissants (80°, 70° et 50°), à raison de 30 secondes par bain. Après rinçage à l'eau distillée pendant 30 secondes, les lames ont ensuite séjourné dans l'hématoxyline de Harris pendant 5 minutes. Un rinçage à l'eau de robinet (5 minutes) et à l'eau distillée (30 secondes) a été effectué et les lames ont été introduites dans la solution d'Orange G (OG 6) pendant 90 secondes. Après avoir subi deux bains d'éthanol 95% (2 × 30 secondes), ces lames ont été maintenues dans la solution d'éosine alcoolique 65 (mélange polychrome EA-65) pendant 90 secondes puis, dans des bains successifs d'éthanol 95% (3 × 30 secondes), d'éthanol absolu (1 × 30 secondes), d'éthanol/xylène (1 × 30 secondes) et de xylène (1 × 30 secondes). Ces lames ont enfin été égouttées avant l'observation au microscope (Fortier et Hould, 2003)

#### **II.2.9- Ovariectomie**

Elle consiste en l'ablation des ovaires. La méthode utilisée dans ce travail est celle décrite par Lane *et al.* (2003). Les rates ont été préalablement anesthésiées avec du valium (10 mg/kg PC) et de la kétamine (15 mg/kg PC) administrés par voie intrapéritonéale. Les animaux ont ensuite été placés en décubitus ventral dans un bac à dissection et une petite boutonnière

d'environ un centimètre (1 cm) a été faite sur le dos. A partir de cette ouverture, une légère incision du péritoine a été réalisée de chaque côté de l'abdomen à l'aide d'un ciseau. Les amas de graisse entourant les ovaires ont ainsi été mis en évidence. Les ovaires directement observables ont été séparés des cornes utérines après une ligature effectuée entre la corne utérine et l'ovaire. L'ouverture dorsale et la boutonnière ont ensuite été refermées avec des points de suture au files resorbables.

#### **II.2.10- Prélèvement du sang**

Des échantillons de sang artéro-veineux ont été collectés dans deux types des tubes. Une partie de sang a été introduite dans les tubes étiquetés contenant l'anticoagulant (EDTA) en vue de la numération formule sanguine et une autre partie de sang a été introduite dans des tubes à essai sec au préalable étiquetés. Le sang contenu dans les tubes à essai a été centrifugé à 3000 tr/min pendant 15 minutes à 5°C pour obtention du sérum. Les séra collectés ont été introduits dans les microtubes Eppendorf et ont été conservés à -20°C.

#### **II.2.11- Prélèvement des organes**

Chaque rate a été placée en décubitus dorsal dans un bac à dissection après avoir été sacrifiée. Après excision de la peau, la glande mammaire a été prélevée par cisaillement de la graisse entourant un mamelon. L'ouverture de la cavité abdominale a permis de mettre en évidence tous les organes de la rate. L'utérus a été isolé du vagin en sectionnant au niveau de l'anneau utérin (limite entre les deux organes). Le vagin quant à lui a été isolé en coupant juste au-dessus de l'orifice génital. Le cœur, le foie, les reins, les glandes surrénales, les poumons, la rate, les fémurs (gauche et droit), les tibias (gauche et droit) et la vertèbre lombaire-3 (VL-3) ont également été prélevés. Après prélèvement, le vagin et la glande mammaire ont été immédiatement fixés dans du formol à 10%. Par la suite, une corne utérine, une portion de foie, du rein, de la rate, des poumons ont été introduits dans du formol à 10%. Le fémur droit, quant à lui a séjourné 7 jours dans du formol à 10% après quoi, il a été décalcifié à l'aide de l'acide nitrique à 10% pendant 24 h, avant d'être à nouveau introduit dans du formol à 10% comme décrit par Ateba *et al.* (2013) et Zingue *et al.* (2014).

La masse relative des organes (MR) tels que l'utérus, le fémur (frais et sec) et le tibia (frais et sec), le foie, le rein, la rate, et le poumon a été exprimée en mg/kg de masse corporelle (MC), et calculée suivant la formule :

$$MR \text{ (mg/kg PC)} = \frac{Mo \text{ (mg)}}{MC \text{ (kg)}} \quad \text{avec } Mo = \text{masse de l'organe (mg).}$$

## II.2.12- Techniques histologiques

L'histologie permet la préparation des tissus/organes en vue de leur observation au microscope. Les techniques utilisées sont celles décrites par Cagnet (2004, 2006).

### II.2.12.1- Fixation

La fixation est la première étape et la base de la préparation des tissus en vue de leur observation au microscope. Le but de la fixation est de préserver les cellules et les constituants tissulaires dans un état aussi proche que possible de celui du vivant et de permettre au tissu de passer par les étapes de la technique histologique sans changement ni déformation. Le fixateur utilisé dans cette étude était du formol à 10 %.

La macroscopie s'est déroulée comme suit : les différents organes fixés ont été sectionnés suivant un plan bien défini (transversal ou longitudinal) et disposés dans des cassettes en matières plastiques et étiquetées.

### II.2.12.2- Déshydratation ou circulation

Elle s'est faite en trois étapes :

- **Déshydratation** : La paraffine n'étant pas miscible avec l'eau, les tissus fixés ont été débarrassés de toute trace d'eau avant de pouvoir être inclus. Pour ce procédé, 8 bacs d'alcool ont été utilisés successivement à raison de 2 heures dans chaque bac dans l'ordre ci-après : 1 bac d'éthanol à 80% (1 × 2 h), 4 bacs d'éthanol à 95% (4 × 2 h) et 3 bacs d'éthanol à 100% (3 × 2 h).
- **Eclaircissement** : Elle consiste à remplacer la solution de déshydratation par un solvant miscible dans le milieu d'inclusion. C'est une étape de transition réalisée par des hydrocarbures benzéniques à l'instar du xylène ou du toluène. Ainsi, après déshydratation, deux bains dans du xylène (2 × 2 h) ont suffi pour réaliser cette opération.
- **Imprégnation** : Pour obtenir des coupes fines, il est nécessaire d'incorporer dans les tissus une substance neutre qui durcit les fragments. La substance utilisée était la paraffine. L'imprégnation consiste au remplacement de l'eau des cellules et des tissus par une substance qui durcit les prélèvements. Les cassettes contenant les fragments d'organes ont séjourné 4 heures (2 × 2 h) dans de la paraffine chaude et liquide (60°C).

### II.2.12.3- Inclusion et coupes

L'inclusion fournit un support externe aux tissus, ce qui permet la réalisation des coupes au microtome. Les tissus ont été placés dans des moules en inox remplis de paraffine en fusion (60°C) qui est mise à solidifier sur une surface froide (-4°C) après orientation appropriée du tissu dans le bloc. Les blocs obtenus ont été coupés à l'aide d'un microtome à volant de marque

LEICA RM 2125 RT (Leica microsystème Nussloch 6 mbH, D-69226 Nussloch). Des rubans de coupes de 5 µm d'épaisseur obtenus ont été étalés dans un bain-marie contenant de l'eau gélatinée. Au moyen de lames porte-objet propres et étiquetées, les coupes ont été recueillies et séchées à l'étuve à 45°C pendant 24 heures.

#### **II.2.12.4- Coloration**

La coloration permet de visualiser les constituants cellulaires et tissulaires en leur faisant capter et fixer des colorants de façon plus ou moins sélective. La technique de coloration utilisée dans ce travail est la coloration usuelle et classique à l'hématoxyline-éosine dans laquelle l'hématoxyline colore les constituants acides du noyau en bleu-violacé et l'éosine les constituants basiques du cytoplasme en rose-rouge. La coloration a été faite en deux étapes à savoir :

**- Le déparaffinage et la réhydratation :** Il s'agit d'une étape au cours de laquelle les coupes sont débarrassées de la paraffine dans des bains de xylène et réhydratées dans des bains d'alcool à concentrations décroissantes jusqu'à l'eau distillée ; chaque bain ayant une durée de 5 minutes (Xylène (3×5 min) ; éthanol à 100% (3 × 5 min) ; éthanol à 95% (1×5 min) ; éthanol à 80% (1 × 5 min) et eau distillée (1 × 5 min).

**- La coloration proprement dite :** Après déparaffinage, les lames contenant des coupes d'organes sont passées successivement dans les bains d'hématoxyline de Harris (2 x5 min), d'eau de robinet (2 x 5 min), d'éthanol à 70% (1 x 5 min), d'éthanol à 95% (1 x 5 min), d'éosine alcoolique à 0,5% (1 x 5 min) et en fin d'eau de robinet (1 x 5 min).

#### **II.2.12.5- Montage**

Le montage permet de protéger les coupes par une fine lamelle de verre et de les conserver. Le milieu de montage était la résine synthétique (le baume de Canada) non miscible à l'eau. Les coupes ont été déshydratées avant d'être montées. Cette opération a été faite en deux étapes : la déshydratation dans trois bains d'alcool absolu (3 × 5 min) et l'éclaircissement dans trois bains de xylène (3 × 5 min). Une fois les coupes déshydratées et montées, les images ont été obtenues par analyse microscopique.

#### **II.2.13- Analyse microscopique et interprétation des résultats**

L'analyse microscopique des coupes histologiques a été effectuée au moyen d'un équipement complet constitué d'un microscope Axios Kop 40 relié à un ordinateur où les images sont transférées et analysées avec les logiciels MRGrab 1.0 et Axio Vision 3.1, tous fournis par ZEISS (Hallberman, Allemagne).

L'histomorphologie de l'utérus et du vagin a permis de déterminer la taille des épithélia utérins et vaginaux. Celle de la glande mammaire a été réalisée par observation de la différenciation des couches cellulaires constituant l'alvéole, le diamètre des acini, ainsi que la présence ou l'absence de sécrétions éosinophiles dans la lumière alvéolaire. L'analyse de la microarchitecture du fémur (droit et gauche), du tibia droit, de la mandibule et de la vertèbre lombaire numéro-3 (VL- 3) a été réalisée par observation du réseau trabéculaire et de la moelle osseuse, des lacunes de résorption et la mesure de l'épaisseur de l'os trabéculaire. L'analyse de l'histomorphologie du foie, du rein, du rein et du poumon a consisté à l'observation de leurs structures constitutives.

## **II.2.15- Protocoles des dosages**

### **II.2.15.1- Dosage du glycogène dans l'utérus**

#### **➤ Principe**

Après avoir extrait, précipiter et hydrolyser le glycogène utérin, le glucose formé a été dosé par la méthode de Folin Wu (1920). Cette méthode est basée sur les propriétés réductrices du glucose en milieu alcalin et à chaud. En effet, la solution de glucose a été mise en contact avec le réactif cuivreux permettant au glucose de réduire l'oxyde cuivrique ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) et de former l'oxyde cuivreux ( $\text{CuO}_2$ ) qui réagit à son tour avec le phosphomolybdique donnant une coloration bleue (d'oxyde cuivreux) qui présente un maximum d'absorption à 530 nm, l'intensité de coloration est proportionnelle à la quantité de glucose présente dans le milieu.

#### **➤ Mode opératoire**

Les tubes comportant les homogénats d'utérus ont été portés au bain-marie bouillant pendant 30 minutes et sous agitation. Ils ont été ensuite refroidis sous l'eau. Deux gouttes de sulfate de zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ) à 10 % et 4 mL d'éthanol à 95% y ont été ajoutés. Les tubes ont été agités et chauffés dans un bain-Marie jusqu'à ébullition permettant la précipitation du glycogène utérin. La suspension obtenue a été refroidie et centrifugée à 4500 tours/min pendant 10 minutes et le surnageant a été éliminé. Deux millilitres d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) à 2,5 N ont été ajoutés aux précipitas et les tubes ont été chauffés pendant 30 minutes permettant ainsi d'hydrolyser le glycogène. Un millilitre de cette solution a été prélevé et introduit dans des 7 tubes (numérotés de 1 à 7) et complétés à 2 mL avec de l'eau distillée. Après ajout de 2 mL de solution de tartrate cuivrique à chaque tube et homogénéisation, la solution a été placée au bain-marie à 37 °C pendant 8 minutes et ensuite refroidis. Deux (2) mL de réactif phosphomolybdique ont été ajouté dans chaque tube, permettant ainsi d'obtenir une coloration bleue. Le volume de chaque tube était ensuite complété à 20 mL avec de l'eau distillée. Ces tubes ont été ensuite agités et 10 minutes après, leurs différentes densités optiques ont été lues

au spectrophotomètre à 530 nm. Les concentrations de glucose ont été déduites d'une gamme d'étalon préparé à partir d'une solution standard de glucose à 0,5 g/L. Les résultats ont été exprimés en quantité de glycogène (mg) pour chaque animal. La quantité de glycogène a été déduite de la formule suivante : Quantité de glycogène (mg) = [(DO du tube/DO standard) × Concentration du standard ]×100.

#### II.2.14.2 - Dosage des protéines totales

Les protéines totales de l'utérus ont été dosées suivant la méthode de Biuret (Gornall *et al.*, 1949).

##### ➤ 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 complexé avec le tartrate pour former un complexe cuivro-protéique de couleur violette qui présente un maximum d'absorption à 540 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans le milieu.

##### ➤ Mode opératoire

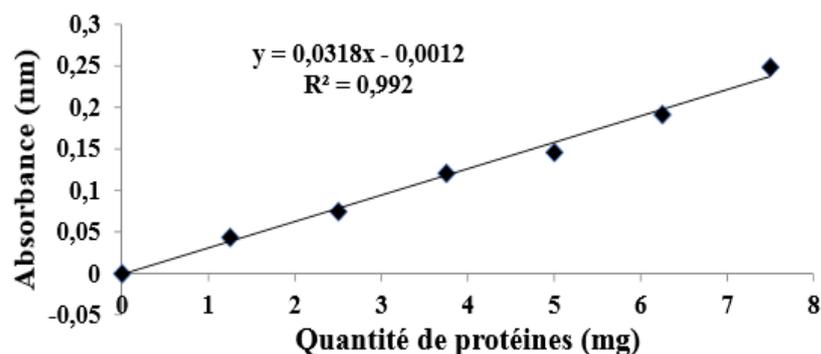
Dans les tubes à essais, 10 mL d'homogénat utérin ont été introduits tandis que le tube blanc, contenait de l'eau distillée (10 mL). Après ajout des différents réactifs dans chaque tube (590 mL d'eau distillée et 400 mL de la solution de Biuret), l'ensemble a été incubé pendant 5 min à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 540 nm contre le blanc. La concentration en protéine totale des échantillons a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage (Figure 17), établie suivant la procédure présentée dans le tableau II.

**Tableau II** : Détermination de la courbe d'étalonnage utilisé pour le dosage des protéines totales.

Réactifs (ml)	Etalons						
	1	2	3	4	5	6	7
BSA	-	0,25	0,5	0,75	1	1,25	1,5
Eau distillée	3	2,75	2,5	2,25	2	1,75	1,5
Biuret	2	2	2	2	2	2	2
Quantité de protéins (mg)	0	1,25	2,5	3,75	5	6,25	7,5

Incubation à température ambiante (5 min).  
Lecture de l'absorbance à 540 nm contre le blanc (étalon 1).

La concentration des protéines dans les tubes tests a été déterminée en se servant de la courbe d'étalonnage (Figure 17).



**Figure 17** : Courbe d'étalonnage des protéines totales.

### II.2.14.3- Mesure de l'activité de la phosphatase alcaline

La mesure de l'activité de la phosphatase alcaline a été faite par la méthode colorimétrique à l'aide d'un Kit provenant de Giese Diagnostics.

#### ➤ Principe

En milieu alcalin, la phosphatase alcaline catalyse l'hydrolyse du p-nitrophénylphosphate (4-NPP) en p-nitrophénol (4-NP). La vitesse d'apparition du p-nitrophénol déterminée par la variation de l'absorbance à 405 nm est proportionnelle à l'activité de la phosphatase alcaline dans le spécimen.

La préparation des réactifs a été faite à une température de 15-25°C et la solution de travail a été préparée comme suit : les réactifs (A) et (B) ont été mélangés dans les proportions 1V(A) pour 4 V(B) et la solution de travail (A+B) obtenue a été fermée et gardée à l'abri de la lumière à une température de 2-8°C.

#### ➤ Mode opératoire

Le tableau III présente le protocole de détermination de l'activité de la phosphatase alcaline sérique et osseuse.

**Tableau III** : Détermination de l'activité de la phosphatase alcaline

<b>Solution de travail (A+B)</b>	1000 µL
<b>Echantillon</b>	25 µL
Incubation dans un bain marie à 37°C (1min) et lecture de l'absorbance initiale à 405 nm contre l'eau distillée, puis toutes les minutes pendant 3 min.	

L'activité catalytique de la phosphatase alcaline a été exprimée en unité par litre (U/L) suivant la formule :  $ALP (U/L) = (\Delta Abs/min \times 2757)$  avec

$(\Delta Abs /min)$  = la moyenne de la variation des absorbances par minute ;

2757= le coefficient de multiplication fourni par le Kit.

#### II.2.14.4- Dosage du calcium

Le dosage du calcium a été réalisé par la méthode colorimétrique à l'aide d'un Kit provenant de Biotec Diagnostics Uk Ltd. Unit 20, Cloud Hill, Temple Cloud, Bristol, UK, BS395BX.

##### ➤ Principe

En milieu alcalin, les ions calcium forment avec le complexe d'o-crésolphtaléine, un composé coloré en rouge-violet, dont l'absorbance mesurée à 570 nm est proportionnelle à la concentration en calcium dans les échantillons.

##### ➤ Mode opératoire

Le tableau IV présente le protocole de dosage du taux de calcium dans le sérum et dans l'homogénat du fémur.

**Tableau IV** : Mode opératoire du dosage du calcium dans le sérum et le fémur

Pipetés	Blanc	Etalon	Essai
Réactif	1 mL	1 mL	1 mL
Eau distillée	10 µL	-	-
Etalon	-	10 µL	-
Echantillon	-	-	10 µL

Mélange et incubation pendant 5 min à température ambiante. La lecture des absorbances a été réalisée à 570 nm contre le blanc réactif.

La concentration du calcium exprimée en mg/dL a été déterminée par la formule suivante :

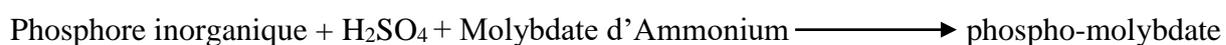
$$\text{Concentration (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbance (échantillon)}}{\text{Absorbance (étalon)}} \times \text{Concentration de l'étalon}$$

#### II.2.14.5- Dosage du phosphore inorganique sérique et osseux

Le dosage de phosphore a été fait par la méthode colorimétrique à l'aide d'un kit provenant de Biotec Diagnostics Uk Ltd.

##### ➤ Principe

En milieu acide et en présence d'un réducteur, le phosphore inorganique et le molybdate d'ammonium forment le complexe phospho-molybdique de couleur bleue, dont l'intensité de coloration est proportionnelle à la concentration en phosphore dans le spécimen.



##### ➤ Mode opératoire

Le protocole de dosage du phosphore inorganique est résumé dans le tableau V.

**Tableau V** : Dosage du phosphore inorganique

Réactifs	Blanc	Etalon	Essai
Réactif 2 (NaCl 1,2%)	500 µL	500 µL	500 µL
Réactif 3 (Molybdate d'Ammonium (1,2%) <sup>o</sup> + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2%))	500 µL	500 µL	500 µL
Réactif 1 (étalon)	-	50 µL	-
Echantillon	-	-	50 µL
Eau distillée	50 µL	-	-

Mélange, puis incubation pendant 15 min à température ambiante et lecture des absorbances du standard et des échantillons à 675 nm contre celle du blanc réactif.

La concentration du phosphore exprimée en mg/L a été déterminée d'après la formule suivante :

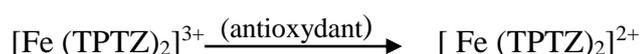
$$\text{Concentration (mg/L)} = \frac{\text{Absorbance (échantillon)}}{\text{Absorbance (étalon)}} \times 5 \quad \text{ou } 5 = \text{coefficient de multiplication fournit par le kit}$$

#### II.2.14.6- Détermination du potentiel antioxydant *in vivo* de *Lansea acida*

Le potentiel antioxydant de l'extrait éthanolique *L. acida* a été déterminée chez le rat suivant la méthode de la FRAP adaptée de Benzie et Strain (1996).

##### ➤ Principe

Cette méthode mesure la capacité d'un antioxydant à réduire le fer à un pH bas (3,6). Une coloration bleue intense est formée lorsque le complexe 2,4,6-tris (2-pyridyl) -S-triazine (TPTZ) ferrique [Fe(TPTZ)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup> est réduit en tripyridyltriazine ferreux [Fe(TPTZ)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> et l'absorbance mesurée à 593 nm.



##### ➤ Mode opératoire

Le tableau VI présente la procédure de détermination de la courbe d'étalonnage.

**Tableau VI** : Protocole d'établissement de la courbe d'étalonnage de la FRAP

Tubes	Étalons				
	0	1	2	3	4
Fe <sub>2</sub> S <sub>0</sub> <sub>4</sub> [µM]	0	5	20	25	30
Fe <sub>2</sub> S <sub>0</sub> <sub>4</sub> (µL)	0	50	150	300	600
H <sub>2</sub> O (µL)	2000	1950	1850	1700	1400

- Homogénéisation et incubation à température ambiante pendant (12 min).  
- Lecture de l'absorbance à 593 nm contre le blanc.

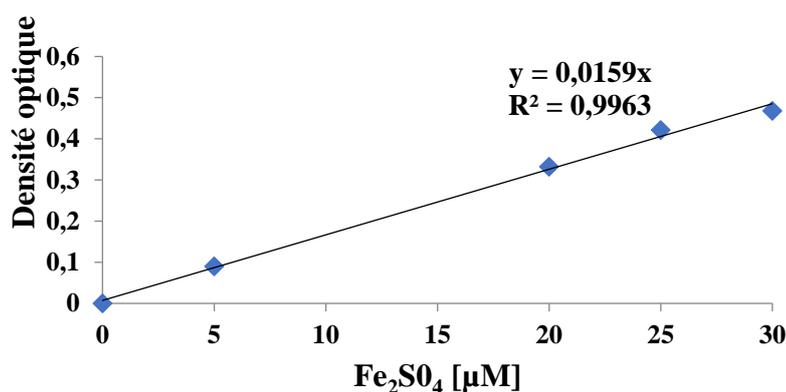
Le tableau VII présente le protocole adopté pour déterminer le potentiel antioxydant *in vivo* de l'extrait de *L. acida*

**Tableau VII** : Détermination du potentiel antioxydant *in vivo* de *L. acida*

Réactifs	Blanc	Essai
Sérum (µL)	-	75
Eau distillée (µL)	75	-
Réactif de FRAP (µL)	2000	2000

- Homogénéisation et incubation à température ambiante pendant (12 min)  
- Lecture des absorbances à 593 nm contre le blanc.

La concentration de  $[\text{Fe}_2\text{SO}_4]$  des échantillons a été déterminée en utilisant l'équation de régression obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (Figure 18).



**Figure 18** : Courbe d'étalonnage de détermination de la capacité antioxydante totale *in vivo* de *L. acida*.

#### II.2.14.7- Mesure de l'activité de la catalase

L'activité de la catalase a été mesurée suivant la méthode de Sinha (1972).

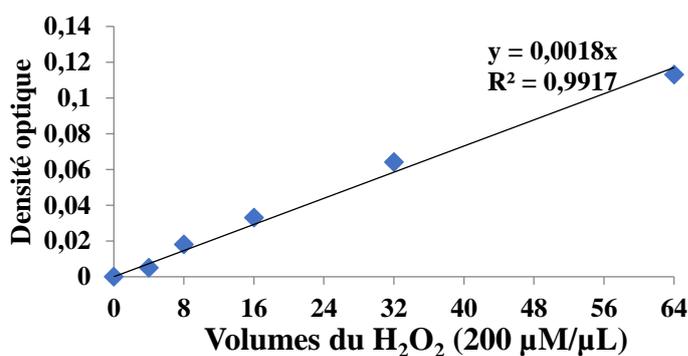
##### ➤ Principe

Le peroxyde d'hydrogène est rompu en présence de la catalase. En présence de l'acide acétique à chaud et du peroxyde d'hydrogène, le dichromate de potassium est réduit en acétate chromique, en un intermédiaire réactionnel instable (l'acide per chromique). L'intensité de la coloration de l'acide chromique mesurée à 530 nm est proportionnelle à la quantité de peroxyde d'hydrogène non décomposé par la catalase et traduit par conséquent l'inverse de l'activité de la catalase.

➤ **Mode opératoire**

**Tableau VIII** : Détermination de la courbe d'étalonnage de dosage de la catalase

Tubes	Etalons					
	1	2	3	4	5	6
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> (200 μmol/mL)	0	4	8	16	32	64
<b>Tampon phosphate sodium</b> 0,01M, pH=7 (μL)	750	700	650	600	550	500
<b>Dichromate de potassium</b> (5%) et <b>acide acétique glacial</b> 96% (1 :3, v/v) (mL)	1	1	1	1	1	1
<b>Concentration finale de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> non décomposé</b> (mM)	0	5,71	11,43	17,14	22,85	28,59



**Figure 19** : Courbe d'étalonnage du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> non décomposé par la catalase.

Le tableau IX présente le protocole du dosage de l'activité de la catalase.

**Tableau IX** : Détermination de l'activité de la catalase

Réactifs	Blanc	Essai
<b>Blanc</b>	0	100
<b>Tampon phosphate</b> (μL)	1000	900
- Homogénéisation et ajout du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> pour déclencher la réaction		
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> (μL)	400	400
- Arrêt de la réaction après 60 secondes par ajout du dichromate- acide acétique		
<b>Dichromate- acide acétique</b> (μL)	2000	2000
- Homogénéisation, chauffage dans de l'eau bouillante (100°C) pendant (10 min)		
- Lecture de l'absorbance à 530 nm		

L'activité de la catalase a été exprimée en mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> décomposé/min/mg de protéines. Le calcul a été fait de la manière suivante :

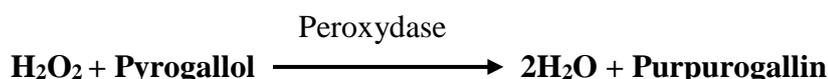
$$\text{Activité catalase} = \frac{[\text{H}_2\text{O}_2] \text{ initial} - [\text{H}_2\text{O}_2] \text{ non décomposé (mM) /min}}{\text{Quantité de protéines (mg)}}$$

Quantité de protéines (mg) = concentration pondérale des protéines totales (mg/mL) × volume échantillon (mL).

#### II.2.14.8- Détermination de l'activité de la glutathion peroxydase

##### ➤ Principe

En présence du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) comme substrat et du pyrogallol, la peroxydase catalyse la formation de l'eau et du purpurogallin suivant l'équation :



##### ➤ Mode opératoire

Le tableau X résume le protocole de détermination de l'activité de la glutathion peroxydase.

**Tableau X** : Détermination de l'activité de la glutathion peroxydase.

Réactifs	Blanc	Essais
Eau distillée (μL)	2100	2100
Tampon phosphate (100 mM, pH, 6) (μL)	420	320
Solution du peroxyde d'hydrogène (0,05%) (μL)	160	160
Solution de pyrogallol (0,5%) (μL)	320	320
Sérum	-	100
- Homogénéisation		
- Lecture des densités optiques à 420 nm après 20 sec et après 140 sec contre le blanc		

L'activité de la glutathion peroxydase a été exprimée en unité/mL d'enzyme ; elle est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Unité/mL} = [\text{Do}_{\text{Essai}} - \text{Do}_{\text{Blanc}}] \times (3) (\text{df}) / (12) (0,1) \text{ avec}$$

- 3 = volume (mL) des échantillons ;
- df = facteur de dilution ;
- 12 = coefficient d'extinction moléculaire de 1mg/ml de pyrogallol à 420 nm ;
- 0,1 = volume (mL) de l'enzyme utilisée.

#### II.2.14.9- phytochimie de l'extrait éthanolique de *L. acida*

La détermination de la concentration en polyphénols totaux de *L. acida* a été effectuée suivant la méthode adaptée de Singleton *et al.* (1999).

## ➤ Principe

Les polyphénols en milieu alcalin réduisent les acides phosphotungstiques et phosphomolybdique du réactif de Folin-Ciocalteu en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène qui absorbent la lumière à 765 nm.

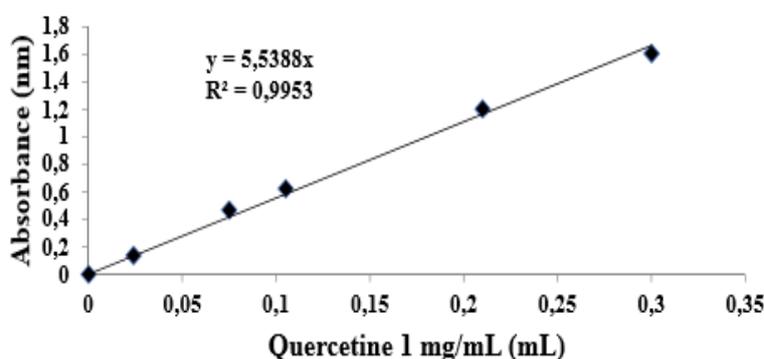
Le tableau XI présente la procédure de réalisation de la courbe d'étalonnage et de détermination de la teneur en polyphénols de l'extrait de *L. acida*.

**Tableau XI** : Détermination de la courbe d'étalonnage de la teneur en polyphénols totaux dans l'extrait de *L. acida*.

Réactifs (mL)	Etalons						Blanc	Essais
	1	2	3	4	5	6		
Extrait (1mg/mL)	-	-	-	-	-	-	-	0,1
Quercétine (1mg/mL)	-	0,024	0,075	0,105	0,21	0,3	-	-
Eau distillée	0,3	0,276	0,225	0,195	0,09	-	0,1	-
Réactif de Folin-Ciocalteu 1/10 <sup>e</sup>	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> à 7,5 %	1	1	1	1	1	1	1	1

- Homogénéisation.  
 - Incubation à l'abri de la lumière pendant (2 h).  
 - Lecture de l'absorbance à 765 nm contre le blanc

La concentration en polyphénols totaux de *Lannea acida* a été déterminée par à partir de la courbe d'étalonnage (Figure 20).



**Figure 20** : Courbe d'étalonnage du dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols a été exprimée en mg équivalent quercétine/g d'extrait sec en utilisant la formule suivante :

$$T = C \times V/M \text{ avec :}$$

**T** = teneur en composés polyphénoliques (mg eq quercétine/g d'extrait sec) ;

**C** = concentration d'extrait p équivalent à la quercétine, obtenu à partir de la courbe d'étalonnage (mg/mL) ;

**V** = volume d'extrait (mL) et **M** = poids sec d'extrait (g).

## II.2.14.10- Dosage des flavonoïdes totaux

La détermination de la concentration en flavonoïdes totaux dans l'extrait éthanolique de *L. acida* a été effectuée suivant la méthode adaptée de Zhishen *et al.* (1999).

### ➤ Principe

Le chlorure d'aluminium forme avec les groupements C-4 et C-3 ou C-5 hydroxy des flavones et flavonoïdes, des complexes acides stables. Il forme également des complexes acides labiles, avec les groupes orthodihydroxy dans l'anneau A- ou B- des flavonoïdes. L'absorbance a été mesurée à 510 nm contre le blanc.

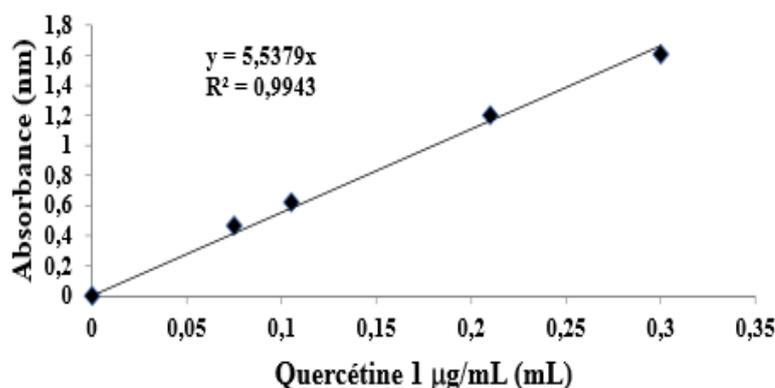
### ➤ Mode opératoire

Le tableau XII présente la procédure de réalisation de la courbe d'étalonnage de la teneur en flavonoïdes de l'extrait.

**Tableau XII** : Détermination de la courbe d'étalonnage de la teneur en flavonoïdes de l'extrait.

Réactif (mL)	Etalons					Blanc	Essais
	1	2	3	4	5		
Extrait 100 µg/mL	-	-	-	-	-	-	0,1
Quercétine µg/mL		0,075	0,105	0,21	0,3	-	-
Eau distillée	0,3	0,225	0,195	0,09	-	0,4	0,3
NaNO <sub>2</sub> à 5%	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
Incubation à température ambiante pendant (5min)							
AlCl <sub>3</sub> à 10%	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
Incubation à température ambiante durant (1min)							
NaOH 1mM	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Eau distillée	1	1	1	1	1	1	1
Homogénéisation et lecture des absorbances à 510 nm contre le blanc							

Ces dosages ont été faits en triplicata et la concentration en flavonoïdes a été déterminée par extrapolation sur une courbe d'étalonnage (Figure 21).



**Figure 21** : Courbe d'étalonnage du dosage des flavonoïdes totaux.

La teneur en flavonoïdes a été exprimée en mg équivalent quercétine/g d'extrait sec en utilisant la formule précédente (voir page 62).

### II.2.14.11- Détermination du potentiel antioxydant *in vitro* de *L. acida*

La détermination du potentiel antioxydant (*in vitro*) de l'extrait éthanolique de *L. acida* a été effectuée suivant la méthode "*Ferric Reducing Antioxydant Power*" (FRAP) adaptée de Benzie et Strain, (1996).

#### ➤ Principe

Cette méthode mesure la capacité des échantillons à réduire le fer à un pH acide (3,6). Une intense coloration bleue est formée lorsque le complexe 2,4,6-tris (2-pyridyl) -S-triazine (TPTZ) ferrique est réduit en tripyridyltriazine ferreux. L'absorbance a été mesurée à 593 contre le blanc.



#### ➤ Mode opératoire

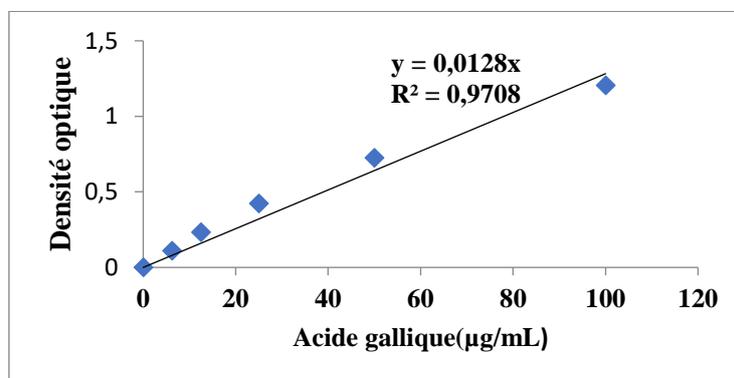
Le tableau XIII présente la procédure de réalisation de la courbe d'étalonnage et de détermination du potentiel antioxydant de l'extrait.

**Tableau XIII** : Détermination de la courbe d'étalonnage du potentiel antioxydant *in vitro*.

Réactifs (μL)	Etalons						Blanc	Essais
	1	2	3	4	5	6		
Extrait (1mg/mL)	-	-	-	-	-	-	-	75
Acide gallique (μg/mL)	-	7,5	12,5	25	50	100	-	-
Eau distillée	100	87,5	75	50	25	-	75	-
Réactif de FRAP	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

- Incubation pendant (12 min)  
- Lecture des absorbances à 593 nm contre le blanc

Ces dosages ont été faits en triplicata et le potentiel antioxydant a été déterminé en utilisant l'équation de régression de la courbe d'étalonnage (Figure 22).



**Figure 22** : Courbe d'étalonnage de détermination du potentiel antioxydant *in vitro*.

Le potentiel antioxydant a été exprimé en  $\mu\text{g}$  équivalent acide gallique/mL d'extrait sec en utilisant l'équation de régression obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (Figure 22).

#### **II.2.14.12- Activité antiradicalaire 1,1-diphényl-2-picrilhydrazyl (DPPH)**

L'activité antiradicalaire DPPH de l'extrait de *L. acida* a été évaluée suivant le protocole de Katalinié *et al.* (2003).

##### **➤ Principe**

Il repose sur la réduction du radical DPPH (1,1-diphényl-2-picrilhydrazyl) de couleur violette en un composé de couleur jaune par transfert de l'atome d'hydrogène pour former le DPPH-H stable (1,1-diphényl-2-picrilhydrazine). L'intensité de la coloration, mesurée au spectrophotomètre à 517 nm est inversement proportionnelle à l'activité antiradicalaire des composés contenus dans l'extrait à analyser.

##### **➤ Mode opératoire**

Dans différents tubes à essai, ont été introduits 500  $\mu\text{L}$  d'extrait à des concentrations de 25, 50 et 100  $\mu\text{g/mL}$  et 500  $\mu\text{L}$  d'une solution préparée de DPPH 400  $\mu\text{M}$ . L'acide gallique a été utilisé comme standard aux concentrations 0,1, 1, 10, 100 et 1000  $\mu\text{g/mL}$ . La solution témoin (standard) était constituée de 500  $\mu\text{L}$  d'eau distillée et 500  $\mu\text{L}$  de la solution DPPH. Après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, les absorbances ont été lues à 517 nm contre le blanc. L'activité antiradicalaire a été exprimée en pourcentage de radical DPPH réduit et calculée suivant la formule :

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = [1 - (\text{DO échantillon} / \text{DO contrôle})] \times 100$$

#### **II.2.15- Analyse statistique**

L'analyse des résultats a été faite à l'aide du test d'analyse de variance (One-Way ANOVA) suivi du post-test de Dunnett. Toutes les données présentées dans ce travail ont été exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard sur la moyenne (ESM). Les valeurs de probabilité  $p < 0,05$  indiquent le seuil de significativité.

A decorative border resembling a scroll, with a vertical bar on the left and rounded corners on the right, framing the chapter title.

## **CHAPITRE III : RESULTATS**

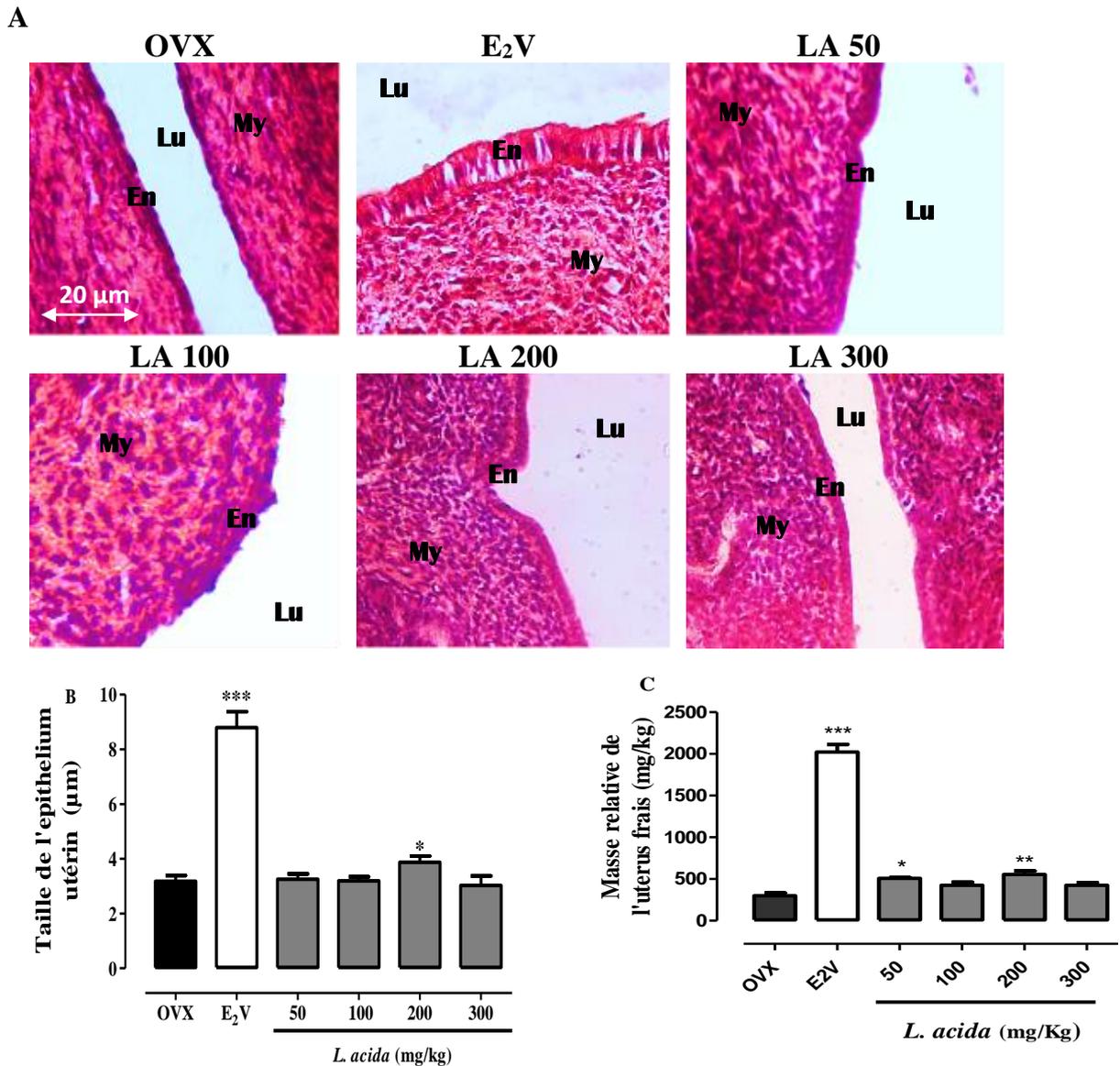
### III.1- Effets œstrogéniques *in vivo* de l'extrait éthanolique de *Lannea acida* chez la rate Wistar

#### III.1.1- Effets sur l'utérus

##### III.1.1.1- Effets sur les paramètres morphologiques

La figure 23A représente les coupes histologiques de l'utérus des animaux traités pendant trois jours. L'observation microscopique des coupes montre des cellules de l'épithélium utérin hypertrophiées de forme cylindrique chez les rates traitées à l'E<sub>2</sub>V et de forme cubique chez ceux du groupe OVX recevant de l'eau distillée (témoin négatif) (Figure 23A). La microphotographie de l'épithélium utérin des rates recevant *L. acida* à la dose de 200 mg/kg PC montre tout comme chez les rates traitées à l'E<sub>2</sub>V (1mg/kg), un épithélium stratifié possédant deux couches, une couche germinative et une couche granuleuse, avec des cellules cubiques de grande taille (Figure 23A). La mesure de la taille de l'épithélium utérin, montre une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) de la taille de l'épithélium utérin chez les animaux traités à l'E<sub>2</sub>V (1mg/kg PC) comparé au groupe OVX (Figure 23B). Elle est de  $173,70 \pm 0,58$   $\mu\text{m}$  chez les animaux traités à l'E<sub>2</sub>V (1mg/kg PC) contre  $63,85 \pm 0,21$   $\mu\text{m}$  chez ceux du groupe OVX. L'extrait éthanolique de *L. acida* tout comme l'E<sub>2</sub>V a induit une augmentation significative de la taille de l'épithélium utérin à la dose de 200 mg/kg ( $p < 0,05$ ). Aucune variation significative n'a été observée aux doses de 50, 100 et de 300 mg/kg PC par comparaison au groupe OVX.

Concernant la masse relative de l'utérus (Figure 23C), les résultats ont montré qu'au terme de trois jours de traitement, l'E<sub>2</sub>V à la dose de 1mg/kg a induit une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) de la masse relative de l'utérus comparé au groupe OVX. Elle est de  $85,23 \pm 43,73$  mg/kg chez les animaux traités à l'E<sub>2</sub>V contre  $46,01 \pm 33,55$  mg/kg chez les témoins négatifs. *L. acida* tout comme l'E<sub>2</sub>V a induit l'augmentation significative de la masse relative de l'utérus aux doses de 50 ( $p < 0,05$ ) et 200 mg/kg ( $p < 0,001$ ) comparé au groupe OVX (Figure 23C).



**Figure 23** : Effets de 3 jours de traitement à l'extrait éthanolique de *L. acida* sur l'histologie de l'utérus (A) (400, coloration à l'hématoxyline- éosine), la taille de l'épithélium utérin (B) et sur la masse relative de l'utérus (C)

OVX = animaux ovariectomisés et recevant de l'eau distillée ; E<sub>2</sub>V = animaux ovariectomisés et traités à l'œstradiol valérate à la dose de 1 mg/kg PC ; LA = animaux OVX recevant l'extrait éthanolique de *Lannea acida* aux doses de 50, 100, 200 et de 300 mg/kg PC. Lu = lumière utérine ; En = endomètre ; My = myomètre. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± ESM (n=5) ; \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$  (différence significative par rapport au groupe OVX).

### III.1.1.2- Effets sur la teneur en eau, le taux de protéines totales et de glycogène

Les résultats consignés dans le tableau XIV montrent les effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur la teneur en eau, le taux de protéines et de glycogène dans l'utérus. L'E<sub>2</sub>V a induit une augmentation significative du taux de protéines totales ( $p < 0,01$ ) et de glycogène ( $p < 0,01$ )

ainsi que de la teneur en eau dans l'utérus ( $p < 0,001$ ) par comparaison au groupe OVX. *L. acida* a induit une augmentation significative de la teneur en eau dans l'utérus aux doses de 50 mg/kg ( $p < 0,05$ ), 100 mg/kg ( $p < 0,01$ ), 200 mg/kg ( $p < 0,01$ ) et de 300 mg/kg PC ( $p < 0,05$ ) comparé au témoin négatif (OVX). Une augmentation significative du taux de protéines totales a été observée chez les rates traitées à l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 100 mg/kg ( $p < 0,01$ ) et de 300 mg/kg PC ( $p < 0,05$ ). Les résultats ont également montré, une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) du taux de glycogène chez les rates traitées à l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses 50, 100 et de 200 mg/kg PC comparativement au groupe OVX.

**Tableau XIV** : Effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur la teneur en eau, le taux de protéines et glycogène dans l'utérus

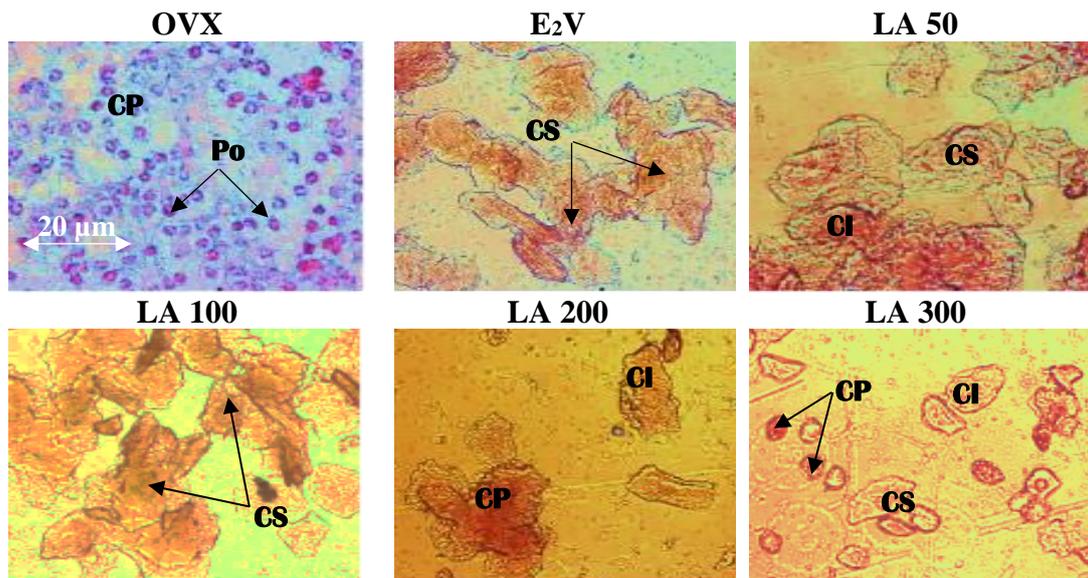
Groupes	Doses	Teneur en eau dans l'utérus (MF/MS)	Taux de protéine totale dans l'utérus (mg/mL) °	Taux de glycogène dans l'utérus (mg/mL)
OVX		0,1300 ± 0,0140	0,1087 ± 0,0002	5,4300 ± 0,1000
E2V		0,4100 ± 0,0580***	0,1114 ± 0,0003**	9,2100 ± 0,2100**
LA	50 mg/kg	0,2000 ± 0,0080*	0,1091 ± 0,0003	6,7100 ± 0,4200*
	100 mg/kg	0,3100 ± 0,0250**	0,1105 ± 0,0001**	7,3000 ± 0,2500*
	200 mg/kg	0,2900 ± 0,0360**	0,1095 ± 0,0002*	6,9000 ± 0,5300*
	300 mg/kg	0,2300 ± 0,0320*	0,1090 ± 0,0002	6,1100 ± 0,3000

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne ± ESM, (n = 5). OVX = animaux ovariectomisés et ayant reçu de l'eau distillée ; E<sub>2</sub>V = animaux ovariectomisés, traités à l'œstradiol valérate à la dose de 1 mg/kg PC ; LA = animaux OVX traités à l'extrait à l'éthanol de *Lannea acida* aux doses de 50, 100, 200 et de 300 mg/kg PC. MF= masse de l'utérus frais, MS= masse de l'utérus sec. \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  et \*\*\* $p < 0,001$  (différence significative par rapport au groupe OVX).

### III.1.2- Effets sur le vagin

#### III.1.2.1- Effets sur la cytologie vaginale

La figure 24 indique les effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur la cytologie vaginale. Les résultats montrent chez les animaux du groupe OVX recevant de l'eau distillée, un cycle bloqué en diœstrus. Le diœstrus est matérialisé par la présence des cellules parabasales en abondance, des nombreux polynucléaires et de quelques cellules intermédiaires. L'E<sub>2</sub>V (1 mg/kg PC) ainsi que *L. acida* aux doses de 50 et de 100 mg/kg a induit l'œstrus chez les animaux OVX. L'œstrus est matérialisé sur le frottis vaginal par la présence des cellules superficielles et de polynucléaires. *L. acida* aux doses de 200 et 300 mg/kg a induit le præstrus, caractérisé par la présence des cellules intermédiaires en abondance (Figure 24).



**Figure 24 :** Effets de 3 jours de traitement à l'extrait éthanolique de *L. acida* sur la cytologie vaginale. Microphotographies (400, coloration à Papanicolaou).

OVX = animaux ovariectomisés, recevant de l'eau distillée ; E<sub>2</sub>V = animaux ovariectomisés traités à l'œstradiol valérate à la dose de 1 mg/kg PC ; LA = animaux ovariectomisés traités à l'extrait éthanolique de *Lannea acida* aux doses de 50, 100, 200 et de 300 mg/kg PC ; CS = cellules superficielles ; CI = cellules intermédiaires ; Po = polynucléaires ; CP = cellules parabasales.

Seul l'extrait éthanolique de *L. acida* à la dose de 300 mg/kg a induit un indice de maturation hormonale (déterminé par comptage des cellules) comparable à celui des animaux traités à l'E<sub>2</sub>V à la dose de 1 mg/kg PC (Tableau XV).

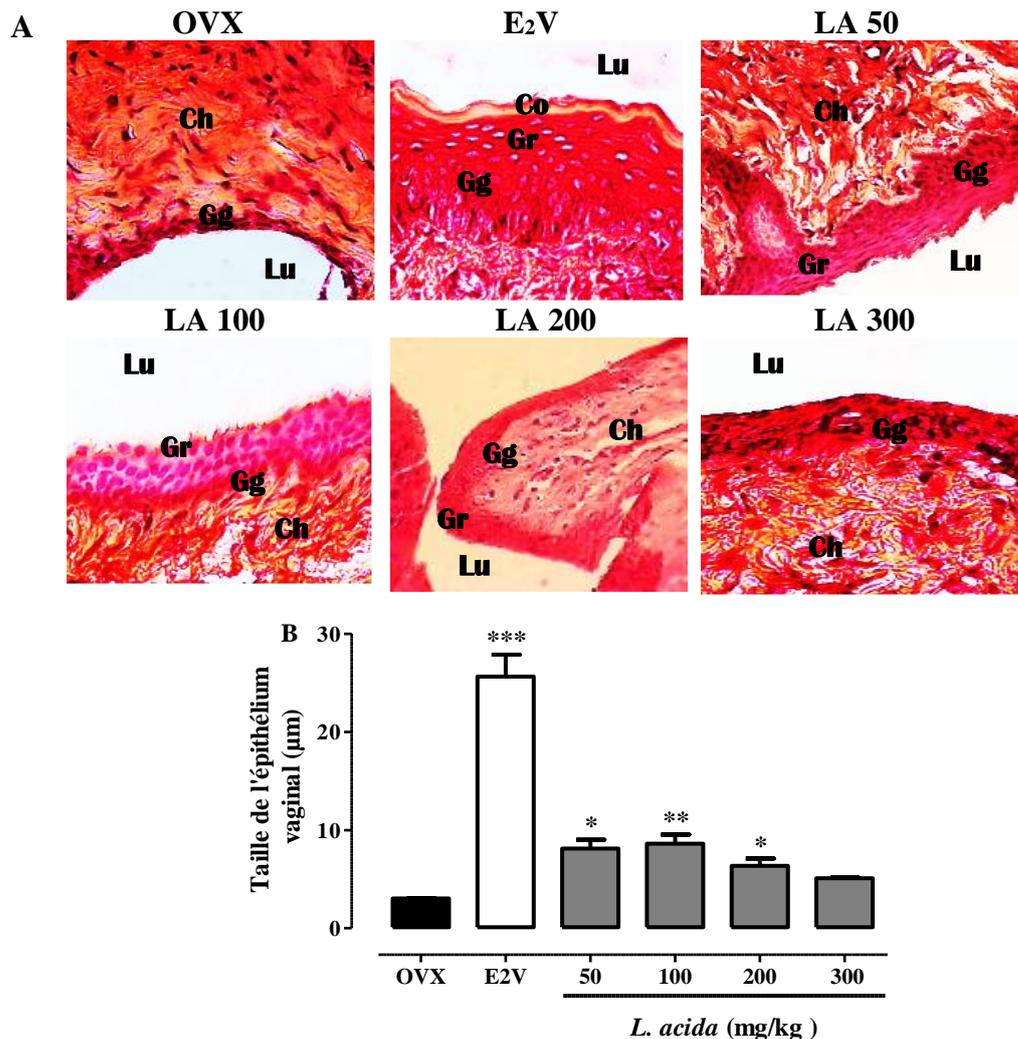
**Tableau XV :** Effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur les types cellulaires, l'indice de maturation hormonale et le cycle hormonale

Groupes	Dénombrement des différents types cellulaires				Indice de maturation hormonale	Stade du cycle œstral	
	Parabasales	Intermédiaires	Superficielles	Polynucléaire			
OVX	~300116	~11	0	Très élevé	99/1/0	Dicestrus	
E2V	0	~30	~2025	Très Faible	0/2/98	Œstrus	
LA	50	~4210	~420	~2	Élevé	90/9/1	Œstrus
	100	~122	~416	~25	En trace	21/74/5	Œstrus
	200	~100	~607	~10	Faible	14/85/1	Prœstrus
	300	~353	~505	~770	En trace	22/31/47	Prœstrus

Les valeurs représentent le nombre des différentes cellules. OVX = animaux ovariectomisés ayant reçu de l'eau distillée ; E<sub>2</sub>V = animaux ovariectomisés traités à l'œstradiol valérate à la dose de 1 mg/kg PC ; LA = animaux ovariectomisés recevant l'extrait éthanolique de *Lannea acida* aux doses de 50, 100, 200 et de 300 mg/kg de PC et ~ = environ.

### III.1.2.2- Effets sur la taille de l'épithélium vaginal

Les résultats de la Figure 25B montrent une augmentation significative ( $p < 0,01$ ) de la taille de l'épithélium vaginal chez les animaux traités à l'E<sub>2</sub>V à la dose de 1mg/kg PC. L'épithélium vaginal à une taille de  $746,41 \pm 2,24 \mu\text{m}$  chez les animaux traités à l'E<sub>2</sub>V contre  $88,18 \pm 3,03 \mu\text{m}$  chez le témoin négatif. L'épithélium vaginal des rates traitées à l'E<sub>2</sub>V présente trois couches ; une couche germinative, une couche granuleuse et une couche cornée, comparé à celui du groupe témoin qui présente une seule couche, la couche germinative (Figure 25A).



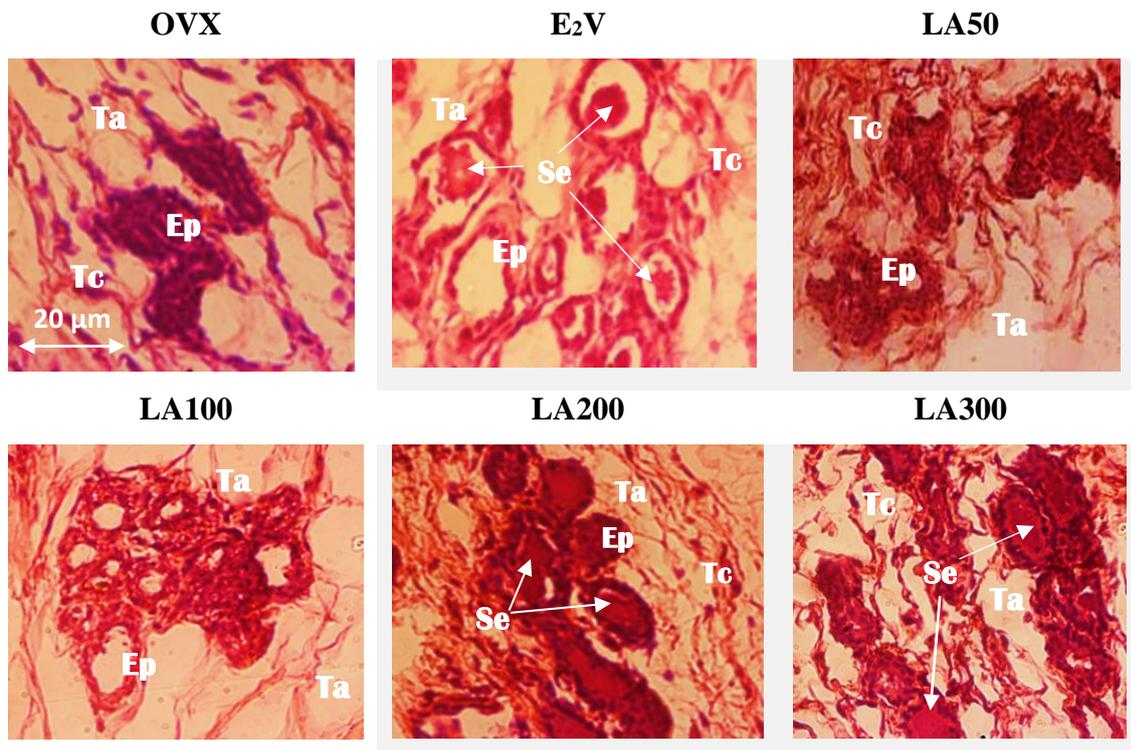
**Figure 25** : Effets de 3 jours de traitement à l'extrait éthanolique de *L. acida* sur l'histologie du vagin (A) et la taille de l'épithélium vaginal (B) (400, coloration à l'hématoxyline-éosine).

OVX = animaux ovariectomisés recevant de l'eau distillée ; E<sub>2</sub>V = animaux ovariectomisés traités à l'œstradiol valérate à la dose de 1 mg/kg PC ; LA = animaux OVX traités à l'extrait à l'éthanol de *Lannea acida* aux doses de 50, 100, 200 et de 300 mg/kg ; Co = couche cornée ; Lu = lumière vaginale ; Gr = couche granuleuse ; Gg = couche germinative ; Ch = chorion. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  ESM (n = 5) ; \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  (différence significative par rapport au groupe OVX).

*L. acida* tout comme l'E<sub>2</sub>V a induit une augmentation significative de la taille de l'épithélium vaginal respectivement aux doses de 50 ( $p < 0,05$ ), 100 ( $p < 0,01$ ) et de 200 mg/kg PC ( $p < 0,05$ ) par comparaison au groupe OVX. L'épithélium vaginal des rates traitées à *L. acida* présente deux couches, une couche germinative et une couche granuleuse (Figure 25A).

### III.1.3- Effets sur la glande mammaire

La figure 26 représente les microphotographies de la glande mammaire des rates ovariectomisées et traitées pendant 3 jours. Le traitement à l'E<sub>2</sub>V à la dose de 1 mg/kg montre une augmentation du diamètre et de la lumière des alvéoles. Une différenciation des couches cellulaires constituant l'alvéole et la présence des sécrétions éosinophiles dans la lumière alvéolaire sont également observées. L'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 100, 200 et 300 mg/kg PC a mimé les effets de l'E<sub>2</sub>V induisant des changements semblables sur la glande mammaire. Seules les doses de 200 et de 300 mg/kg PC ont induit la production des sécrétions éosinophiles par comparaison au groupe OVX (Figure 26).



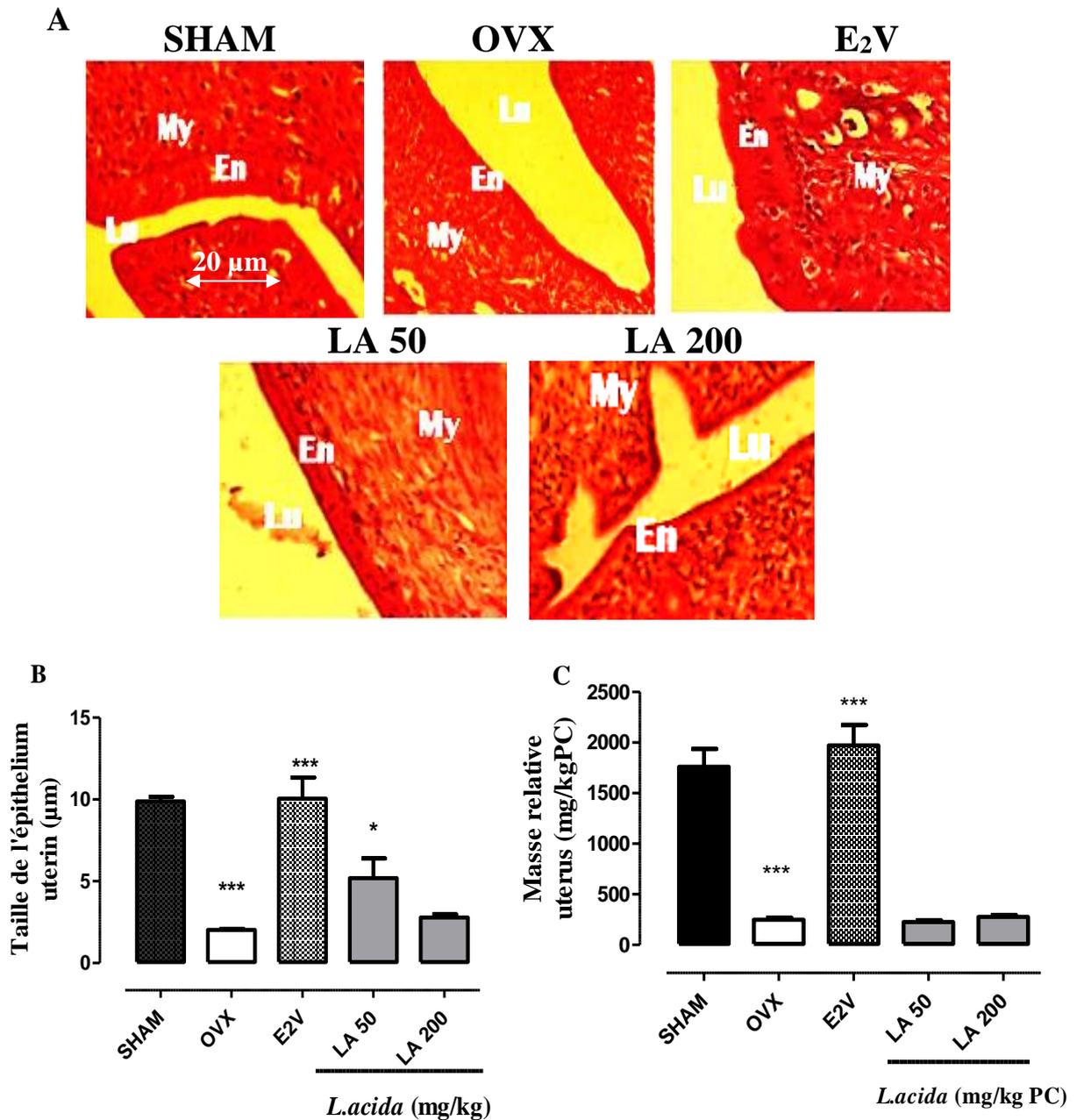
**Figure 26 :** Effets de 3 jours de traitement à l'extrait éthanolique de *L. acida* sur la glande mammaire. Microphotographies (400, coloration à l'hématoxyline-éosine).

OVX= animaux ovariectomisés traités à de l'eau distillée ; E<sub>2</sub>V = animaux ovariectomisés traités à l'œstradiol valérate à la dose de 1 mg/kg PC ; LA = animaux OVX traités à l'extrait éthanolique de *Lannea acida* aux doses de 50, 100, 200 et de 300 mg/kg PC respectivement ; Ac = Acinus ; Ep = épithélium acinaire ; Ta = tissu adipeux, Tc = tissu conjonctifs ; Se = sécrétion éosinophile.

### III.2- Effets préventifs de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur un modèle d'ostéoporose induite par l'ovariectomie chez la rate Wistar

#### II.2.1- Effets sur l'utérus

La Figure 27A montre les microphotographies de l'utérus après 12 semaines de traitement. Les résultats montrent que l'ovariectomie a induit une réduction significative ( $p < 0,001$ ) de la taille de l'épithélium utérin ( $2,02 \pm 0,06$ ) (Figure 27B) et de la masse relative de l'utérus frais ( $248,02 \pm 19,56$ ) (Figure 27C) comparativement au groupe SHAM. L'observation de l'épithélium utérin révèle la présence des cellules épithéliales utérines hypertrophiées, qui ont une forme cylindrique dans le groupe SHAM comparé au groupe OVX où elles possèdent une forme cubique de petite taille (Figure 27A). Les résultats montrent que, l'E<sub>2</sub>V à la dose 1 mg/kg PC a significativement ( $p < 0,01$ ) prévenu la baisse la taille de l'épithélium utérin (397,39%) et la masse relative de l'utérus frais (694,65%) comparé au groupe OVX. Les cellules épithéliales utérines sont également hypertrophiées et sont passées de la forme cubique à la forme cylindrique suite au traitement à l'E<sub>2</sub>V durant 12 semaines. L'extrait éthanolique de *L. acida* à la dose de 50 mg/kg PC tout comme l'E<sub>2</sub>V a significativement ( $p < 0,05$  ; 30,82%) prévenu la baisse de la taille de l'épithélium utérin suite à la déplétion œstrogénique post-ovariectomie. Aucune variation significative de la masse relative de l'utérus n'a été observée à toutes les doses testées (50 et 200 mg/kg PC) au terme de 12 semaines de traitement comparé au groupe OVX (Figure 27C).



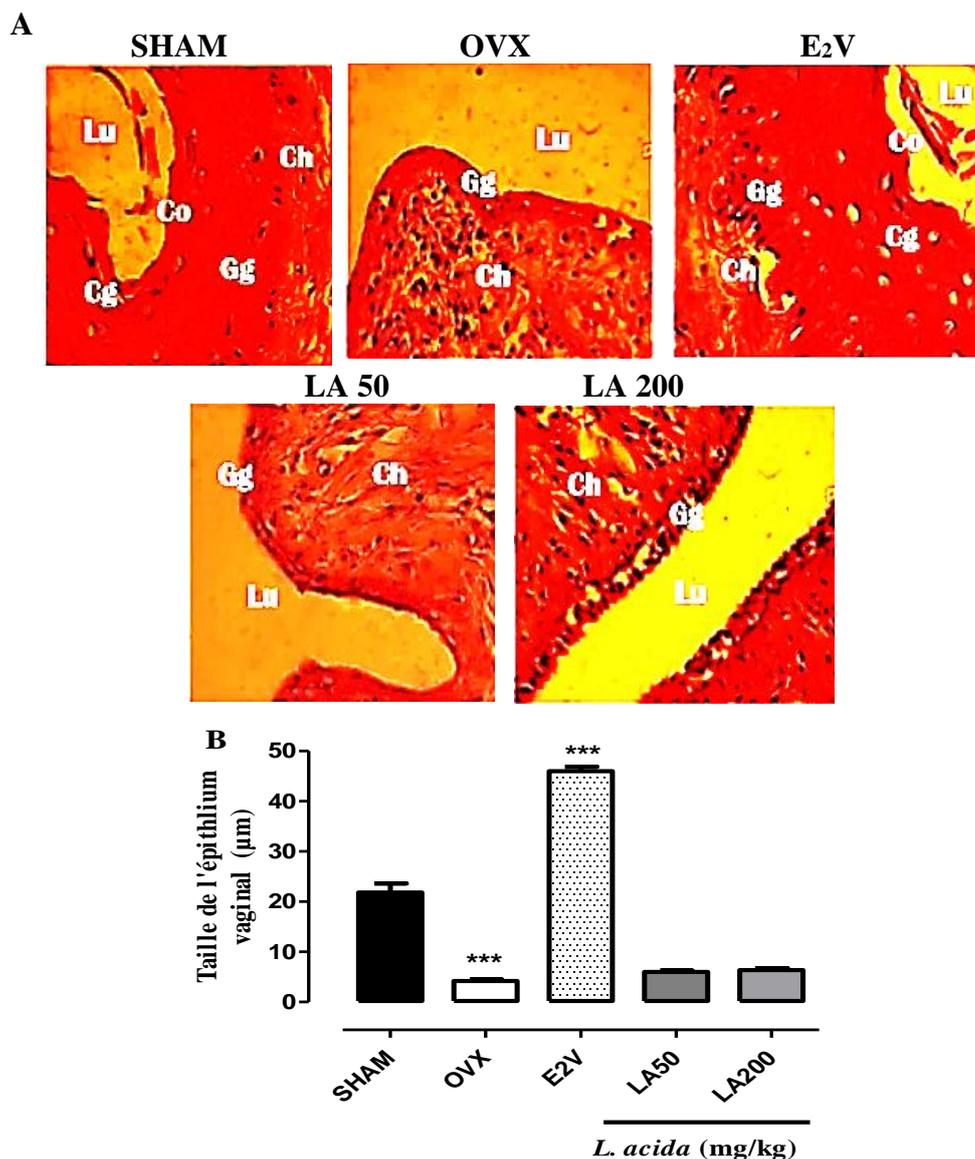
**Figure 27** : Effets à l'extrait éthanolique de *L. acida* sur l'histologie de l'utérus (A) (400, coloration à l'hématoxyline-éosine), la taille de l'épithélium utérin (B) et la masse relative de l'utérus (C) après 12 semaines de traitement.

\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,01$  (différence significative par rapport au groupe OVX). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  ESM (n = 5).

SHAM = animaux ayant subi une chirurgie blanche et recevant de l'eau distillée, OVX = animaux ovariectomisés ayant reçu de l'eau distillée, E<sub>2</sub>V = animaux ovariectomisés traités à l'œstradiol valérate à la dose de 1 mg/kg ; LA = animaux OVX traités à l'extrait à l'éthanol de *Lannea acida* aux doses de 50, 100, 200 et de 300 mg/kg PC respectivement ; Lu = lumière utérine ; En = endomètre ; My = myomètre.

### III.2. 2- Effets sur le vagin

La Figure 28 montre les effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur le vagin après 12 semaines de traitement. L'analyse des coupes histologiques du vagin montre une réduction significative ( $p < 0,001$ ) de la taille de l'épithélium vaginal (Figure 28A) chez les rates ovariectomisées comparé au groupe SHAM. La taille de l'épithélium vaginal est de  $419,40 \pm 1,82 \mu\text{m}$  chez les animaux du groupe SHAM contre  $80,74 \pm 0,29$  chez les témoins négatifs. L'histologie du vagin montre chez les rates du groupe SHAM un épithélium pluristratifié avec trois couches : une couche germinative, une couche granuleuse et une couche cornée comparé à un épithélium monostratifié (germinative) dans le groupe OVX (Figure 28B). L'E<sub>2</sub>V a significativement ( $p < 0,001$ ,  $994,73 \pm 0,85$ ) prévenu la baisse de la taille de l'épithélium vaginal par comparaison au groupe OVX. Les animaux du groupe E<sub>2</sub>V tout comme ceux du groupe SHAM possèdent un épithélium pluristratifié constitué d'une couche germinative, d'une couche granuleuse et d'une couche cornée. *Lannea acida* à toutes les doses testées (50 et 200 mg/kg PC) n'a induit aucune variation significative de la taille de l'épithélium vaginal après 12 semaines de traitement (Figure 28B).

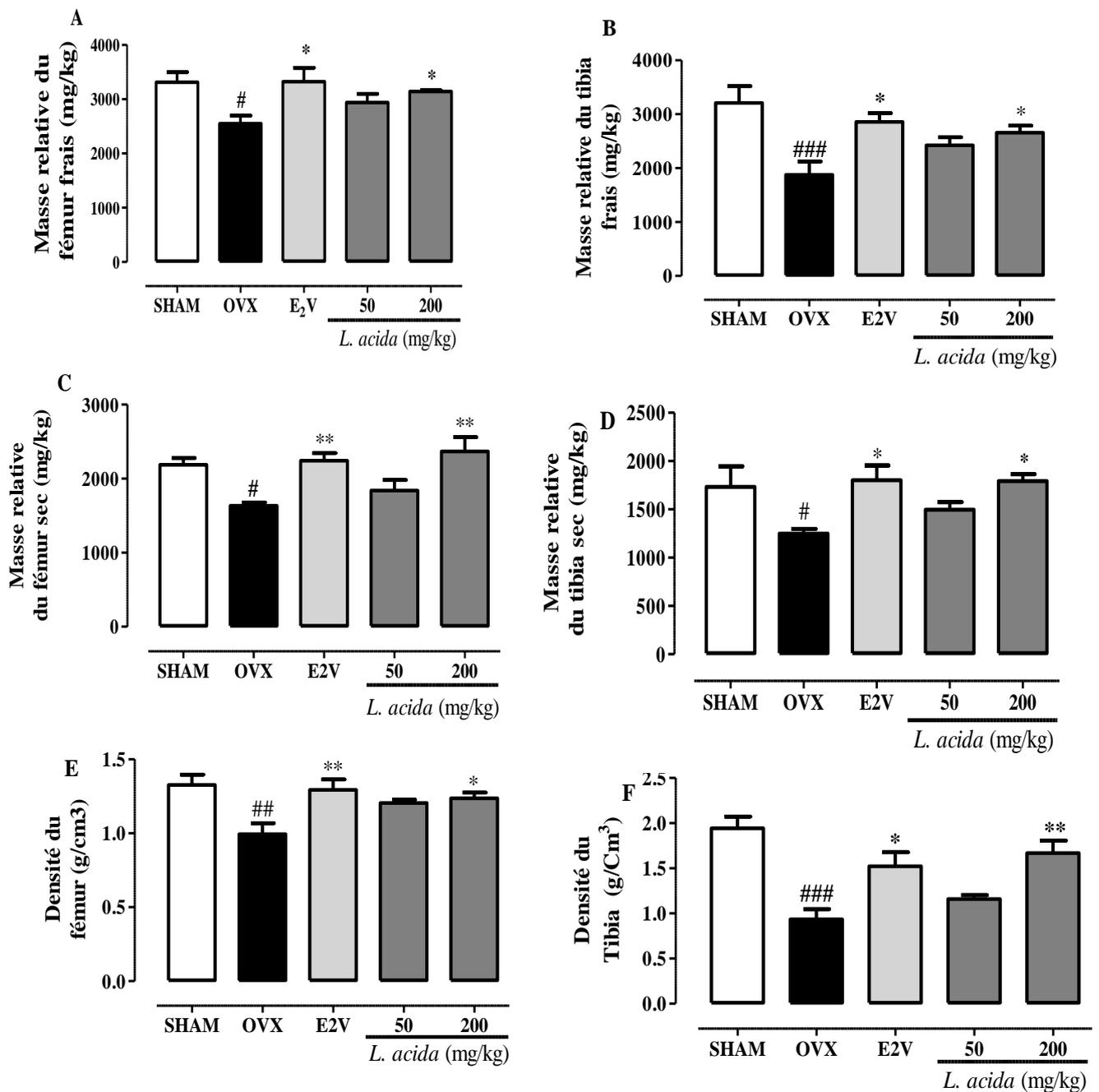


**Figure 28** : Effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur l'histologie du vagin (400, coloration à l'hématoxyline-éosine) et taille de l'épithélium vaginal (B) après 12 semaines de traitement. \*\*\*  $p < 0,001$  (différence significative par rapport au groupe OVX). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  ESM (n= 5)

SHAM = animaux ayant subis une chirurgie blanche et traités à de l'eau distillée ; OVX= animaux ovariectomisés et traités à de l'eau distillée, E<sub>2</sub>V= animaux ovariectomisés traités à l'œstradiol valérate à la dose de 1 mg/kg ; LA= animaux ovariectomisés traités à l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 50 et de 200 mg/kg PC ; Co = couche cornée ; Lu = lumière vaginale ; Cg = couche granuleuse ; Gg = Couche germinative ; Ch = chorion.

### III.2.3- Effets sur la masse relative et la densité minérale du fémur et du tibia

Les résultats consignés sur la Figure 29 montrent une réduction significative de la masse relative du fémur frais ( $p < 0,05$ ) (Figure 29A) et du tibia frais ( $p < 0,001$ ) induite par l'ovariectomie comparativement au groupe SHAM (Figure 29B).



**Figure 29 :** Effets de l'extrait éthanolique de *Lannea acida* après 12 semaines de traitement sur la masse relative du fémur [frais (A) et sec (C)], du tibia [frais (B) et sec (D)] et sur la densité minérale du fémur (E) et du Tibia (F).

SHAM = animaux ayant subi une chirurgie blanche et recevant de l'eau distillée ; OVX= animaux ovariectomisés ayant reçu de l'eau distillée, E<sub>2</sub>V = animaux ovariectomisés et traités à l'œstradiol valérate à la dose de 1 mg/kg, *L. acida* = animaux ovariectomisés et traités à l'extrait éthanolique de *Lannea acida* aux doses de 50 et de 200 mg/kg PC. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  (différence significative par rapport au groupe OVX) ; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  (différence significative par rapport au groupe SHAM). Les données sont exprimées sous forme de moyenne ± ESM (n = 5).

L'ovariectomie a également induit une réduction significative ( $p < 0,05$ ) de la masse relative du fémur sec (Figure 36C) et du tibia sec (Figure 36D). Une réduction significative de la densité minérale du fémur (33,78% ;  $p < 0,01$ ) (Figure 38E) et du tibia (38,83%,  $p < 0,001$ ) (Figure 36F) a été observée chez les rates ovariectomisées comparé au groupe SHAM. L'E<sub>2</sub>V à la dose de 1 mg/kg PC a prévenu la diminution ( $p < 0,05$ ) de la masse relative du fémur et du tibia (frais et secs) ainsi que de leurs densités minérales (fémur et tibia). L'extrait éthanolique de *L. acida* à la dose 200 mg/kg PC tout comme l'E<sub>2</sub>V a prévenu la réduction ( $p < 0,05$ ) de la masse relative du tibia (frais et sec), du fémur (frais et sec) ainsi que de la densité minérale du fémur et du tibia comparativement au groupe OVX.

#### III.2.4- Effets sur quelques biomarqueurs du métabolisme osseux

Le tableau XVI récapitule les effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* après 12 semaines de traitement sur les biomarqueurs du métabolisme osseux. L'ovariectomie a significativement augmenté (42,29% ;  $p < 0,001$ ) l'activité de la phosphatase alcaline sérique (ALPser) comparé au groupe SHAM. Comparé au groupe OVX, l'E<sub>2</sub>V a prévenu l'augmentation (21, 29%,  $p < 0,05$ ) de l'activité de l'ALPser. L'extrait éthanolique de *L. acida* à la dose de 50 mg/kg comme l'E<sub>2</sub>V a empêché l'augmentation (31,49%,  $p < 0,001$ ) de l'activité de l'ALPser. Aucune variation significative n'a été observée à la dose de 200 mg/kg PC.

L'ovariectomie n'a induit aucune variation significative du taux du calcium dans le tibia et le fémur. L'OVX a induit une réduction significative (60,22% ;  $p < 0,001$ ) du taux du phosphore inorganique dans le tibia ainsi qu'une réduction bien que non significative (28,57% ;  $p > 0,05$ ) dans le fémur comparativement au groupe SHAM. L'E<sub>2</sub>V a prévenu la baisse (73,03%,  $p < 0,05$ ) du taux du phosphore inorganique dans le fémur par comparaison au groupe OVX. L'extrait éthanolique de *L. acida* à la dose de 200 mg/kg PC a prévenu la réduction ( $p < 0,05$ ) des taux du calcium [dans le fémur] et du phosphore inorganique [dans le fémur (50,86%,  $p < 0,05$ ) et dans le tibia] (61,27% ;  $p < 0,05$ ) par comparaison au groupe OVX (Tableau XVI).

**Tableau XVI** : Effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur quelques biomarqueurs du métabolisme osseux après 12 semaines de traitement sur des rates ovariectomisées

Paramètres	rates ovariectomisées				
	SHAM	OVX	E <sub>2</sub> V	<i>Lannea acida</i> (mg/kg PC)	
				50	200
<b>Phosphatase Alcaline (UI/L)</b>	5,030 ± 0,456	8,720 ± 0,618####	6,860 ± 0,377 *	5,6300 ± 0,096***	7,560 ± 0,330
<b>Calcium (mmol /L)</b>					
Tibia	0,045 ± 0,007	0,028 ± 0,003	0,050 ± 0,011	0,038 ± 0,004	0,028 ± 0,005
Fémur	0,030 ± 0,004	0,028 ± 0,002	0,025 ± 0,006	0,032 ± 0,002	0,043 ± 0,005*
<b>Phosphore Inorganique (mmol/L)</b>					
Tibia	7,240 ± 0,622	2,880 ± 0,122 ####	3,990 ± 0,347	3,230 ± 0,756	4,640 ± 0,344*
Femur	3,990 ± 0,540	2,850 ± 0,384	4,930 ± 0,697*	2,720 ± 0,182	4,300 ± 0,482*

Les données sont exprimées sous forme de moyenne ± ESM (n = 5) ; \*  $p < 0,05$  et \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (différences significatives par rapport au groupe OVX) ; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  (différences significatives par rapport au groupe SHAM).

SHAM = animaux ayant subis une chirurgie blanche ayant reçu de l'eau distillée, OVX = animaux ovariectomisés ayant reçu de l'eau distillée ; E<sub>2</sub>V= animaux ovariectomisés traités à l'œstradiol valérate à la dose de 1 mg/kg ; *L. acida* = animaux ovariectomisés traités à l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 50 et 200 mg/kg PC.

## II.2.5- Effets sur les paramètres hématologiques

Le tableau XVII récapitule les effets de l'extrait éthanolique des écorces du tronc de *L. acida* sur les paramètres hématologiques. Au terme de 12 semaines de traitement, les résultats montrent des augmentations significatives des pourcentages de lymphocytes et de l'hématocrite ( $p < 0,01$ ), des taux de globules rouges ( $p < 0,01$ ) et de l'hémoglobine ( $p < 0,05$ ) chez les rates ovariectomisées comparativement au groupe SHAM. L'E<sub>2</sub>V a induit une augmentation significative ( $p < 0,01$ ) du pourcentage de l'hématocrite comparé au groupe OVX. L'extrait éthanolique de *L. acida* à la dose de 50 mg/kg PC, a induit des réductions significatives ( $p < 0,01$ ) du taux d'hémoglobine et du pourcentage de l'hématocrite. *L. acida* à la dose de 200 mg/kg a également induit des réductions significatives des pourcentages des lymphocytes ( $p < 0,01$ ), de l'hématocrite ( $p < 0,05$ ) et une augmentation significative du pourcentage des granulocytes ( $p < 0,05$ ) comparés au groupe OVX (tableau XVII).

**Tableau XVII** : Effets de l'extrait éthanolique de *Lansea acida* sur quelques paramètres hématologiques après 12 semaines de traitement sur des rates ovariectomisées

Items	rates ovariectomisées				
	SHAM	OVX	E <sub>2</sub> V	<i>Lansea acida</i> (mg/kg PC)	
				50	200
GB (10 <sup>3</sup> /μL)	4,02 ± 0,42	4,00 ± 0,21	5,62 ± 0,80	2,48 ± 0,14	5,58 ± 0,54
Lymphocytes (%)	74,42 ± 1,77	83,06 ± 0,46 <sup>##</sup>	82,60 ± 1,59	85,46 ± 1,148	73,80 ± 2,46 <sup>**</sup>
Monocytes (%)	13,52 ± 2,14	10,10 ± 0,33	10,86 ± 0,98	9,05 ± 0,74	11,82 ± 0,99
Granulocytes (%)	10,15 ± 1,58	7,76 ± 0,83	10,32 ± 1,42	5,50 ± 0,55	13,70 ± 1,69 <sup>*</sup>
GR (10 <sup>6</sup> /μL)	3,65 ± 0,83	7,41 ± 0,18 <sup>##</sup>	4,97 ± 0,85	4,99 ± 0,99	6,24 ± 0,28
Hématocrite (%)	25,56 ± 2,99	41,72 ± 1,09 <sup>##</sup>	31,93 ± 3,02 <sup>**</sup>	31,60 ± 1,92 <sup>**</sup>	33,48 ± 1,30 <sup>*</sup>
Hémoglobine (g/dL)	10,48 ± 0,57	14,60 ± 0,54 <sup>#</sup>	13,32 ± 0,09	9,56 ± 1,70 <sup>**</sup>	11,40 ± 0,44
VCM (fL)	67,80 ± 5,94	56,80 ± 0,58	70,20 ± 7,27	54,20 ± 0,66	68,20 ± 11,84
HCM (pg)	36,38 ± 8,40	19,62 ± 0,38	32,80 ± 7,35	20,20 ± 1,03	39,92 ± 16,96
CHCM (g/dL)	50,45 ± 7,21	34,90 ± 0,58	44,00 ± 4,94	37,20 ± 1,60	48,68 ± 11,32
PS (10 <sup>3</sup> /μL)	343,00 ± 42,97	338,80 ± 26,36	485,00 ± 53,95	241,20 ± 45,33	483,00 ± 17,68

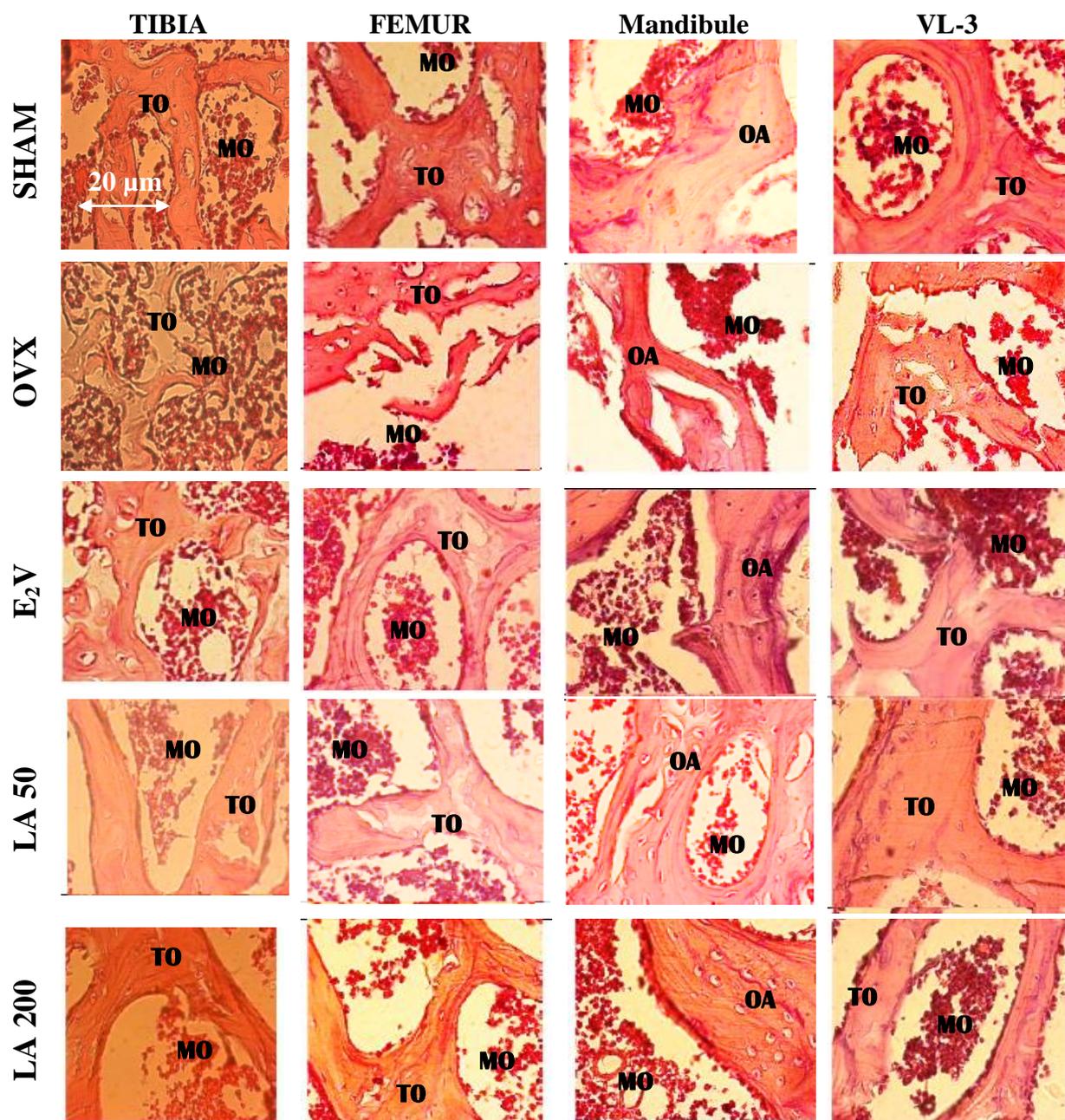
Les données ont été exprimées sous forme de moyenne ± ESM (n = 5), \*  $p < 0,05$  et \*\*  $p < 0,01$  (différence significative par rapport au groupe OVX) et #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  (différence significative par rapport au groupe SHAM).

SHAM = animaux ayant subi une chirurgie blanche et recevant de l'eau distillée ; OVX= animaux ovariectomisés ayant reçu de l'eau distillée ; E<sub>2</sub>V = animaux ovariectomisés traités à l'œstradiol valérate à la dose de 1 mg/kg, *L. acida* = animaux OVX traités à l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 50 et de 200 mg/kg PC. GB = globules blancs, GR = globules rouge, VCM= volume corpusculaire moyen, HCM = hémoglobine corpusculaire moyenne, CHCM = concentration en hémoglobine corpusculaire moyenne, PS = plaquettes sanguines ;

### III.2.6- Effets sur la microarchitecture des os

Les résultats consignés dans la Figure 30 illustrent les effets de différents traitements sur les microarchitectures du fémur, du tibia, de la vertèbre lombaire numéro -3 (VL-3) et de l'os mandibulaire des rates après 12 semaines de traitement.

L'analyse histomorphologique de la structure des os, a révélé que l'ovariectomie a induit la détérioration de la microarchitecture du tibia, du fémur, de l'os mandibulaire et de la troisième vertèbre lombaire (VL-3) comparé au groupe SHAM. Cette détérioration est caractérisée par la présence des lacunes de résorption, une diminution de la quantité de moelle osseuse ainsi qu'une détérioration du réseau trabéculaire. Au terme de 84 jours d'expérimentation l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 50 et de 200 mg/ kg PC comme l'E<sub>2</sub>V (1mg/kg) a protégé de la détérioration de la structure du tibia, du fémur, de l'os mandibulaire et de la VL-3. L'histomorphologie des os (tibia, du fémur, de l'os mandibulaire et de la VL-3) montre un réseau trabéculaire bien structuré contenant une grande quantité de moelle osseuse par comparaison au groupe OVX (Figure 30).



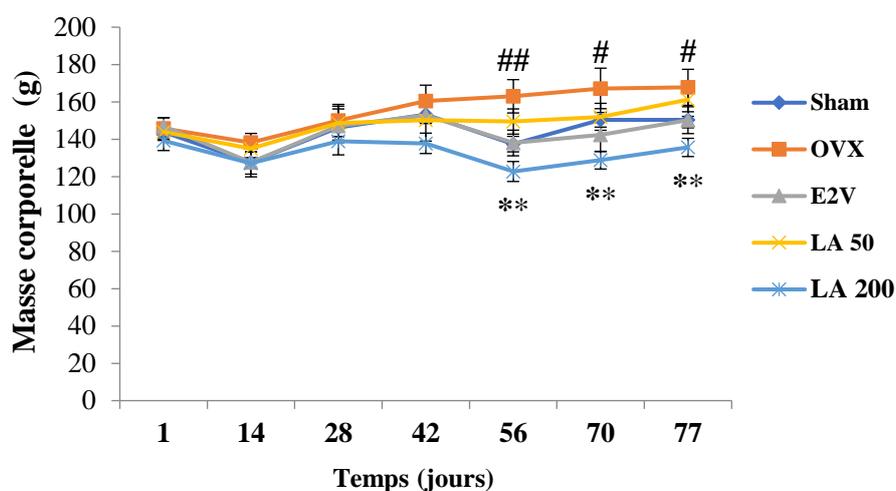
**Figure 30** : Effets protecteurs de l'extrait éthanolique de *Lannea acida* sur la microarchitecture du tibia, du fémur, de la mandibule et de la VL-3 des rates après 12 semaines de traitement. Microphotographies (400, coloration à l'hématoxyline-éosine).

SHAM = animaux ayant subi une chirurgie blanche et recevant de l'eau distillée, OVX = animaux ovariectomisés traités à de l'eau distillée ; E<sub>2</sub>V= animaux ovariectomisés, traités à l'œstradiol valérate à la dose de 1 mg/kg ; LA = animaux ovariectomisés et traités à l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 50 et de 200 mg/kg PC respectivement ; MO = Moelle osseuse, TO = travée osseuse, OA = os alvéolaire.

### III.2.7- Effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur d'autres paramètres chez les rates ovariectomisées

#### III.2.7.1- Effets sur l'évolution pondérale

La Figure 31 ci-dessous montre l'évolution de la masse corporelle des rates après 12 semaines de traitement à l'extrait éthanolique de *Lannea acida*. Cette figure montre que la déplétion œstrogénique post-ovariectomie a entraîné une augmentation significative ( $p < 0,01$ ) de la masse corporelle des animaux de la 8<sup>e</sup> semaine jusqu'à la fin de l'expérimentation comparé au groupe SHAM. *L. acida* à la dose de 200 mg/kg a significativement ( $p < 0,01$ ) réduit la masse corporelle des animaux dès la huitième semaine jusqu'à la fin de l'expérimentation par comparaison au groupe OVX (Figure 31).



**Figure 31** : Effets de l'extrait éthanolique de *Lannea acida* sur l'évolution de la masse corporelle des rates après 12 semaines de traitement.

Les points représentent les masses moyennes  $\pm$  ESM ( $n = 5$ ). SHAM = animaux ayant subi une chirurgie blanche et recevant de l'eau distillée ; OVX = animaux ovariectomisés et recevant de l'eau distillée ; E<sub>2</sub>V = animaux ovariectomisés traités à l'œstradiol valérate à la dose de 1 mg/kg ; LA = animaux ovariectomisés et traités à l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 50 et de 200 mg/kg PC ; \*\*  $p < 0,01$  (différence significative par rapport au groupe OVX) ; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  (différence significative par rapport au groupe SHAM).

#### III.2.7.2- Effets sur la masse relative des organes

Le tableau VIII récapitule les effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur la masse relative du foie, du poumon, du rein, du cœur, de l'estomac, de la rate et la glande surrénale après 12 semaines de traitement. Aucune variation significative de la masse relative de ces organes n'a été observée chez les rates ovariectomisées par comparaison au groupe SHAM. L'extrait de *L. acida* aux doses testées (50 et 200 mg/kg) n'a induit aucune variation significative de la masse relative de tous les organes en comparaison au groupe OVX (Tableau VIII)

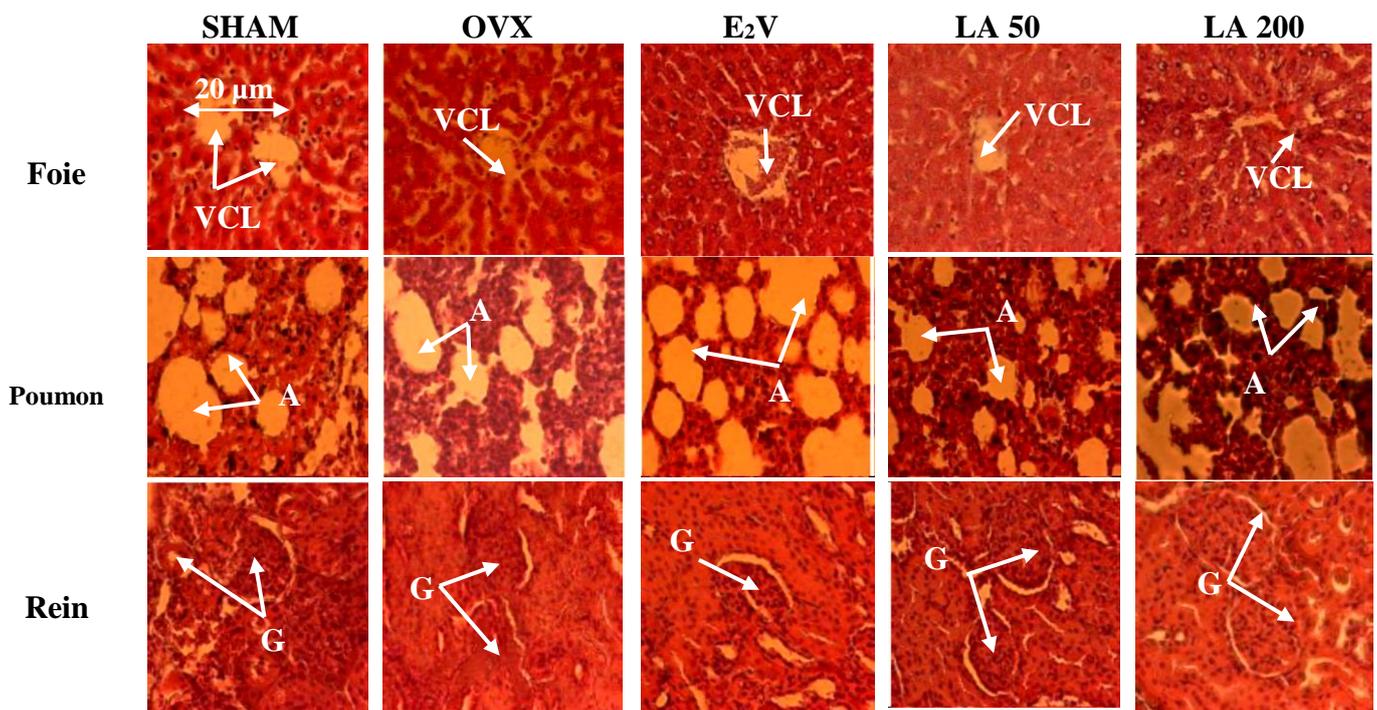
**Tableau XVIII** : Effets préventifs de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur la masse relative des organes après 12 semaines de traitement.

Masse relative des organes (mg/kg PC)	Rats ovariectomisés				
	SHAM	OVX	E <sub>2</sub> V	<i>Lannea acida</i> (mg/kg PC)	
				50	200
<b>Foie</b>	1688,98 ± 67,58	1436,49 ± 70,03	1456,36 ± 91,42	1518,82 ± 90,88	1087,57 ± 99,27
<b>Poumon</b>	413,74 ± 35,44	399,40 ± 28,08	380,60 ± 54,25	426,30 ± 13,91	496,40 ± 70,14
<b>Rein</b>	270,87 ± 21,16	245,23 ± 9,21	253,98 ± 21,28	249,12 ± 13,47	230,18 ± 13,09
<b>Estomac</b>	550,71 ± 18,50	550,74 ± 25,19	562,66 ± 38,20	583,68 ± 25,03	491,26 ± 46,67
<b>Rate</b>	0,88 ± 0,07	0,87 ± 0,04	0,74 ± 0,08	1,13 ± 0,19	1,16 ± 0,19
<b>Surrénales</b>	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,03
<b>Cœur</b>	3115,01 ± 24,67	3377,75 ± 106,03	3089,41 ± 108,23	3352,12 ± 112,11	3419,35 ± 76,42

Les données ont été exprimées sous forme de moyenne ± ESM (n = 5), SHAM = animaux ayant subi une chirurgie blanche et recevant de l'eau distillée ; OVX= animaux ovariectomisés et ayant reçu de l'eau distillée ; E<sub>2</sub>V = animaux OVX, traités à l'œstradiol valérate à la dose de 1 mg/kg ; *L. acida* = animaux OVX traités à l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 50 et de 200 mg/kg PC respectivement ; \*  $p < 0,05$  et \*\*  $p < 0,01$  (différence significative par rapport au groupe OVX).

### III.2.7.3- Effets sur l'histomorphologie des organes de la détoxification

La Figure 32 montre les effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur l'histomorphologie du foie, du poumon et du rein des animaux après 12 semaines de traitement. Après autopsie l'examen macroscopique du foie, des reins et des poumons n'a révélé aucune anomalie structurale. L'examen histopathologique de la structure des organes des animaux du groupe OVX n'a révélé aucune anomalie liée aux traitements. L'examen histopathologique de la microarchitecture du foie, des reins et des poumons des animaux recevant l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 50 et de 200 mg/kg PC) tout comme l'E<sub>2</sub>V n'a montré aucun changement structural au terme de 12 semaines de traitement par comparaison au groupe OVX.



**Figure 32 :** Effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur l'histomorphologie du foie, du poumon et du rein des animaux après 12 semaines de traitement. Microphotographies (400, coloration à l'hématoxyline-éosine).

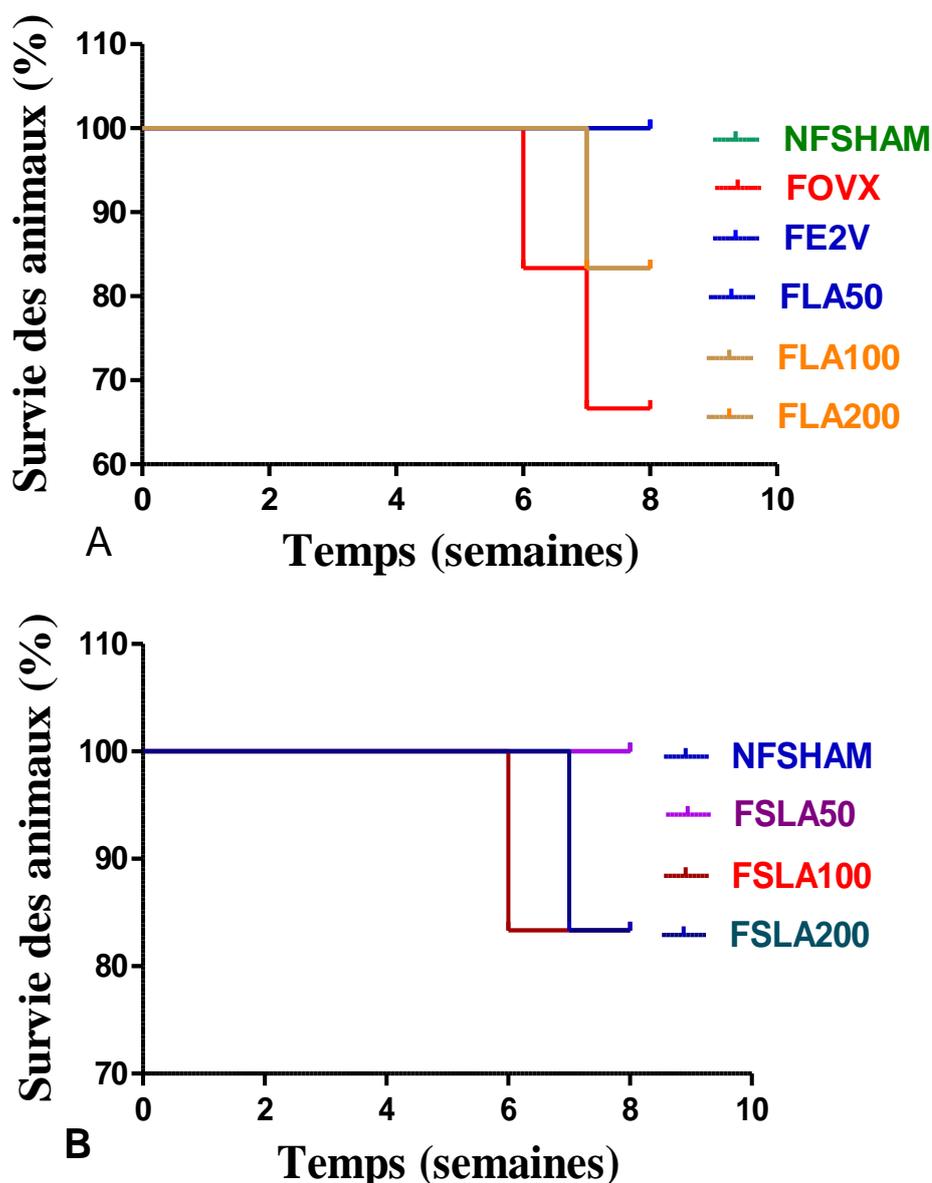
SHAM = animaux ayant subi une chirurgie blanche et recevant de l'eau distillée ; OVX = animaux ovariectomisés et ayant reçu de l'eau distillée ; E<sub>2</sub>V = animaux ovariectomisés et traités avec l'œstradiol valérate à la dose de 1 mg/kg, LA = animaux ovariectomisés et traités à l'extrait de *L. acida* aux doses respectives de 50 et de 200 mg/kg PC ; VCL = veine centro-lobulaire ; A = alvéole pulmonaire, G = glomérule.

### III.3- Effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur la cicatrisation de la fracture du fémur induite chez la rate Wistar

#### III.3.1- Effets sur la survie des animaux

La Figure 33 représente la courbe de KOPLAN Meir indiquant le taux de survie des animaux après induction de la fracture du fémur. On y observe chez les animaux ovariectomisés et fracturés (recevant de l'eau distillée) un taux de survie d'environ 65% contre 100% chez le témoin normal (non fracturé SHAM). L'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 100 et de 200 mg/kg PC a protégé environ 85% rates ovariectomisées. *L. acida* à la dose de 50 mg/kg tout comme l'E<sub>2</sub>V (1mg/kg) a protégé tous les animaux ovariectomisés (ayant subi une fracture du fémur), soit 100% de survie par comparaison au groupe témoin négatif (FOVX). Chez les animaux non ovariectomisés (normaux), l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 100 et de 200 mg/kg, a induit un taux de survie d'environ 85% contre 100% chez le témoin normal

(NFSHAM). *L. acida* à la dose de 50 a présenté un taux de survie de 100% tout comme le témoin normal (Figure 40B).



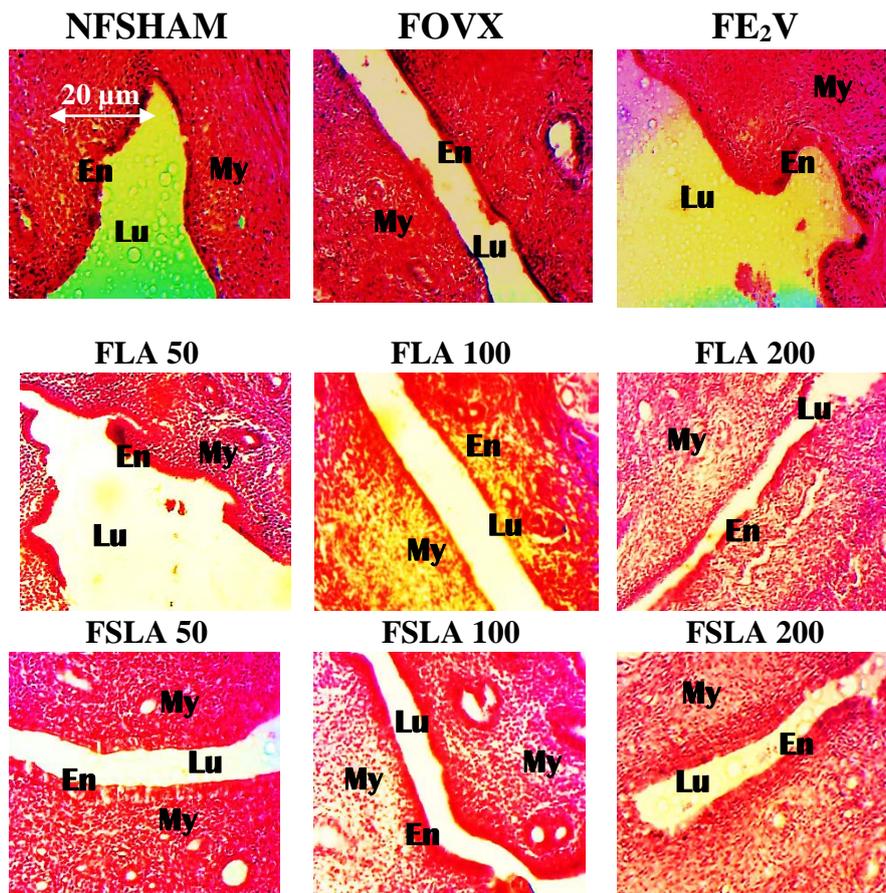
**Figure 33 :** Courbe de KOPLAN Meir présentant la survie des rates après induction de la fracture du fémur.

NFSHAM = animaux non fracturés ayant subi une chirurgie blanche (témoin normal) ; FOVX= animaux ovariectomisés et fracturés ayant reçu de l'eau distillée (témoin négatif), FE<sub>2</sub>V= animaux OVX fracturés et traités avec l'œstradiol valérate à la dose de 1 mg/kg; FLA 50, FLA 100 et FLA 200 = animaux OVX, fracturés et traités à l'extrait éthanolique de *L.acida* respectivement aux doses de 50, 100 et de 200 mg/kg PC ; FSLA 50, FSLA 100 et FSLA 200 = animaux SHAM-fracturés et traités à l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses respectives de 50, 100 et de 200 mg/kg PC.

### III.3.2- Effets sur quelques cibles primaires des œstrogènes

#### III.3.2.1- Effets sur l'utérus

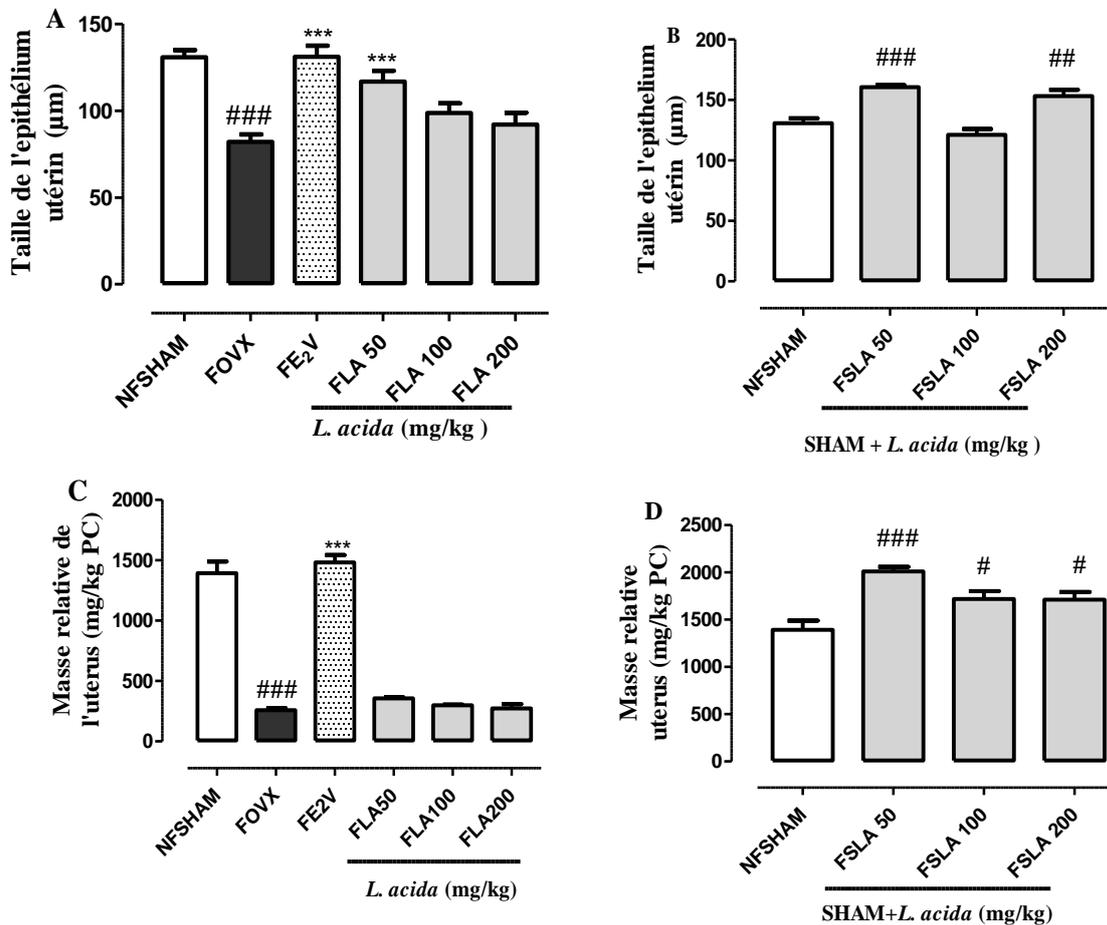
Les Figures 34 et 35 montrent respectivement les effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* administré pendant 60 jours sur l'histologie (Figure 34), la masse et la taille (Figure 35) de l'utérus des animaux OVX et normaux après une fracture du fémur. Les résultats montrent une réduction significative de la taille de l'épithélium utérin chez les témoins négatifs comparativement au témoin normal (NFSHAM) (Figure 35A).



**Figure 34** : Effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur les microphotographies (400, coloration à l'hématoxyline-éosine) de l'utérus.

NFSHAM = animaux non fracturés ayant subis une chirurgie blanche et recevant de l'eau distillée (témoin normal), FOVX = animaux ovariectomisés et fracturés ayant reçu de l'eau distillée (témoin négatif), FE<sub>2</sub>V= animaux OVX-fracturés, et recevant l'œstradiol valérate à la dose de 1 mg/kg (témoin positif); FLA50, FLA100 et FLA200 = animaux OVX et fracturés traités à l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 50, 100 et de 200 mg/kg PC respectivement; FSLA 50, FSLA 100 et FSLA 200 = animaux ayant subi une chirurgie blanche et fracturés traités à l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 50, 100 et de 200 mg/kg PC respectivement ; My = myomètre ; En = endothélium ; Lu = lumière utérine.

L'extrait éthanolique de *L. acida* à la dose de 50 mg/kg tout comme l'E<sub>2</sub>V (1mg/kg) a induit une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) de la taille de l'épithélium utérin comparé témoin négatif (Figure 35A). Chez les SHAM-fracturés (normaux), *L. acida* a induit une augmentation significative de la taille de l'épithélium utérin aux doses de 50 mg/kg ( $p < 0,001$ ) et de 200 mg/kg PC ( $p < 0,05$ ) par comparaison au témoin normal (Figure 35B).



**Figure 35 :** Effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur la taille de l'épithélium utérin (A et B) et la masse relative de l'utérus des rates OVX (C) et normales (D), après une fracture du fémur suivie d'un traitement pendant 60 jours.

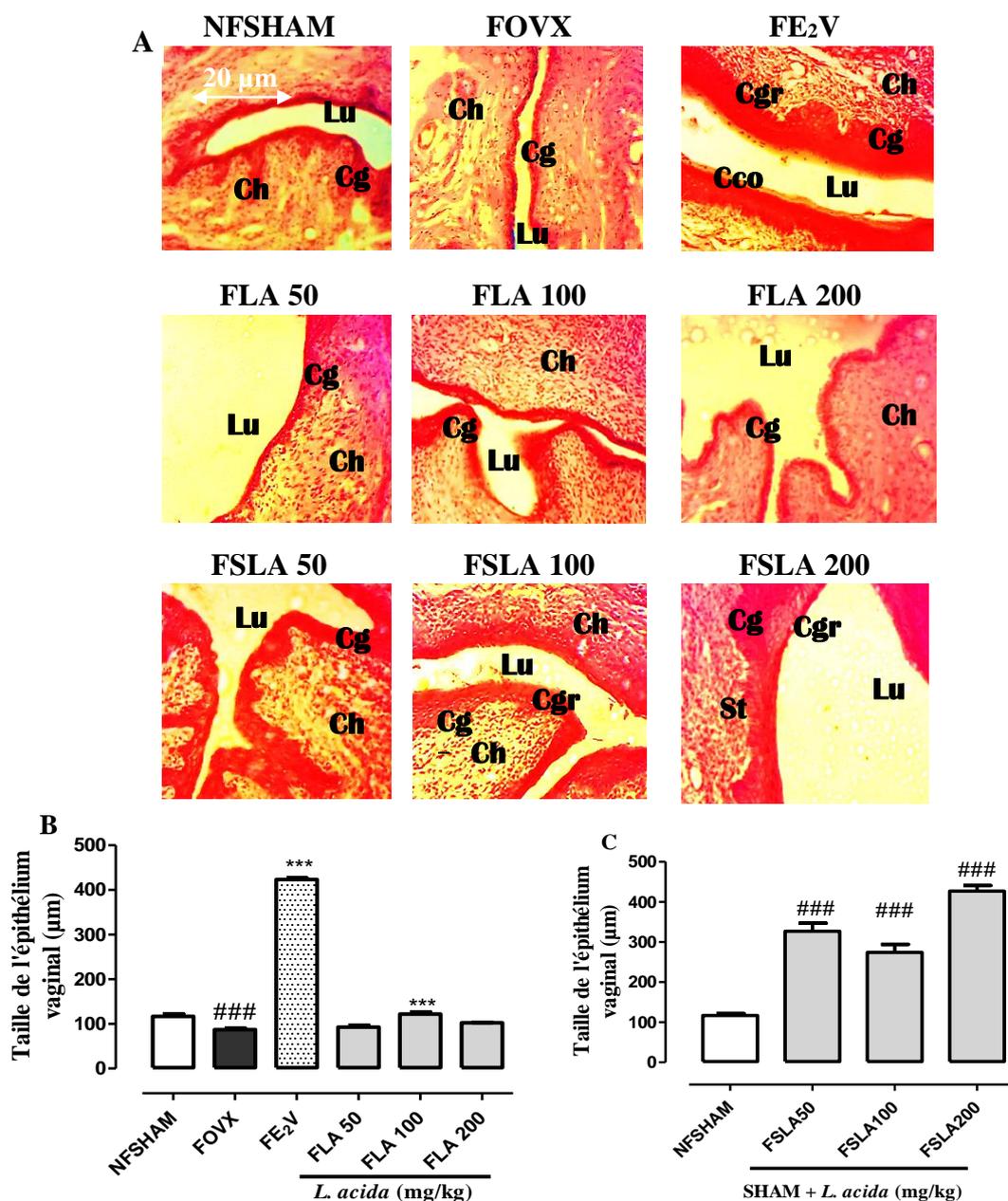
NFSHAM = animaux non fracturés ayant subis une chirurgie blanche et recevant de l'eau distillée (témoin normal), FOVX = animaux ovariectomisés et fracturés ayant reçu de l'eau distillée (témoin négatif) ; FE<sub>2</sub>V = animaux ovariectomisés et fracturés, traités à l'œstradiol valérate à la dose de 1 mg/kg (témoin positif); FLA50, FLA100 et FLA200 = animaux ovariectomisés et fracturés traités à l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 50, 100 et de 200 mg/kg PC respectivement; FSLA50, FSLA100 et FSLA200 = animaux ayant subis une chirurgie blanche et fracturés traités à l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 50, 100 et 200 mg/kg PC respectivement. Les données sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  ESM ( $n= 5$ ) ; \*\*\*  $p < 0,001$  (différence significative par rapport au témoin négatif), #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  (différence significative par rapport au témoin normal).

Concernant la masse relative de l'utérus, l'ovariectomie a induit une réduction significative ( $p < 0,001$ ) de la masse relative de l'utérus comparativement au témoin normal (Figure 35C). Aucune variation significative de la masse relative de l'utérus n'a été observée chez les animaux OVX, fracturés et traités à l'extrait éthanolique de *L. acida* à toutes les doses testées (50, 100 et 200 mg/kg PC) comparé au témoin négatif. Chez les normaux (NFHAM), *L. acida* a induit une augmentation significative de la masse relative de l'utérus aux doses de 50 mg/kg ( $p < 0,001$ ), 100 mg/kg ( $p < 0,05$ ) et de 200 mg/kg ( $p < 0,05$ ) par comparaison au témoin normal (NFHAM) (Figure 35D).

### III.3.2.2- Effets sur le vagin

La Figure 36 montre les effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* administré pendant 60 jours sur le vagin des animaux OVX et normaux après une fracture du fémur. L'observation microscopique des coupes montre chez le témoin négatif une seule couche (la couche germinative). L'épithélium vaginal des animaux recevant *L. acida* à la dose de 100 mg/kg montre deux couches, une couche germinative et une couche granuleuse (Figure 36A). L'ovariectomie a induit une réduction significative ( $p < 0,001$ ) de la taille de l'épithélium vaginal comparé aux animaux normaux (NFHAM) (Figure 36B). *L. acida* à la dose de 100 mg/kg tout comme l'E<sub>2</sub>V a entraîné une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) de la taille de l'épithélium vaginal comparativement au témoin négatif (FOVX).

Chez les normaux, *L. acida* a induit à toutes les doses testées (50, 100 et 200 mg/kg), une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) de la taille de l'épithélium vaginal comparé au témoin normal (NFHAM) (Figure 36C).

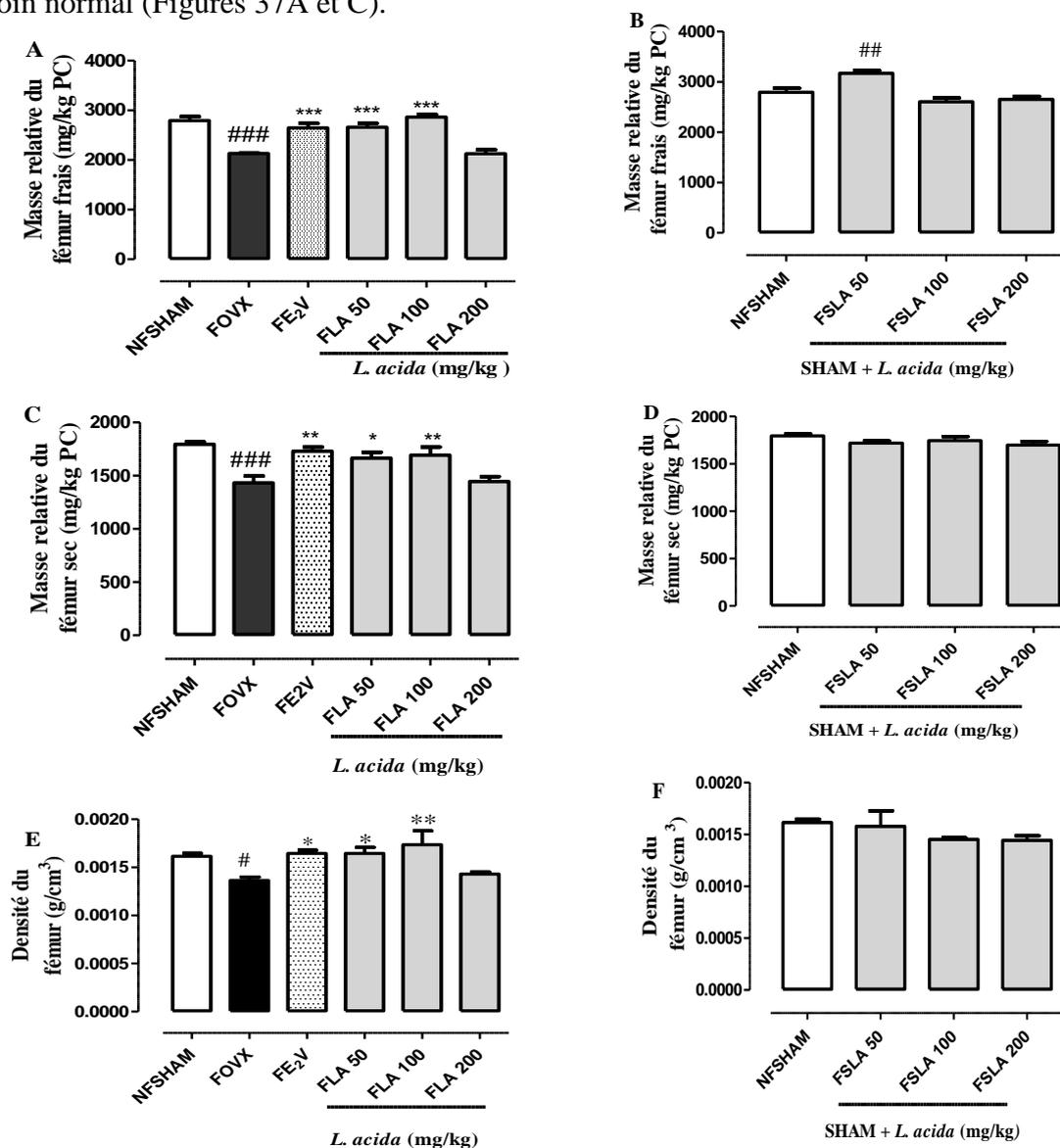


**Figure 36** : Effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur le vagin après induction de la fracture suivie d'un traitement pendant 60 jours. Microphotographies (A) (400, coloration à l'hématoxyline-éosine, n = 5). Les histogrammes représentent la taille de l'épithélium vaginal chez les animaux ovariectomisés (B) et chez les animaux normaux (C).

NFSHAM = animaux non fracturés ayant subi une chirurgie blanche et recevant de l'eau distillée (témoin normal) ; FOVX = animaux OVX-fracturés et recevant de l'eau distillée (témoin négatif) ; FE<sub>2</sub>V= animaux OVX-fracturés et recevant l'oestradiol valérate à la dose de 1 mg/kg ; FLA = animaux OVX-fracturés et recevant l'extrait éthanolique de *L.acida* aux doses de 50, 100 et de 200 mg/kg PC ; FSLA= animaux SHAM-fracturés et recevant l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 50, 100 et de 200 mg/kg PC respectivement ; Ch = chorion ; Lu = lumière vaginale ; Cg = couche germinale ; Cgr = couche granulaire ; Cco = couche cornée. Les données sont exprimées sous forme de moyenne ± ESM ; \*\*\*  $p < 0,001$  (différence significative par rapport au témoin négatif) ; ###  $p < 0,001$  (différence significative par rapport au témoin normal).

### III.3.3- Effets sur la masse relative du fémur (frais et sec) et la densité minérale du fémur

Les résultats présentés sur la Figure 37 montrent que l'ovariectomie a induit une réduction significative ( $p < 0,001$ ) de la masse relative du fémur (frais et sec) comparé au témoin normal (Figures 37A et C).



**Figure 37** : Effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur la masse relative du fémur frais (A et B), du fémur sec (C et D) et de la densité du fémur (E et F).

NFSHAM = animaux non fracturés ayant subis une chirurgie blanche et recevant de l'eau distillée (témoin normal), FOVX = animaux OVX-fracturés et recevant de l'eau distillée (témoin négatif), FE<sub>2</sub>V = animaux OVX-fracturés traités à l'œstradiol valérate à la dose de 1 mg/kg; FLA = animaux OVX-fracturés traités à l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 50, 100 et de 200 mg/kg PC ; FSLA = animaux SHAM-fracturés et traités à l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 50, 100 et de 200 mg/kg PC respectivement. Les données sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  ESM (n= 5). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (différence significative par rapport au témoin négatif) ; #  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  (différence significative par rapport au témoin normal).

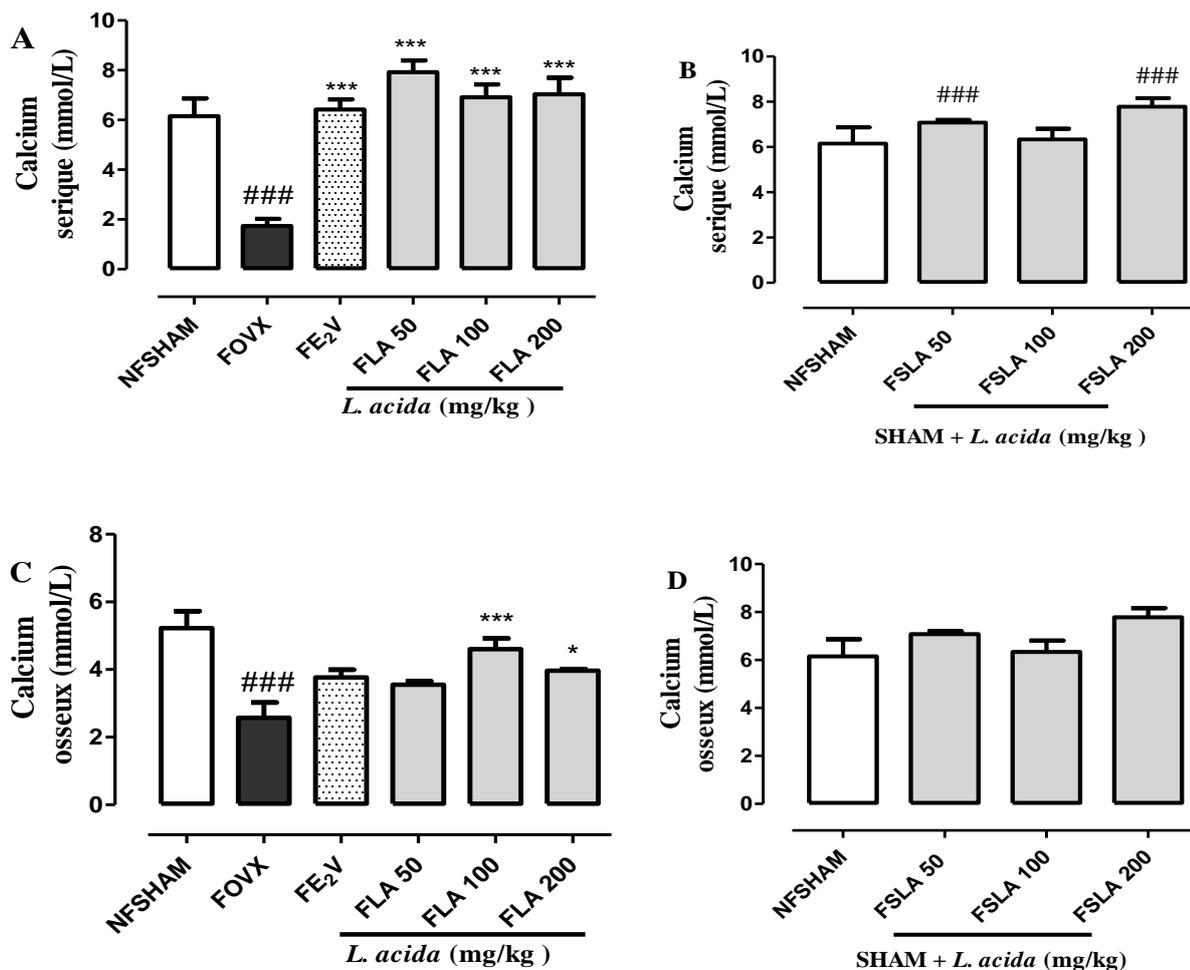
L'extrait éthanolique de *L. acida* a induit une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) de la masse relative du fémur frais aux doses de 50 mg/kg, 100 mg/kg et de 200 mg/kg et de la masse relative du fémur sec à toutes les doses testées (50, 100 et 200 mg/kg PC) par comparaison au témoin négatif (Figures 37A et 37C). Chez les normaux, *L. acida* à la dose de 50 mg/kg a induit une augmentation significative ( $p < 0,01$ ) de la masse relative du fémur frais comparé au témoin normal. Aucune variation significative n'a été observée concernant la masse relative du fémur sec (Figures 37B et 37D).

Concernant la densité minérale osseuse, l'ovariectomie a induit (chez le témoin négatif) une réduction significative ( $p < 0,05$ ) de la densité minérale du fémur par comparaison au témoin normal (Figure 37E). *L. acida* tout comme l'E<sub>2</sub>V a induit une augmentation significative de la densité minérale du fémur aux doses de 50 mg/kg ( $p < 0,05$ ) et de 100 mg/kg ( $p < 0,01$ ) comparé au témoin normal. Chez les normaux aucune variation significative de la densité minérale du fémur n'a été observée après traitement à l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses testées (50,100 et 200 mg/kgPC) comparé au témoin normal (Figure 37F).

### **III.3.4- Effets sur quelques paramètres du métabolisme osseux**

#### **III.3.4.1- Effets sur le taux de calcium sérique et osseux**

La Figure 38 illustre les taux de calcium sérique et osseux chez les animaux OVX, fracturés. Les résultats montrent une réduction significative ( $p < 0,001$ ) du taux de calcium sérique et osseux chez le témoin négatif en comparaison au témoin normal (Figures 38A et C). L'administration de l'E<sub>2</sub>V (1 mg/kg) d'une part et de l'extrait éthanolique de *L. acida* à toutes les doses testées (50, 100 et 200 mg/kg PC) d'autre part a induit chez les animaux ovariectomisés et fracturés, une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) du taux de calcium sérique par comparaison au témoin négatif (Figure 38A). L'extrait éthanolique de *L. acida* a provoqué une augmentation significative du taux de calcium osseux aux doses de 100 mg/kg (92,3% ;  $p < 0,001$ ) et de 200 mg/kg (53,5%  $p < 0,05$ ) par rapport au témoin négatif (Figure 38C). Chez les normaux, *L. acida* a induit une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) du taux de calcium sérique aux doses de 50 mg/kg et de 200 mg/kg par comparaison au témoin normal (Figure 38B). Aucune variation significative n'a été observée concernant le taux de calcium osseux (Figure 38D).



**Figure 38** : Effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur les taux du calcium sérique (A et B) et osseux (C et D) des rates normales et OVX fracturées.

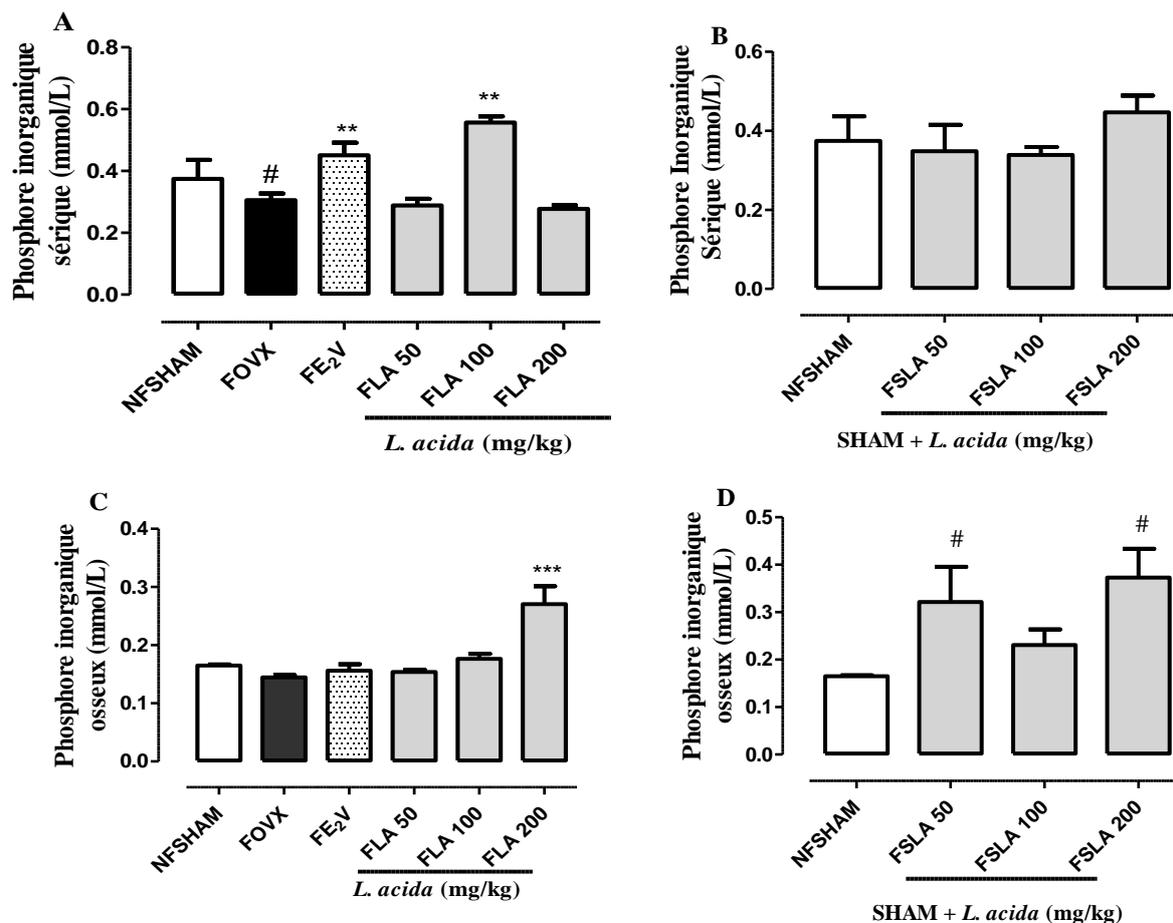
NFSHAM = animaux non fracturés ayant subi une chirurgie blanche et recevant de l'eau distillée (témoin normal), FOVX = animaux OVX et fracturés ayant reçu de l'eau distillée (témoin négatif) ; FE<sub>2</sub>V = animaux OVX et fracturés traités à l'œstradiol valérate à la dose de 1 mg/kg; FLA = animaux OVX-fracturés et recevant l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 50, 100 et de 200 mg/kg PC ; FSLA = animaux SHAM-fracturés et recevant l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 50, 100 et de 200 mg/kg PC respectivement. Les données sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  ESM (n = 5) ; \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  (différence significative par rapport au témoin négatif) ; ###  $p < 0,001$  (différence significative par rapport au témoin normal).

### III.3.4.2- Effets sur le taux de phosphore inorganique sérique et osseux

La Figure 39 montre les effets des traitements sur le taux de phosphore inorganique sérique (Pis) et osseux (Pios) des rates normales et OVX, fracturées. On observe chez les témoins négatifs, une réduction significative (45,6 % ;  $p < 0,05$ ) du taux du Pis comparé au témoin normal (Figure 39A). Le traitement à l'E<sub>2</sub>V (1 mg/kg PC) a induit une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) du taux de phosphore inorganique sérique comparé au témoin négatif.

L'extrait éthanolique de *L. acida* tout comme l'E<sub>2</sub>V a induit chez les animaux ovariectomisés et fracturés, une augmentation significative du taux de Pis à la dose de 100 mg/kg ( $p < 0,01$ ) et du Pios à la dose de 200 mg/kg ( $p < 0,001$ ) comparativement au témoin négatif (Figures 39 A et C).

Chez les animaux normaux, *L. acida* aux doses testées (50, 100 et 200 mg/kg PC) n'a induit aucune variation significative du taux du Pis. Les doses de 50 et de 200 mg/kg PC, ont induit une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de la concentration du Pios comparativement au témoin normal (NFSHAM) (Figure 39D).

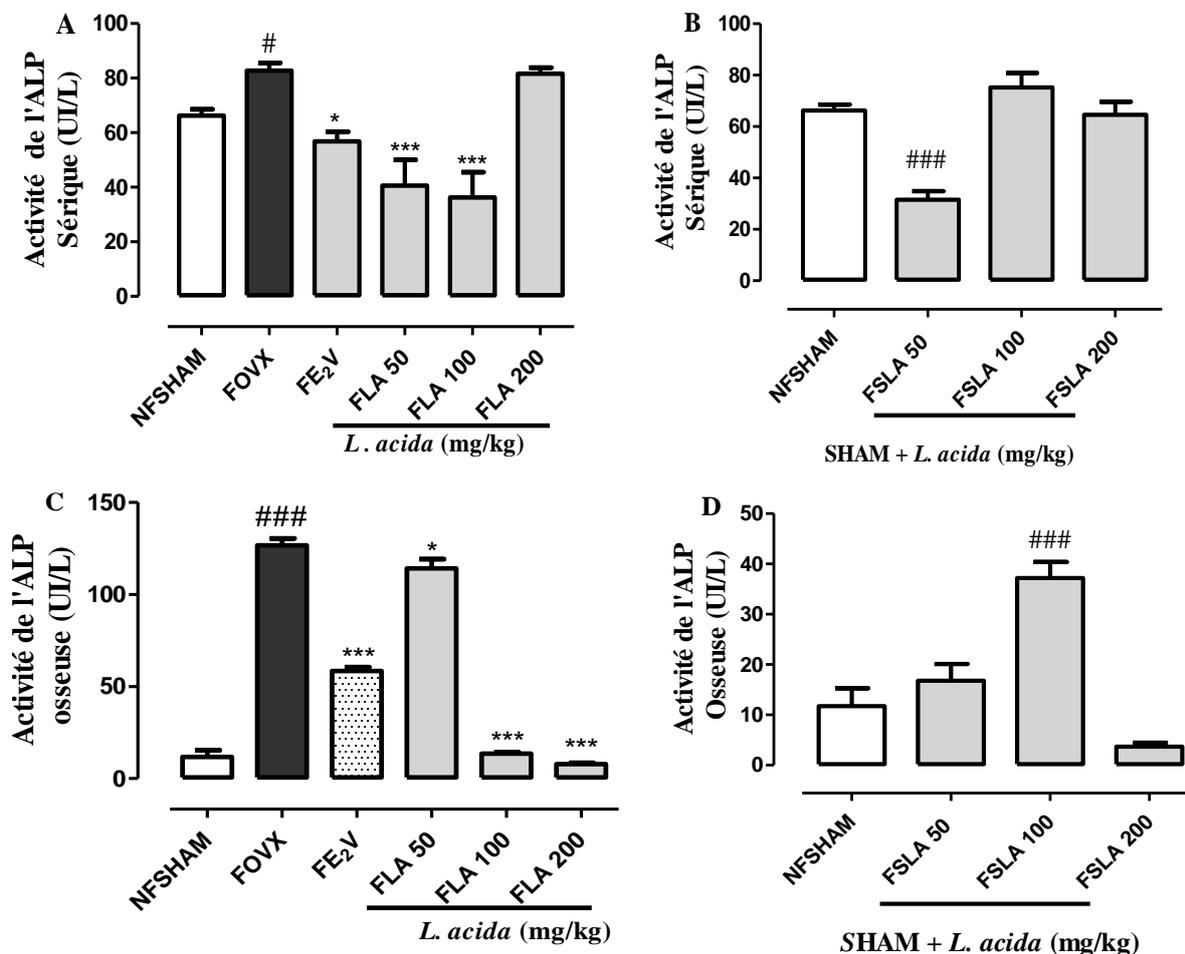


**Figure 39** : Effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur le taux du phosphore inorganique sérique (A et B) et osseux (C et D) chez les rates normales et OVX fracturées

NFSHAM = animaux non fracturés ayant subi une chirurgie blanche et recevant de l'eau distillée (témoin normal), FOVX = animaux OVX-fracturés recevant de l'eau distillée (témoin négatif), FE<sub>2</sub>V = animaux OVX-fracturés traités à l'œstradiol valérate à la dose de 1 mg/kg; FLA = animaux OVX-fracturés traités à l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 50, 100 et de 200 mg/kg PC ; FSLA = animaux SHAM-fracturés traités à l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 50, 100 et de 200 mg/kg PC respectivement. Les données sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  ESM (n= 5) \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  (différence significative par rapport au témoin négatif) ; #  $p < 0,05$  (différence significative par rapport au témoin normal).

### III.3.4.3- Effets sur l'activité de la phosphatase alcaline sérique et osseuse

Comme indiqué par la Figure 40, l'ovariectomie a induit une augmentation significative des activités de la phosphatase alcaline sérique ( $p < 0,05$ ) et osseuse ( $p < 0,001$ ) par comparaison au témoin normal (Figures 40A et C). L'E<sub>2</sub>V a contrecarré l'augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline sérique (PALser) ( $p < 0,05$ ) et de la phosphatase alcaline osseuse (ALPos) ( $p < 0,001$ ) comparé aux animaux du groupe témoin négatif.



**Figure 40** : Effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur l'activité de la phosphatase alcaline sérique (A et B) et osseuse (C et D) chez des rates normales et OVX fracturées.

NFSHAM = animaux non fracturés ayant subi une chirurgie blanche et recevant de l'eau distillée (témoin normal) ; FOVX = animaux OVX-fracturés recevant de l'eau distillée (témoin négatif), FE<sub>2</sub>V = animaux OVX-fracturés traités à l'œstradiol valérate à la dose de 1 mg/kg ; FLA = animaux OVX-fracturés traités à l'extrait éthanolique de *L.acida* aux doses respectives de 50, 100 et 200 mg/kg PC ; FSLA = animaux SHAM-fracturés et recevant l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 50, 100 et de 200 mg/kg PC respectivement. Les données sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  ESM (n = 5) ; \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  (différence significative par rapport au témoin négatif) ; ###  $p < 0,005$  (différence significative par rapport au témoin normal).

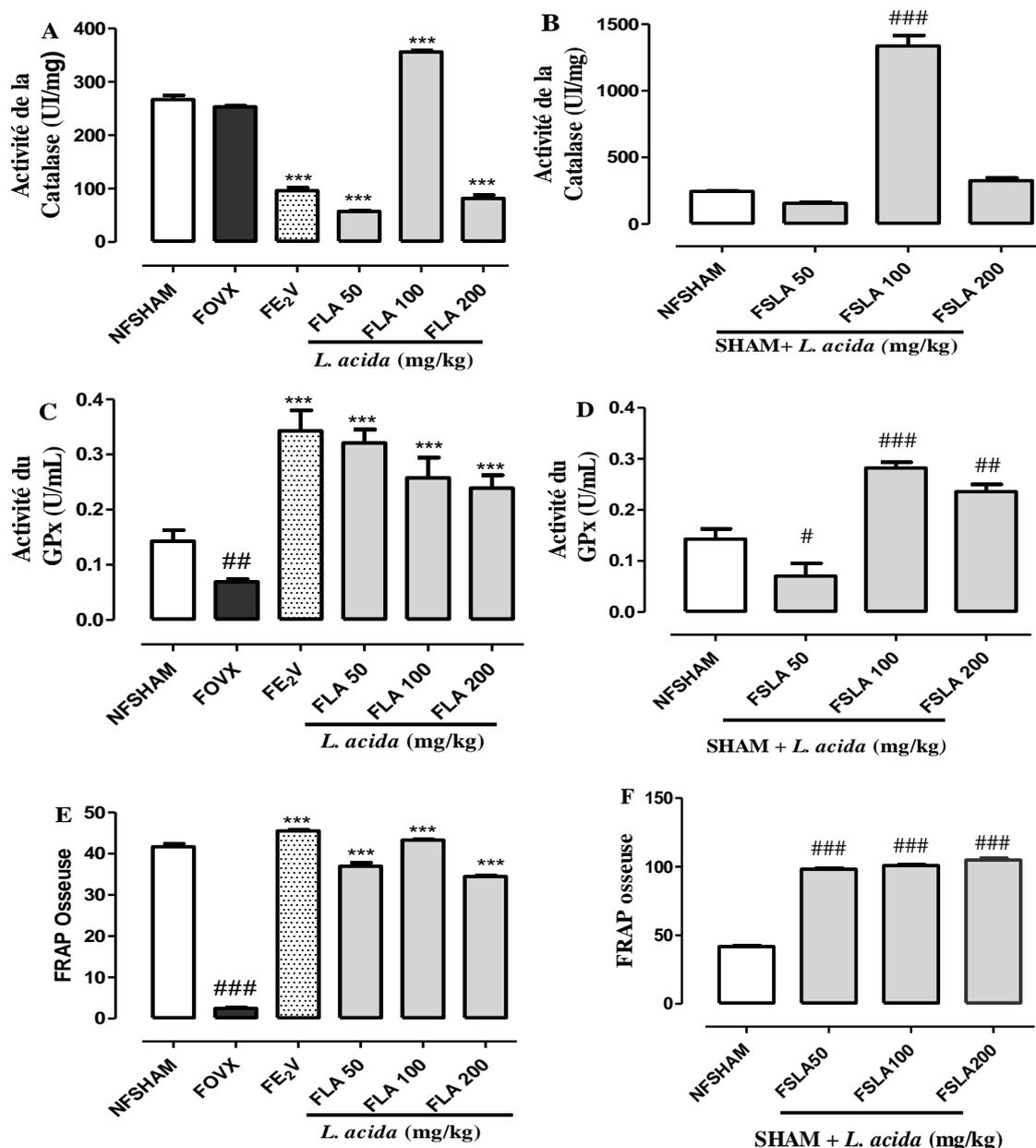
L'extrait éthanolique de *L. acida* tout comme l'E<sub>2</sub>V a significativement baissé l'activité de la PALser aux doses de 50 et 100 mg/kg ( $p < 0,001$ ) et de l'activité de la PALos aux doses de 50 mg/kg ( $p < 0,05$ ), 100 et de 200 mg/kg ( $p < 0,001$ ) comparé au groupe témoin négatif. Chez les animaux non ovariectomisés et fracturés, l'extrait éthanolique a entraîné *L. acida* à la dose de 50 mg/kg une baisse significative ( $p < 0,001$ ) de l'activité de la PALser en comparaison au groupe normal. A la dose de 100 mg/kg *L. acida* a induit une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) de la PALos comparé au témoin normal (Figures 40B et D).

### III.3.5- Effets sur quelques paramètres du stress oxydatif sériques et tissulaires

La Figure 41 illustre les effets des traitements à l'E<sub>2</sub>V et à l'extrait éthanolique de *L. acida* sur quelques paramètres du stress oxydant. Les résultats montrent chez les témoins négatifs une réduction (13,6%) bien que non significative de l'activité de la catalase par comparaison au témoin normal. L'administration de l'E<sub>2</sub>V à la dose de 1 mg/kg PC tout comme *L. acida* aux doses de 50 et de 200 mg/kg PC a entraîné une réduction significative ( $p < 0,001$ ) de l'activité de la catalase comparé au témoin négatif. *L. acida* à la dose de 100 mg/kg PC a significativement augmenté ( $p < 0,001$ , 102,8 %) l'activité de la catalase comparée au témoin négatif (Figure 41A). Chez les normaux (animaux non ovariectomisés), *L. acida* à la dose de 100 mg/kg PC a induit une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) de l'activité de la catalase par comparaison au témoin normal (Figure 41B).

Concernant le taux de la glutathion peroxydase (GPx), il a été observé une réduction significative ( $p < 0,05$ , 103,5%) de l'activité de la GPx chez le témoin négatif comparé au témoin normal (Figure 41D). *L. acida* aux doses testées (50, 100 et 200 mg/kg PC) tout comme l'E<sub>2</sub>V a induit chez les animaux OVX et fracturés une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) de l'activité de la GPx par comparaison au témoin négatif. Chez les normaux, *L. acida* a augmenté l'activité de la GPx aux doses de 100 mg/kg ( $p < 0,001$ ) et de 200 mg/kg ( $p < 0,01$ ). A la dose de 50 l'extrait de *L. acida* a induit une réduction significative ( $p < 0,05$ ) de l'activité de la GPx comparativement au témoin normal (Figure 41C).

La Figure 41 (E et F) montre les effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur la capacité antioxydante totale (FRAP) au niveau osseux. Une baisse significative (39,22 %,  $p < 0,001$ ) de la FRAP chez le témoin négatif comparé au témoin normal a été observée. L'E<sub>2</sub>V a significativement ( $p < 0,001$ ) protégé contre la baisse de la FRAP osseuse comparé au groupe témoin négatif. *L. acida* à toutes les doses testées (50,100 et 200 mg/kg PC) a induit une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) de la FRAP comparé au groupe témoin négatif. Des résultats similaires ont été observés chez les rates normales recevant *L. acida* a toutes les doses testées (50,100 et de 200 mg/kg) comparé aux animaux normaux (NFSHAM).



**Figure 41** : Effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur l'activités de la catalase (A et B), du glutathion peroxydase (C et D) et de la capacité antioxydante totale (E et F).

NFSHAM = animaux non fracturés ayant subi une chirurgie blanche et recevant de l'eau distillée (témoin normal), FOVX = animaux OVX-fracturés recevant de l'eau distillée (témoin négatif), FE<sub>2</sub>V = animaux OVX-fracturés traités à l'œstradiol valérate à la dose de 1 mg/kgPC; FLA = animaux OVX-fracturés traités à l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses respectives de 50, 100 et de 200 mg/kg PC ; FSLA= animaux SHAM-fracturés et recevant l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses respectives de 50, 100 et de 200 mg/kg PC. Les données sont exprimées sous forme de moyenne ± ESM (n = 5) ; \*\*\*  $p < 0,001$  (différence significative par rapport au témoin négatif) et #  $p < 0,05$  ; ##  $p < 0,01$  ; ###  $p < 0,001$  (différence significative par rapport au témoin normal).

### III.3.6- Effets sur quelques paramètres hématologiques

Le tableau XX illustre les effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur quelques paramètres hématologiques chez les rates ovariectomisées et fracturées. Aucune différence significative n'a été observée sur des paramètres hématologiques évalués chez les témoins négatifs (animaux ovariectomisés et fracturés ayant reçu de l'eau distillée) comparés au témoin normal. L'E<sub>2</sub>V (1 mg/kg) ainsi que l'extrait éthanolique de *L. acida* à toutes les doses testées (50, 100 et 200 mg/kg PC) n'ont induit aucune variation significative des paramètres hématologiques évalués comparé au témoin négatif.

Chez les normaux (animaux ayant subi une chirurgie blanche et fracturés), l'administration de l'extrait éthanolique de *L. acida* à toutes les doses testées (50, 100 et 200 mg/kg PC) a induit une baisse significative ( $p < 0,001$ ) du taux de globules blancs par comparaison au témoin normal (Tableau XXI).

**Tableau XIX :** Effets de l'extrait éthanolique de *Lannea acida* sur quelques paramètres hématologiques des rates OVX, fracturés

Paramètres	Valeurs Normales	NFSHAM	Rates ovariectomisées et fracturées				
			FOVX	FE <sub>2</sub> V	<i>Lannea acida</i> (mg/kg PC)		
					FLA 50	FLA 100	FLA 200
GB (10 <sup>3</sup> /μL)	5-16	6,41 ± 0,64	8,04 ± 0,71	7,62 ± 0,98	5,20 ± 0,73	8,66 ± 1,40	8,11 ± 0,63
Lymphocytes (%)	65-85	70,20 ± 3,04	72,03 ± 3,97	73,94 ± 2,46	83,43 ± 3,41	69,05 ± 4,24	66,53 ± 5,38
Monocytes (%)	0-20	8,83 ± 0,39	5,82 ± 0,25	8,38 ± 0,52	5,42 ± 1,84	7 ± 1,12	9,18 ± 1,77
Granulocytes (%)	0-27	21,13 ± 2,97	22,12 ± 3,75	19,8 ± 1,85	17,98 ± 2,47	27,58 ± 4,80	25,68 ± 4,28
GR (10 <sup>6</sup> /μL)	5-10	10,13 ± 1,92	7,07 ± 0,13	6,79 ± 0,33	7,34 ± 0,17	6,87 ± 0,33	6,618 ± 0,20
Hématocrite (%)	32-53	34,50 ± 1,82	39,68 ± 1,24	38,26 ± 1,41	37,48 ± 3,77	37,46 ± 2,07	35,02 ± 2,81
Hémoglobine (g/dL)	12-18	10,58 ± 0,61	12,12 ± 0,48	11,90 ± 0,61	11,44 ± 1,30	11,82 ± 0,78	11,20 ± 1,05
VCM (fL)	52-60	55,80 ± 0,81	56,17 ± 0,82	56,62 ± 1,05	56,62 ± 0,87	54,54 ± 0,70	56,88 ± 1,20
HCM (pg)	17-29	17,06 ± 0,33	16,95 ± 0,40	17,50 ± 0,34	17,08 ± 0,32	17,1 ± 0,42	18,10 ± 1,01
CHCM (g/dL)	32-45	30,59 ± 0,17	30,23 ± 0,28	31,00 ± 0,51	30,30 ± 0,60	31,40 ± 0,40	29,06 ± 3,25
PS (10 <sup>3</sup> /μL)	200-1100	412,65 ± 12,59	419,75 ± 26,86	422,40 ± 42,19	272,80 ± 59,90	440,20 ± 24,89	289,40 ± 89,36

Les résultats sont exprimés sous formes de moyenne ± ESM, (n = 5). NFSHAM = animaux ayant subi une chirurgie blanche non fracturés recevant de l'eau distillée (témoin normal), FOVX = animaux ovariectomisés et fracturés ayant reçu de l'eau distillée (témoin négatif) ; FE<sub>2</sub>V= animaux ovariectomisés et fracturés, traités à l'œstradiol valérate à la dose de 1 mg/kg (témoin positif) ; *L. acida* = animaux ovariectomisés et fracturés, traités à l'extrait éthanolique de *L. acida* à la dose de 50, 100 et de 200 mg/kg PC. GB= globules blancs ; GR = globules rouges ; VCM= volume corpusculaire moyen, HCM= hémoglobine corpusculaire moyenne, CHCM= concentration en hémoglobine corpusculaire moyenne ; PS = plaquettes sanguines.

**Tableau XX** : Effets de l'extrait éthanolique de *Lannea acida* sur quelques paramètres hématologiques des rates SHAM, fracturés.

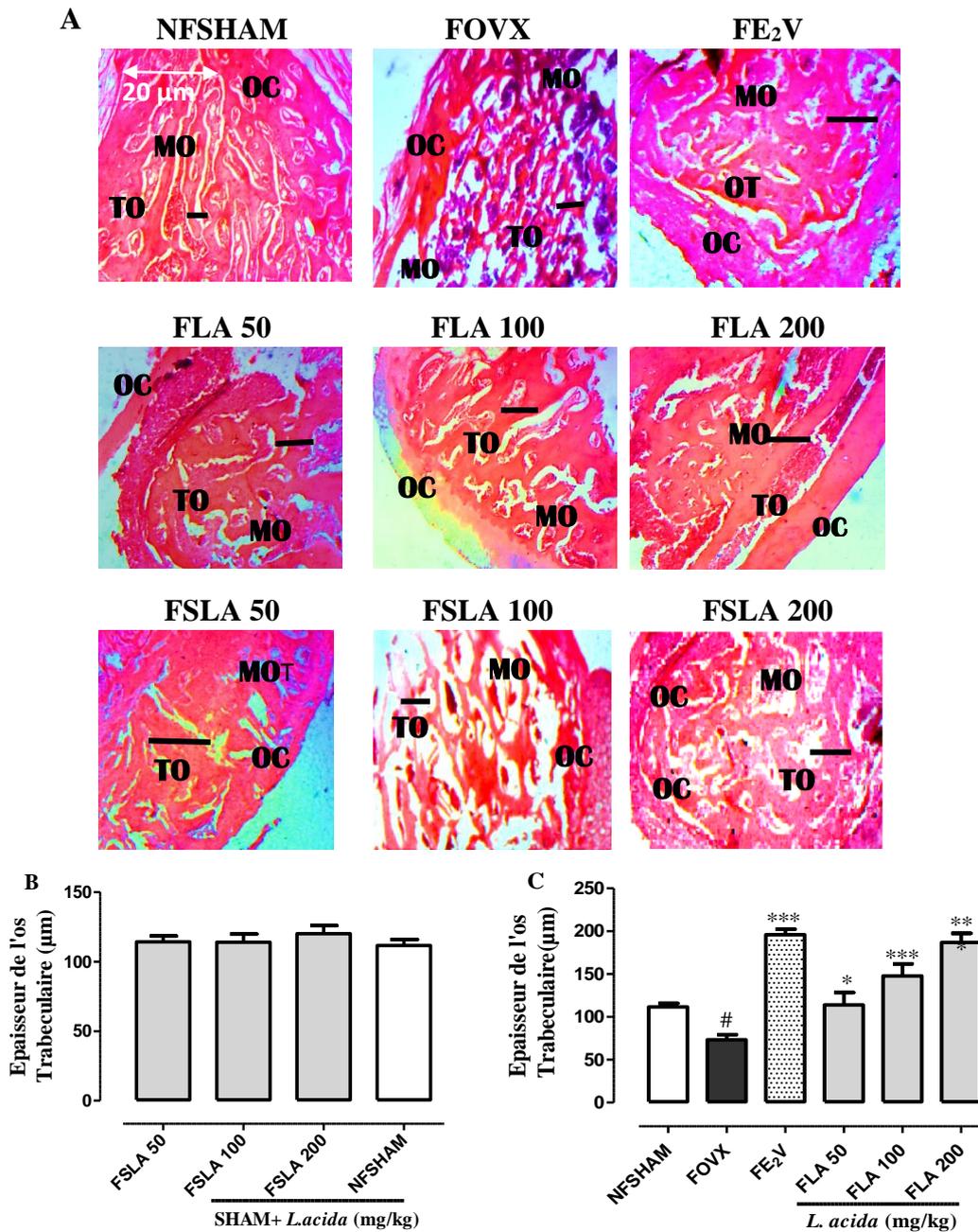
Paramètres	Valeurs Normales	NFSHAM	SHAM + <i>Lannea acida</i> (mg/kg PC)		
			FSLA 50	FSLA 100	FSLA 200
GB (10 <sup>3</sup> /μL)	5-16	6,41 ± 0,64	4,525 ± 0,08 <sup>###</sup>	4,462 ± 0,61 <sup>###</sup>	4,48 ± 0,48 <sup>###</sup>
Lymphocytes (%)	65-85	70,20 ± 3,04	75,77 ± 1,19	66,78 ± 1,32	69,36 ± 2,64
Monocytes (%)	0-20	8,83 ± 0,39	7,11 ± 0,96	8,72 ± 0,92	6,926 ± 0,53
Granulocytes (%)	0-27	21,13 ± 2,97	17,79 ± 0,95	24,24 ± 2,17	23,70 ± 2,83
GR (10 <sup>6</sup> /μL)	5-10	10,13 ± 1,92	6,922 ± 0,25	8,28 ± 0,86	6,77 ± 0,31
Hématocrite (%)	32-53	34,50 ± 1,82	35,94 ± 1,74	37,13 ± 0,41	37,92 ± 2,08
Hémoglobine (g/dL)	12-18	10,58 ± 0,61	11,85 ± 0,49	11,63 ± 0,13	11,852 ± 0,75
VCM (fL)	52-60	55,80 ± 0,81	56,3 ± 0,86	55,47 ± 0,13	55,83 ± 0,57
HCM (pg)	17-29	17,06 ± 0,33	17,65 ± 0,33	17,27 ± 0,11	17,34 ± 0,35
CHCM (g/dL)	32-45	30,59 ± 0,17	31,32 ± 0,27	31,21 ± 0,22	31,08 ± 0,30
PS (10 <sup>3</sup> /μL)	200-1100	412,65 ± 12,59	493,25 ± 17,10	362,8 ± 32,98	389,6 ± 12,64

Les résultats sont exprimés sous formes de moyenne ± ESM, (n= 5). NFSHAM = animaux ayant subis une chirurgie blanche non fracturés et ayant reçu de l'eau distillée (témoin normal), SHAM + *L. acida* = animaux ayant subi une chirurgie blanche et fracturés, traités à l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 50, 100 et de 200 mg/kg PC. GB= globules blancs ; GR = globules rouges ; VCM= volume corpusculaire moyen, HCM = hémoglobine corpusculaire moyenne, CHCM= concentration en hémoglobine corpusculaire moyenne ; PS = plaquettes sanguines ; <sup>###</sup>  $p < 0,001$ , significativité par rapport au témoin négatif (FOVX).

### III.3.7- Effets sur l'histologie et l'histomorphométrie du fémur droit

La figure 42 indique les coupes histologiques du fémur droit des rates OVX, fracturés après 60 jours de traitement. Les résultats indiquent chez les animaux du groupe ovariectomisés et fracturés ayant reçu de l'eau distillée une structure osseuse présentant des travées osseuses non jointives. L'extrait éthanolique de *L. acida* à toutes les doses testées (50, 100 et 200 mg/kg PC) tout comme l'E<sub>2</sub>V (1mg/kgPC) a protégé la structure du fémur. On y observe des travées osseuses jointives et une abondante quantité de moelle osseuse. La même observation a été faite chez les animaux normaux [non ovariectomisés (SHAM) et fracturés], recevant l'extrait aux doses de 50, 100 et de 200 mg/kg PC.

L'histomorphométrie de l'os trabéculaire (Figure 49B), montre une baisse significative de son épaisseur ( $p < 0,001$ ) chez le témoin négatif comparativement au témoin normal. L'E<sub>2</sub>V tout comme *L. acida* à toutes les doses (50, 100 et 200 mg/kg PC) a induit une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) de l'épaisseur de l'os trabéculaire comparé aux témoins négatifs. Chez les animaux non ovariectomisés (SHAM) et fracturés aucune variation significative de l'épaisseur de l'os trabéculaire (Figure 42B) n'a été observée après traitement à l'extrait éthanolique de *L. acida* à toutes les doses testées (50, 100 et 200 mg/kg) par comparaison au témoin normal (NFHAM).

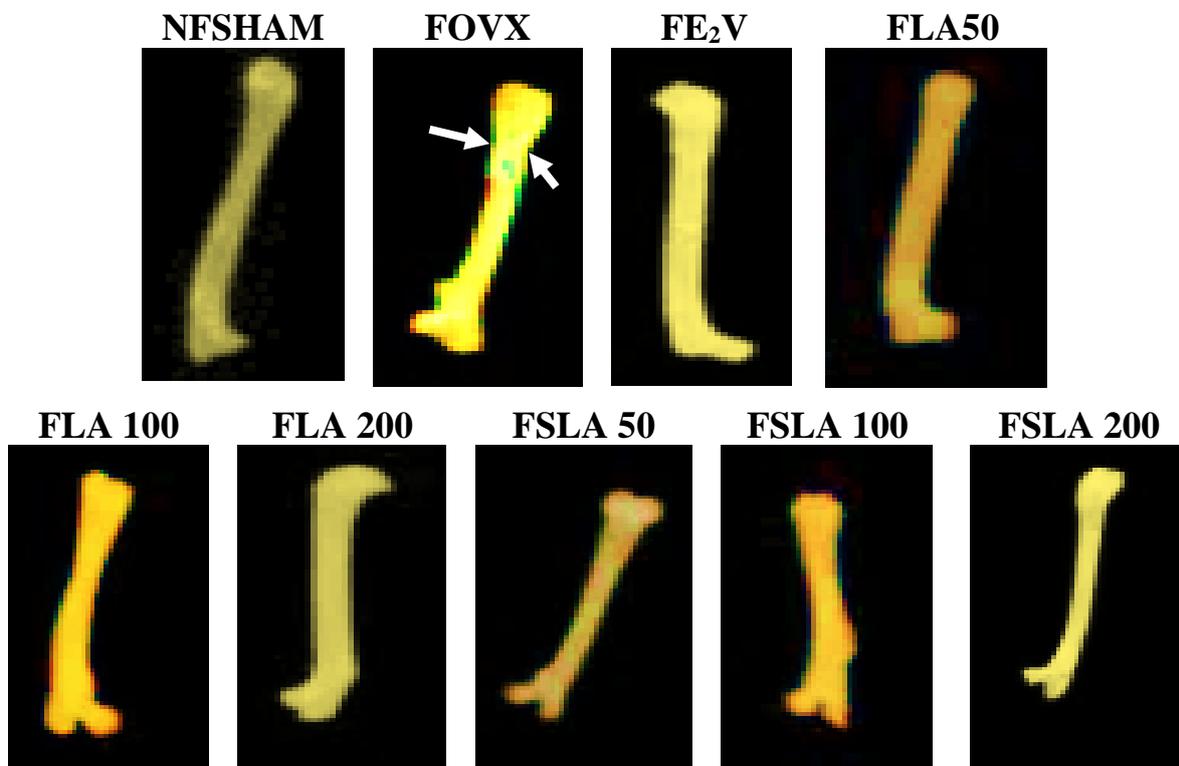


**Figure 42** : Effets de l'extrait éthanolique de *Lannea acida* sur l'histologie du fémur (A) (400, coloration à l'hématoxyline-éosine) et l'épaisseur de l'os trabéculaire (B et C).

NFSHAM = animaux non fracturés ayant subi une chirurgie blanche et recevant de l'eau distillée (témoin normal), FOVX = animaux OVX-fracturés et recevant de l'eau distillée (témoin négatif), FE<sub>2</sub>V = animaux OVX-fracturés traités à l'œstradiol valérate à la dose de 1 mg/kg; FLA = animaux OVX-fracturés traités à l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 50, 100 et de 200 mg/kg PC ; FSLA = animaux SHAM-fracturés traités à l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 50, 100 et de 200 mg/kg PC respectivement, TO = travée osseuse, OC = os cortical, MO = moelle osseuse. Les données sont exprimées sous forme de moyenne ± ESM, (n = 5) ; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (différence significative par rapport au témoin négatif) ; #  $p < 0,05$  (différence significative par rapport au témoin normal).

### III.3.8- Effets sur la radiographie du Fémur droit

La Figure 43 présente les radiographies du fémur droit des rates ovariectomisées et des rates non ovariectomisées après 60 jours de traitement. On observe une cicatrisation (régénération) osseuse partielle chez le témoin négatif [ovariectomisées et fracturées ayant reçu uniquement de l'eau distillée]. La radiographie du fémur droit des animaux traités à l'E<sub>2</sub>V (1 mg/kgPC) et de ceux recevant l'extrait éthanolique de *L. acida* a toutes les doses testées (50, 100 et 200 mg/kg PC) montrent une cicatrisation osseuse totale comparativement à celle du témoin négatif. Les mêmes résultats ont été observés chez les animaux normaux après traitement à l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 50,100 et de 200 mg/kg PC par comparaison au témoin normal (NFSHAM) (figure 43).

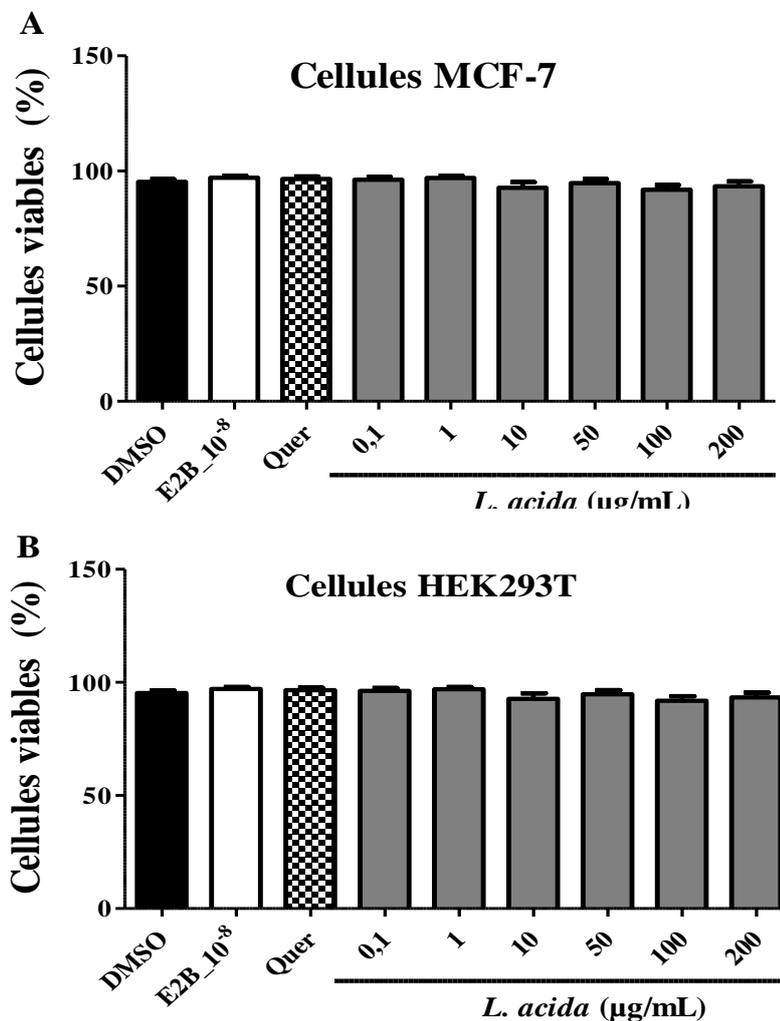


**Figure 43** : Effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur la radiographie du fémur droit. NFSHAM = animaux non fracturés ayant subi une chirurgie blanche et ayant reçu de l'eau distillée (témoin normal), FOVX = animaux OVX-fracturés et ayant reçu de l'eau distillée (témoin négatif), FE<sub>2</sub>V= animaux OVX-fracturés traités à l'œstradiol valérate à la dose de 1 mg/kg; FLA = animaux OVX-fracturés, traités à l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 50, 100 et de 200 mg/kg PC ; FSLA= animaux SHAM-fracturés et recevant l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses respectives de 50, 100 et de 200 mg/kg PC.

### III.4- Effets *in vivo* et *in vitro* de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur les récepteurs aux œstrogènes

#### III.4.1-Viabilité des cellules MCF-7 et HEK293T en présence de l'extrait de *L. acida*

La Figure 44 montre les effets de l'extrait de *L. acida* sur la viabilité des cellules MCF-7 et HEK293T. Aucune variation significative du nombre total des cellules MCF-7 et HEK293T n'a été observée chez les témoins normaux (exposés au DMSO à 0,01%) comparé aux témoins positifs recevant l'œstradiol benzoate ou la quercétine à la concentration de 10 nM. Les mêmes résultats ont été observés dans les groupes tests, recevant l'extrait éthanolique de *L. acida* aux concentrations de 0,1, 10, 50,100 et de 200 µg/mL comparé au groupe témoin positif recevant l'œstradiol benzoate ou la quercétine à la concentration de (10 nM) (Figures 44A et 44B)



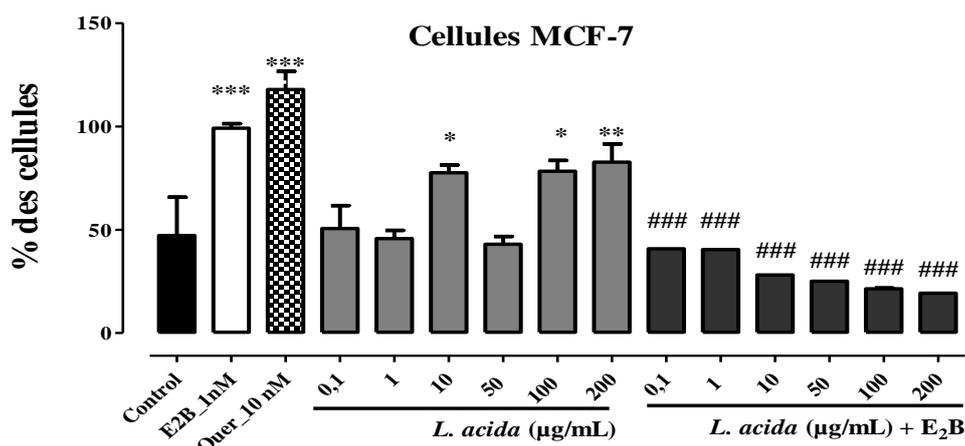
**Figure 44** : Effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur la viabilité des cellules MCF-7 (A) et HEK294T (B).

E<sub>2</sub>B = cellules exposées à la 17 β-Benzoate (10 nM), Quer = cellules exposées à la quercétine (10 nM), DMSO = cellules recevant le diméthyle sulfoxyde (0,01%), *L. acida* = cellules ayant reçu l'extrait éthanolique de *L. acida* à des concentrations respectives de 0,1, 10, 50, 100 et de 200 µg/mL.

### III.4.2- Effets œstrogéniques *in vitro* de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur les cellules MCF-7 ("E-screen assay")

Les effets de l'extrait de *L. acida* sur la prolifération des cellules MCF-7 est présenté par la Figure 45. Cette figure montre que l'œstradiol benzoate (10 nM) tout comme la quercétine (10 nM) a induit une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) du nombre total des cellules MCF-7 comparé aux témoin normal [cellules exposées au DMSO uniquement]. *L. acida* a induit une augmentation significative du nombre total des cellules MCF-7 à des concentrations de 10 ( $p < 0,05$ ), 100 ( $p < 0,05$ ) et de 200 ( $p < 0,01$ )  $\mu\text{g/mL}$  comparativement au témoin normal.

Concernant l'activité antiœstrogénique *in vitro*, l'exposition des cellules MCF-7 conjointement à l'œstradiol benzoate (10 nM) et à l'extrait de *L. acida* a des concentrations croissantes (0,1, 10, 50, 100 et 200  $\mu\text{g/mL}$ ) a induit une réduction significative ( $p < 0,001$ ) du nombre total des cellules MCF-7 par comparaison au groupe exposé à l'œstradiol benzoate uniquement. Notons que ces réductions sont concentrations- dépendantes (Figure 45).



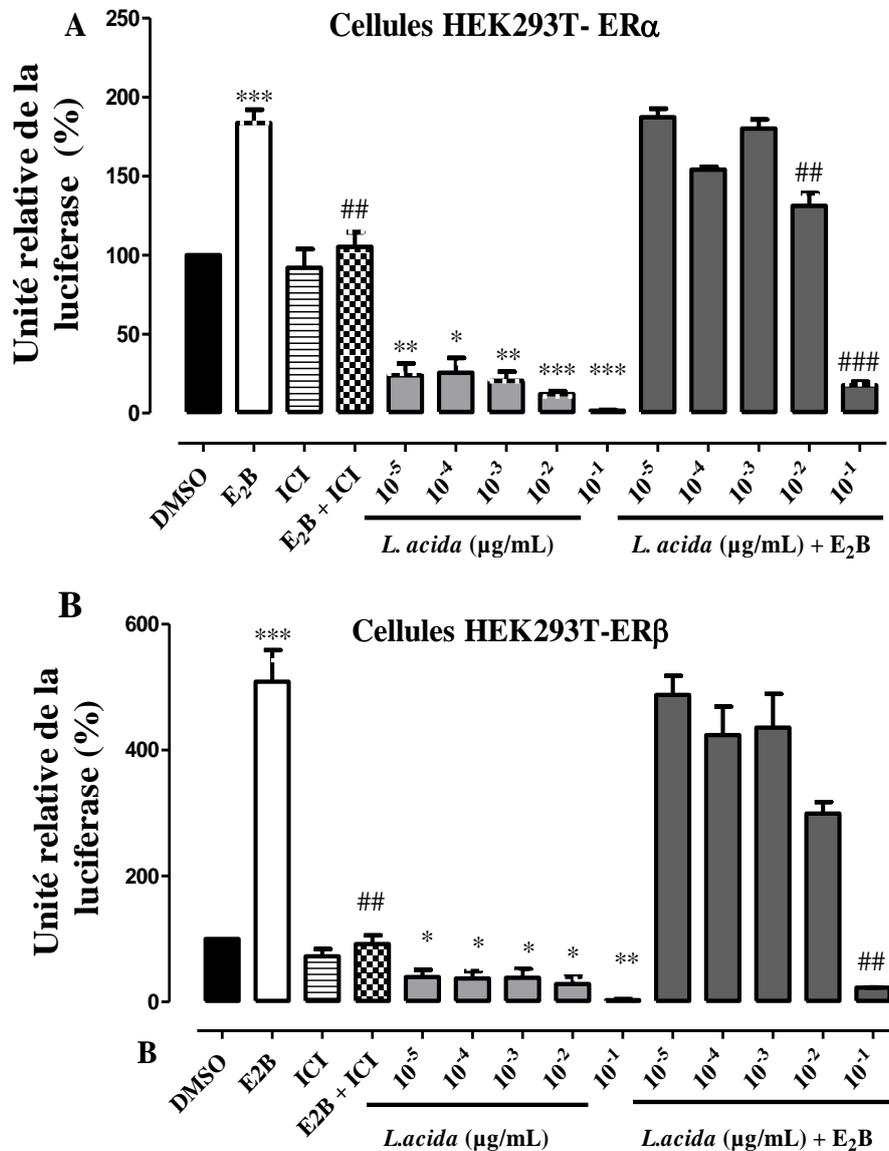
**Figure 45** : Effets œstrogénique et antiœstrogénique *in vitro* de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur les cellules MCF-7.

E<sub>2</sub>B = cellules exposées à la 17  $\beta$ -Benzoate (10 nM), Quer = cellules recevant la quercétine (10 nM), DMSO = cellules recevant le diméthyle Sulfoxyde (0,01%), *L. acida* = cellules ayant reçu l'extrait éthanolique de *L. acida* à des concentrations de 0,1, 10, 50, 100 et de 200  $\mu\text{g/mL}$  ; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (différence significative par rapport au groupe exposé au DMSO) ; ### $p < 0,001$  (différence significative par rapport au groupe exposé à l'E<sub>2</sub>B).

### III.4.3- Effet *in vitro* de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur les récepteurs alpha (ER $\alpha$ ) et bêta (ER $\beta$ ) aux œstrogènes

La Figure 46 montre les effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur l'activation des récepteurs alpha (ER $\alpha$ ) et bêta (ER $\beta$ ) des œstrogènes. Les résultats montrent que, l'E<sub>2</sub>B a significativement ( $p < 0,001$ ) augmenté l'unité relative de la luciférase pour les deux types de

récepteurs aux œstrogènes (ER $\alpha$ ) et bêta (ER $\beta$ ) par comparaison au témoin normal exposé au DMSO. L'ICI a significativement ( $p < 0,01$ ) antagonisé l'E<sub>2</sub>B sur l'unité de la luciférase pour les deux sous types de récepteurs aux œstrogènes (Figure 46).



**Figure 46** : Effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur l'activation des récepteurs ER $\alpha$  (A) et ER $\beta$  (B) des œstrogènes stablement transfectés sur les cellules HEK293T.

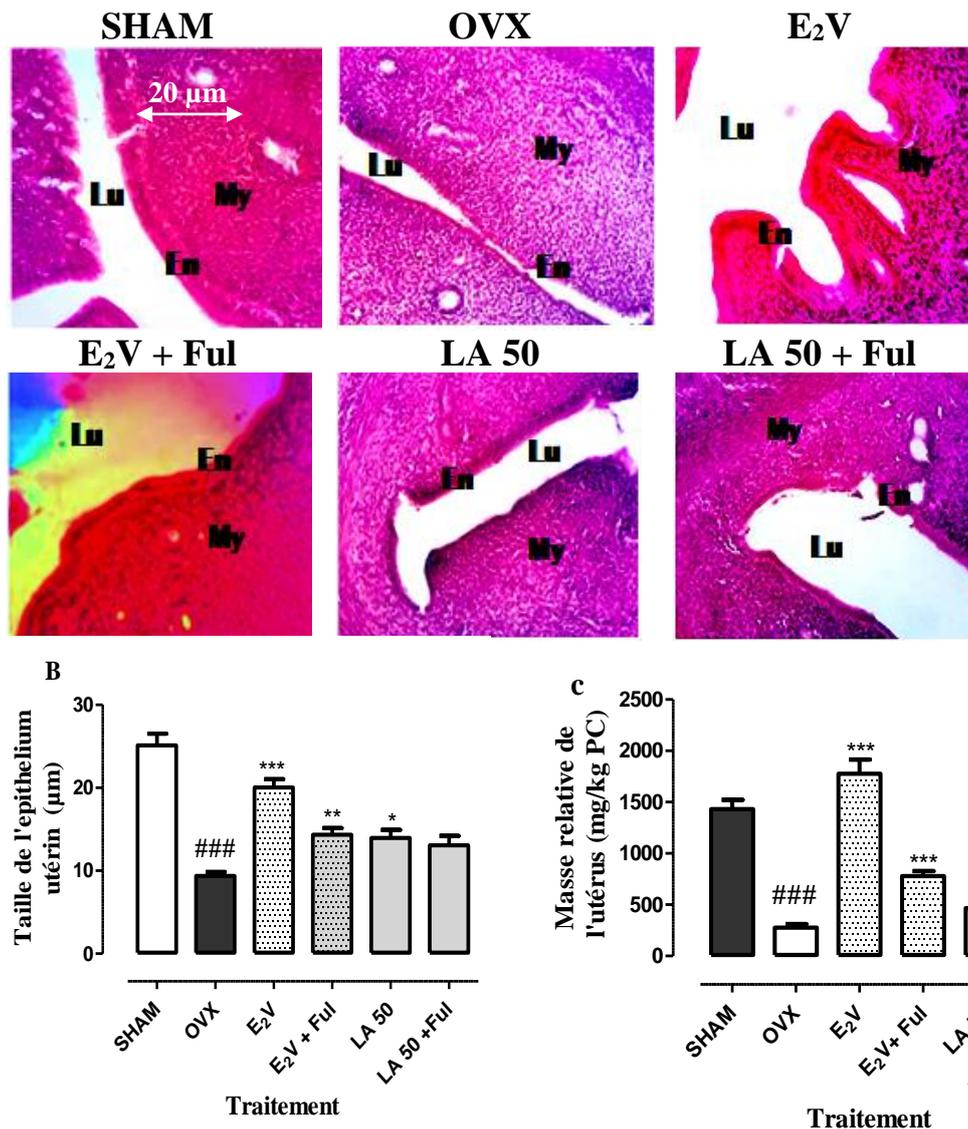
DMSO = cellules exposées au diméthyle Sulfoxyde (0,01%) ; E<sub>2</sub>B = cellules exposées à l'œstradiol benzoate (10 nM) ; ICI = cellules ayant reçu le fulvestrant (ICI 182, 780) à la concentration de 300 µg/mL) ; E<sub>2</sub>B + ICI = cellules ayant reçu l'œstradiol valérate (10 nM) et le fulvestrant (300 µg/mL) ; *L. acida* = l'extrait éthanolique de *L. acida* à des concentrations de 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> et de 10<sup>-5</sup> µg/mL ; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (différence significative par rapport aux cellules exposées au DMSO) et ##  $p < 0,01$  et ###  $p < 0,001$  (différence significative par rapport au groupe E<sub>2</sub>B).

L'extrait éthanolique de *L. acida* a toutes les concentrations testées ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , et  $10^{-5}$  µg/mL) a significativement baissé l'unité de la luciférase pour les deux sous types de récepteurs ER $\alpha$  et ER $\beta$  aux œstrogènes comparativement au témoin normal. *L. acida* a également antagonisé l'E<sub>2</sub>B sur l'activation des récepteurs ER $\alpha$  aux concentrations de 0,01 µg/mL ( $p < 0,01$ ) et de 0,1 µg/mL ( $p < 0,001$ ). Seule la concentration de 0,1 µg/mL a significativement ( $p < 0,01$ ) antagonisé l'E<sub>2</sub>B (témoin positif) sur l'activation des récepteurs ER $\beta$ .

### **III.4.4- Effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* in vivo sur les cibles primaires des œstrogènes en présence du fulvestrant**

#### **III.4.4.1- Effets sur l'utérus**

La Figure 47 illustre les effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur l'utérus en présence d'un antiœstrogène pur (le fulvestrant). L'ovariectomie a induit une diminution significative ( $p < 0,001$ ) de la masse et de la taille de l'épithélium utérin comparé au groupe SHAM. L'administration de l'œstradiol valérate (0,75 mg/kg) pendant trois jours, a induit une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) de la masse et de la taille de l'épithélium utérin comparé au groupe OVX (témoin négatif). Le fulvestrant (300 µg/mL) a significativement ( $p < 0,001$ ) antagonisé les effets de l'E<sub>2</sub>V sur l'utérus [la masse relative de l'utérus (32,36%) et la taille de l'épithélium utérin (27,29%)]. *L. acida* à la dose de 50 mg/kg a induit une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de la masse relative de l'utérus. Aucune variation significative n'a été obtenue sur la taille de l'épithélium utérin. Aucune variation significative n'a été observée suite au cotraitement à l'extrait éthanolique de *L. acida* à la dose de 50 mg/kg PC et le fulvestrant (300 µg/mL) comparé au groupe recevant l'extrait de *L. acida* à la dose de 50 mg/kg PC uniquement.

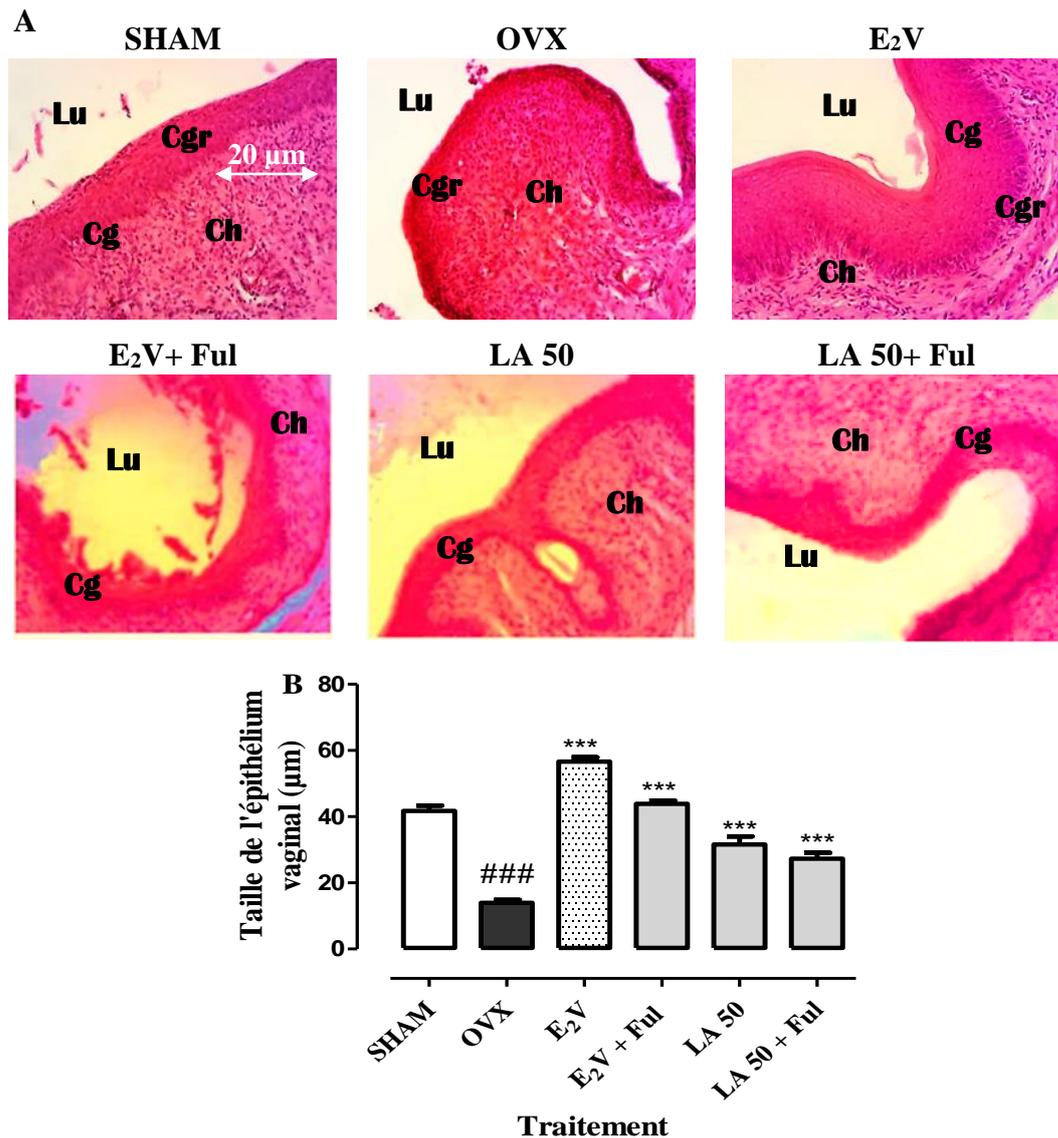


**Figure 47** : Effets de l'extrait éthanolique de *Lannea acida* sur l'utérus des rates ovariectomisées en présence d'un anti-œstrogène pur. Microphotographies (A) (40 ×, coloration à l'hématoxyline-éosine). Les histogrammes représentent la masse relative de l'utérus (B) et la taille de l'épithélium utérin (C).

SHAM = animaux ayant subi une chirurgie blanche et ayant reçu de l'eau distillée, OVX = animaux ovariectomisés, recevant de l'eau distillée, E<sub>2</sub>V = animaux OVX ayant reçu le 17 β-œstradiol à la dose de 0,75 mg/kg PC ; Ful = animaux OVX ayant reçu le fulvestrant (ICI 182, 780) à la concentration de 300 µg/mL ; E<sub>2</sub>V + Ful = animaux OVX, cotraités avec l'œstradiol valérate à la dose de 0,75 mg/kg et le fulvestrant (ICI 182, 780) à la concentration de 300 µg/mL ; LA50 = animaux OVX ayant reçu l'extrait éthanolique de *L. acida* à la dose de 50 mg/kg PC. LA50 + Ful = animaux OVX, cotraités avec l'extrait éthanolique de *L. acida* et le fulvestrant (ICI 182, 780) à la concentration de 300 µg/mL. My = myomètre ; En = endothélium ; Lu= lumière. Les données sont exprimées sous forme de moyenne ± ESM (n = 5) ; \**p* < 0,05, \*\**p* < 0,01 et \*\*\**p* < 0,001 (différences significatives par rapport au témoin négatif (OVX) ; ###*p* < 0,001 (différence significative par rapport au témoin normal (SHAM)).

#### III.4.4.2- Effets sur le vagin

La Figure 48 montre que l'ovariectomie a induit une réduction significative ( $p < 0,001$ ) de la taille de l'épithélium vaginal comparé au témoin normal (SHAM). L'E<sub>2</sub>V à la dose de 0,75 mg/kg PC a induit une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) de la taille de l'épithélium vaginal comparé au groupe OVX (témoin négatif). Comparé au groupe E<sub>2</sub>V, le fulvestrant (300 µg/mL) a significativement ( $p < 0,05$  ; 27,29 %) baissé l'effet de l'E<sub>2</sub>V sur l'épithélium vaginal. Tout comme l'E<sub>2</sub>V, *L. acida* à la dose de 50 mg/kg PC a significativement ( $p < 0,001$ ) augmenté la taille de l'épithélium vaginal comparé au groupe OVX (témoin négatif). Aucune variation significative n'a été observée suite au cotraitement à l'extrait éthanolique de *L. acida* à la dose de 50 mg/kg et au fulvestrant (300 µg/mL) pendant trois jours comparés au groupe recevant uniquement *L. acida* à la dose de 50 mg/kg PC (Figures 48A et 48B).

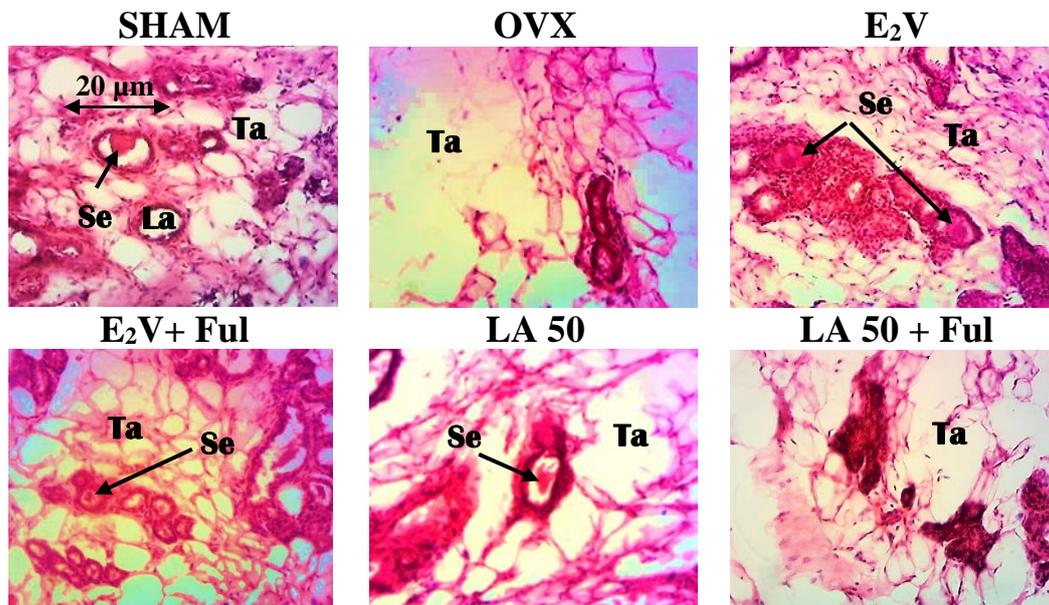


**Figure 48** : Effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* en présence du fulvestrant (ICI 182, 780) sur la Microphotographie (A) du vagin (400, coloration à l'hématoxyline-éosine) et taille de l'épithélium vaginal (B).

SHAM = animaux ayant subi une chirurgie blanche et ayant reçu de l'eau distillée, OVX = animaux ovariectomisés, recevant de l'eau distillée, E<sub>2</sub>V = animaux OVX ayant reçu le 17 β-œstradiol à la dose de 0,75 mg/kg PC ; Ful = animaux OVX ayant reçu le fulvestrant (ICI 182, 780) à la concentration de 300 µg/mL ; E<sub>2</sub>B + Ful = animaux OVX, cotraités avec l'œstradiol valérate à la dose de 0,75 mg/kg et le fulvestrant (ICI 182, 780) à la concentration de 300 µg/mL ; LA50 = animaux OVX ayant reçu l'extrait éthanolique de *L. acida* à la dose de 50 mg/kg PC. LA50 + Ful = animaux OVX, cotraités avec l'extrait éthanolique de *L. acida* et le fulvestrant (ICI 182, 780) à la concentration de 300 µg/mL. Ch = chorion, Lu = lumière vaginale, Cg = couche germinale, Cgr = couche granuleuse. Les données sont exprimées sous forme de moyenne ± ESM (n= 5) ; \*\*\*  $p < 0,001$  (différence significative par rapport au témoin négatif (OVX)) ; ###  $p < 0,001$  (différence significative par rapport au témoin normal (SHAM)).

### III.4.4.3- Effets sur la glande mammaire

La Figure 49 montre les microphotographies de la glande mammaire des rates après co-administration des substances de traitement avec le fulvestrant. L'ovariectomie a induit une réduction significative du diamètre et de la lumière des alvéoles comparé au groupe SHAM. *L. acida* à la dose de 50 mg/kg tout comme l'E<sub>2</sub>V à la dose de 0,75 mg/kg a induit une augmentation significative du diamètre et de la lumière des alvéoles, avec une différenciation nette des couches cellulaires constituant l'alvéole et la présence des sécrétions éosinophiles dans la lumière alvéolaire. En présence du fulvestrant (antagoniste), l'effet de l'E<sub>2</sub>V [l'E<sub>2</sub>V + Ful] et de l'extrait de *L. acida* [LA50 + Ful] au niveau de la glande mammaire a été antagonisé. Un rétrécissement des acini et une faible sécrétion éosinophile ont été observés dans les groupes recevant l'E<sub>2</sub>V+ Ful ainsi que dans celui recevant LA50 + Ful comparé au groupe E<sub>2</sub>V (0,75 mg/kg).



**Figure 49** : Effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur la glande mammaire en présence d'un anti-œstrogène pure (fulvestrant). Microphotographies (400, coloration à l'hématoxyline-éosine).

SHAM = animaux ayant subi une chirurgie blanche et ayant reçu de l'eau distillée, OVX = animaux ovariectomisés, recevant de l'eau distillée, E<sub>2</sub>V = animaux OVX ayant reçu le 17 β-œstradiol à la dose de 0,75 mg/kg PC ; Ful = animaux OVX ayant reçu le fulvestrant (ICI 182, 780) à la concentration de 300 µg/mL ; E<sub>2</sub>B + Ful = animaux OVX, cotraités avec l'œstradiol valérate à la dose de 0,75 mg/kgPC et le fulvestrant (ICI 182, 780) à la concentration de 300 µg/mL ; LA50 = animaux OVX ayant reçu l'extrait éthanolique de *L. acida* à la dose de 50 mg/kg PC. LA50 + Ful = animaux OVX, cotraités avec l'extrait éthanolique de *L. acida* et le fulvestrant (ICI 182, 780) à la concentration de 300 µg/mL. La = lumière acinaire ; Ta = tissu adipeux ; Se = Sécrétion éosinophile.

### III.5- Phytochimie et activité antiradicalaire de l'extrait éthanolique de *L. acida*

#### III.5.1- Classe des composés et activité antiradicalaire *in vitro* de l'extrait éthanolique de *L. acida*

Les résultats présentés dans le tableau XXI montrent que l'extrait éthanolique de *L. acida* contient des polyphénols totaux ( $786,75 \pm 82,33$  mg eq quercétine/g d'extrait sec) et les flavonoïdes totaux ( $250,61 \pm 48,17$  mg eq quercétine/g d'extrait sec). Cet extrait possède une capacité antioxydante totale *in vitro* ( $43,39 \pm 0,89$  µg eq d'acide gallique (EAG)/mg d'extrait sec) et antiradicalaire ( $50,42 \pm 2,86$  EC50 en µg/mL de radical DPPH• réduit) (tableau XXI).

**Tableau XXI** : Taux des composés phénoliques, capacité antioxydante totale et activité antiradicalaire *in vitro* de l'extrait éthanolique de *L. acida*.

Paramètres	Concentration des composés phénoliques (mg eq quercétine/g d'extrait sec)
Polyphénols totaux	$786,75 \pm 82,33$
Flavonoïdes totaux	$250,61 \pm 48,17$
	Capacité antioxydante <i>in vitro</i>
Potentiel antioxydant total (FRAP)	(µg eq d'acide gallique /mg d'extrait sec) $43,39 \pm 0,89$
	Activité antiradicalaire
DPPH	(en pourcentage de radical DPPH• réduit ) $50,42 \pm 2,86$

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  EsSM de trois tests indépendants. eq = équivalent.

#### III.5.2 - Composition minérale de l'extrait éthanolique de *L. acida*

Le tableau XXII indique la composition minérale de l'extrait éthanolique de *L. acida*. Les résultats montrent que, l'extrait de *L. acida* est riche en potassium ( $7387,91 \pm 80,19$  µg/g), en calcium ( $1657,20 \pm 52,65$  µg/g), en sodium ( $979,95 \pm 4,45$  µg/g), en phosphore ( $680,11 \pm 3,38$  µg/g) et en Magnésium ( $343,99 \pm 2,05$  µg/g) (Tableau XXII).

**Tableau XXII** : Composition minérale de l'extrait éthanolique de *L. acida*

Minéraux	Masse (µg/g)
Potassium (K)	7387,91 ± 80,19
Calcium (Ca <sup>2+</sup> )	1657,20 ± 52,65
Sodium (Na <sup>+</sup> )	979,95 ± 4,45
Phosphores (P)	680,11 ± 3,38
Magnésium (Mg <sup>2+</sup> )	343,99 ± 2,05

Les données sont exprimées sous forme de moyens ± ESM, n= 5

### III.6- Effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* en essai aiguë

#### III.6.1- Effets sur l'aspect, le comportement et la mortalité des animaux

Le résumé du comportement des animaux au cours de la période d'observation est consigné dans le tableau XXIII. L'administration orale d'une dose unique de 2000 mg/kg PC même après reprise de l'expérimentation et à la dose de 5000 mg/kg PC n'a induit ni mortalité, ni changement de l'apparence physique générale et de la somatomotricité durant la période d'observation (14 jours). La DL<sub>50</sub> a donc été estimée supérieure à 5000 mg/kg PC 5 (tableau 23).

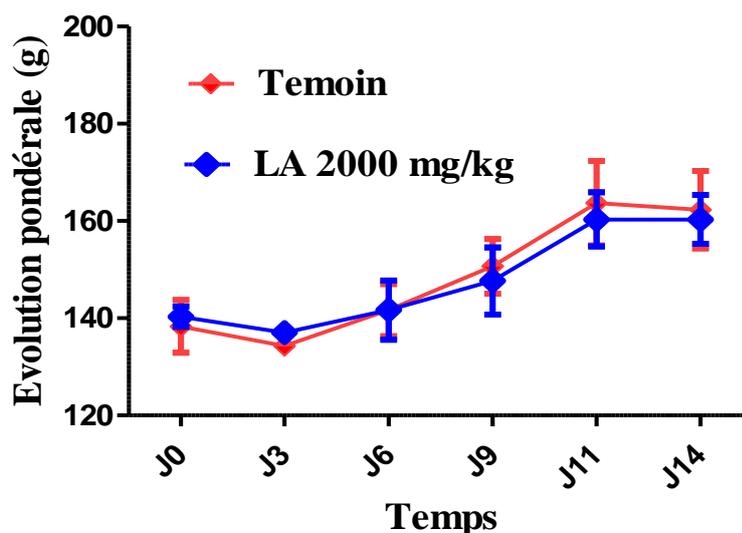
**Tableau XXIII** : Comportement des animaux en essai aigu

	0 min- 30 min	30 min- 4 h	4 h- 24 h	24 - 14 jours
<b>Témoin</b>	- Regroupement des animaux, Toilettage puis repos	- regroupement de tous les animaux	- rythme de vie normale	- Etat normal
<b>2000 mg/kg PC</b>	- Regroupement des animaux Toilettage puis repos	- Toilettage, Regroupement de tous les animaux	- Rythme de vie normale	- État normal

Témoin = animaux recevant de l'eau distillée, LA 2000 mg/kg PC = animaux traités avec l'extrait de *L. acida* à la dose de 2000 mg/kg PC.

#### III.6.2- Effets sur l'évolution pondérale des animaux

La Figure 50 illustre l'évolution pondérale des animaux en essai aigu. Aucune différence significative n'a été observée sur l'évolution de la masse corporelle des animaux traités à l'extrait éthanolique de *L. acida* à la dose de 2000 mg/kg comparée au groupe témoin.



**Figure 50** : Effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur l'évolution pondérale des animaux en essai aiguë

LA 2000 mg/kg = animaux traités à l'extrait éthanolique de *L. acida* à la dose de 2000 mg/kg PC. J = jours. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  ESM (n = 3).

### III.6.3- Effets sur la masse relative des organes

Le tableau XXIV résume les effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur la masse relative des organes. Aucune différence significative n'a été observée chez les animaux recevant l'extrait éthanolique de *L. acida* à la dose 2000 mg/kg par comparaison au groupe témoin.

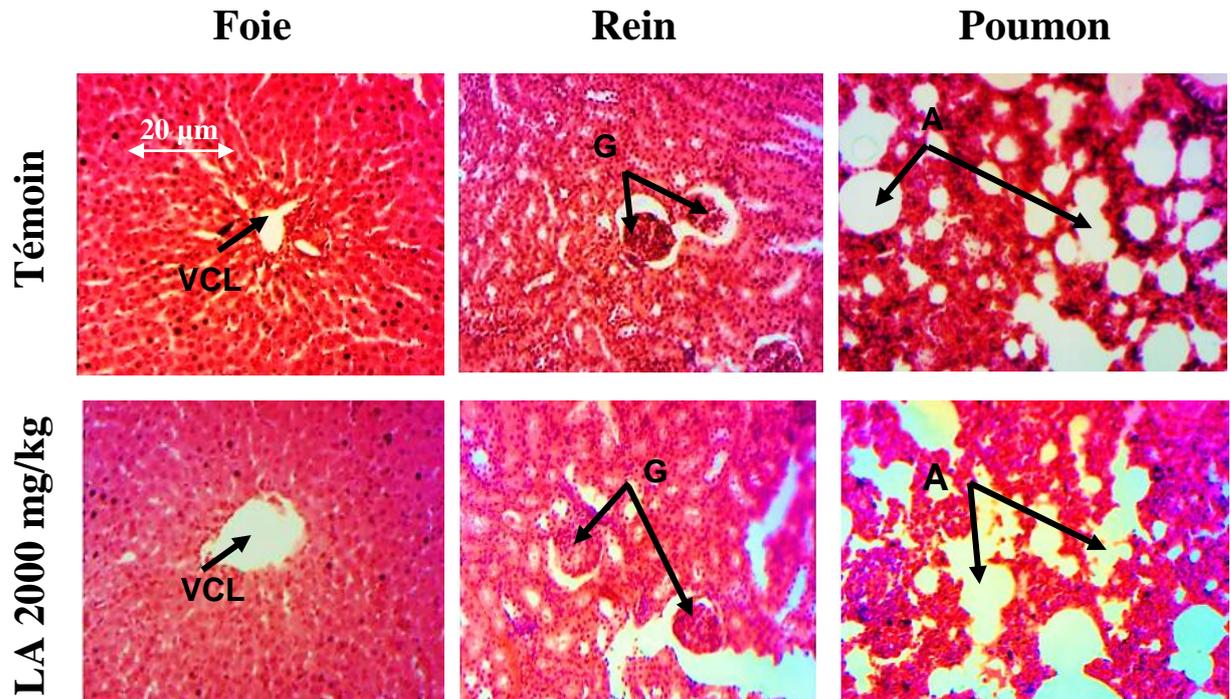
**Tableau XXIV** : effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur la masse relative des organes

Masse relative des organes (mg/kg PC)	Témoin	LA 2000 (mg/kgPC)
<b>Cœur</b>	3864 $\pm$ 183	4025 $\pm$ 191
<b>Estomac</b>	9631 $\pm$ 519	8784 $\pm$ 804
<b>Foie</b>	33656 $\pm$ 698	35103 $\pm$ 185
<b>Poumons</b>	7471 $\pm$ 108	10687 $\pm$ 126
<b>Rate</b>	5079 $\pm$ 798	5502 $\pm$ 767
<b>Reins</b>	5880 $\pm$ 779	6378 $\pm$ 108
<b>Surrénales</b>	486 $\pm$ 117	621 $\pm$ 480

Témoin = animaux recevant de l'eau distillée, LA 2000 mg/kg = animaux traités à l'extrait éthanolique de *L. acida* à la dose de 2000 mg/kg PC. J = jours. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  ESM (n = 3).

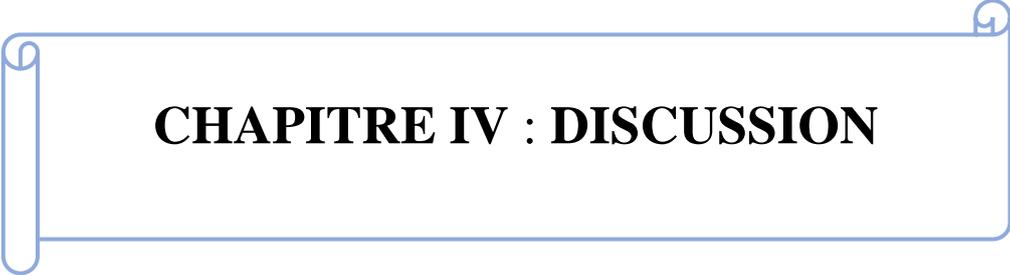
### III.6.4- Effets sur l'histologie des organes

La Figure 51 montre les microphotographies des coupes transversales du foie, du rein et du poumon des animaux ayant reçu l'extrait éthanolique de *L. acida* à la dose de 2000 mg/kg PC ainsi que celles des animaux du groupe témoin. L'examen histopathologique des coupes histologiques du foie, du rein et des poumons des animaux traités à l'extrait de *L. acida* à la dose de 2000 mg/kgPC n'a montré aucun changement structural.



**Figure 51** : Effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur la microarchitecture du foie, du rein, des poumons en essai aiguë (400, coloration à l'hématoxyline-éosine, n = 3).

Témoin = animaux recevant l'eau distillée, LA 2000 mg/kg = animaux traités à l'extrait éthanolique de *L. acida* à la dose de 2000 mg/kg PC. G = glomérule, A = alvéole ; VCL = veine centro-lobulaire,



## **CHAPITRE IV : DISCUSSION**

La phytothérapie n'a cessé de gagner en popularité au cours de ces dernières décennies. Dans les pays en développement, elle représente parfois le principal, voir le seul système thérapeutique utilisé par la majorité de la population pour leur besoin de santé primaire (WHO, 2007). Cet intérêt croissant pour la médecine traditionnelle n'est pas seulement dû à son accessibilité ou à un manque d'accès à la médecine dite conventionnelle, mais aussi aux croyances traditionnelles, à la résistance des nombreuses maladies courantes aux médicaments synthétiques ainsi qu'aux effets secondaires indésirables de ces derniers. *L. acida* A. Rich (Anacardiaceae) est une plante utilisée dans la médecine traditionnelle Africaine et Camerounaise en particulier, pour traiter de nombreuses pathologies telles que les dysménorrhées, l'aménorrhée, l'infertilité (Arbonier, 2009) ; le mal d'estomac, la gonorrhée et le rhumatisme (Kone et al., 2004, Arbonier, 2009). Bien que largement utilisé en médecine traditionnelle, aucune étude sur des effets œstrogéniques et antiostéoporotiques de *L. acida* n'a encore été réalisée.

Plusieurs travaux ont montré que 20 à 30% des femmes âgées de 65 ans souffrent d'ostéoporose consécutive à la ménopause (Ji and Yu, 2015). Etant donné que, la majorité des substances dotées d'effets antiostéoporotiques ont un potentiel œstrogénique, les effets œstrogéniques de l'extrait éthanolique de *L. acida* ont été évalués *in vivo* suivant le protocole recommandé par l'OCDE, (2007) et *in vitro* par la méthode de "E-Screen" (Zingue et al., 2017) sur les cellules de l'adénocarcinomes mammaires (MCF-7). *In vivo*, les travaux de Westwood en 2008, ont montré que le tractus génital des rates subit des modifications histologiques en rapport avec le taux sérique des œstrogènes. Des nombreux auteurs ont montré que l'œstrogénopénie s'accompagne de l'atrophie des organes sexuels (Ateba et al., 2013 ; Zingue et al., 2014). Les résultats de la présente étude montrent que, l'E<sub>2</sub>V a induit des augmentations significatives de la masse relative de l'utérus et de la taille de l'épithélium utérin, ce qui corrobore les observations selon lesquelles, l'examen histologique de l'utérus visant à déterminer la taille de l'épithélium utérin est associée à une mitose abondante indiquant la prolifération cellulaire (Westwood, 2008). Les cellules épithéliales utérines se sont hypertrophiées, passant de la forme cubique chez le témoin négatif (ovariectomisé et recevant de l'eau distillée), à la forme cylindrique chez ceux recevant l'E<sub>2</sub>V. Les effets utérotrophiques des œstrogènes ont été décrits comme étant biphasique, comprenant l'hyperémie et l'imbibition en eau dans l'utérus comme phénomène précoce, la prolifération et la différenciation des cellules utérines comme phénomène tardive. Par conséquent, l'augmentation de la masse utérine est attribuée à l'imbibition d'eau dans l'utérus et/ou la prolifération cellulaire (Coulibaly

*et al.*, 2022). Au niveau utérin, ces effets sont connus et médiés via les récepteurs aux œstrogènes de types  $\alpha$  (Wuttke *et al.*, 2007).

Le traitement à l'extrait éthanolique de *L. acida* trois jours durant, a induit une augmentation de la masse relative de l'utérus aux doses de 50 ( $p < 0,05$ ) et de 200 mg/kg PC ( $p < 0,001$ ) et de la taille de l'épithélium utérin à la dose de 200 mg/kg PC ( $p < 0,05$ ). Des résultats similaires ont été obtenus par Oyeyemi *et al.* (2015) et Coulibaly *et al.* (2022) respectivement après administration de *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) et des feuilles de *Cissus araloïdes* chez des rates ovariectomisées. Au terme 84 jours de traitement à l'extrait éthanolique de *L. acida*, seule la dose 50 mg/kg a induit une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de la taille de l'épithélium utérin. Aucune variation sur la masse relative de l'utérus n'a été observée aux doses testées. Ces résultats sont pareils à ceux de Ateba *et al.* (2013) et pourraient être attribuables à un "down régulation" des récepteurs aux œstrogènes. Ainsi, l'exposition prolongée des rates à l'extrait éthanolique de *L. acida* à des fortes doses provoquerait une désensibilisation des récepteurs aux œstrogènes sur la surface des cellules utérines. Les travaux de Kouakou et Benie, (2003) ont montré que les protéines sont des constituants essentiels des cellules et que toute prolifération cellulaire due à l'effet mitogène et anabolisant des œstrogènes, entraînerait également une augmentation du taux de protéines. L'extrait éthanolique de *L. acida* après trois jours de traitement, a induit aux doses de 100 ( $p < 0,01$ ) et de 200 mg/kg PC ( $p < 0,05$ ) des augmentations significatives du taux de protéines totales et la teneur en eau dans l'utérus à toutes les doses testées (50, 100, 200 et 300 mg/kg PC). Ces résultats sont semblables à ceux de Bleu *et al.* (2012) et Zougrou *et al.*, (2016) et suggèrent que, l'augmentation de la masse relative de l'utérus à la dose de 50 mg/kg est due à l'imbibition d'eau dans l'utérus alors qu'à la dose de 200 mg/kg PC elle serait attribuée à l'imbibition d'eau et à la prolifération cellulaire. L'augmentation de la taille de l'épithélium utérin quant à elle suggère l'imbibition d'eau, l'hypérémie, la prolifération et la différenciation cellulaire. Lilaran et Nazzar, (2012) ont montré que sous l'influence des œstrogènes et des composés à activités œstrogéniques, les cellules de l'endomètre prolifèrent et se différencient, ce qui est concordant avec les résultats obtenus sur la taille de l'épithélium utérin dans ce travail. *L. acida* posséderait des effets œstrogéniques sur l'utérus. Ces effets bénéfiques seraient dus à la présence des composés phénoliques (flavonoïdes) dans cet extrait. En effet, Rimoldi *et al.*, (2007) ont montré que les flavonoïdes plus particulièrement les isoflavonoïdes agissent soit en augmentant la perméabilité vasculaire de l'utérus et engendrer l'infiltration de l'eau dans l'utérus, soit en conduisant à la synthèse des protéines spécifiques après s'être fixés sur les récepteurs aux œstrogènes situés sur l'utérus et initier la cascade de réactions génomiques.

Les résultats sur l'activité œstrogénique *in vitro* de *L. acida* montrent une augmentation du nombre de cellules MCF-7 à des concentrations de 10 µg/mL ( $p < 0,05$ ), 100 µg/mL ( $p < 0,05$ ) et de 200 µg/mL ( $p < 0,001$ ) par comparaison au groupe control exposé uniquement au DMSO. L'augmentation du nombre de cellules MCF-7 dans le test de "E-Screen" a été décrite comme une marque d'œstrogénicité (Zingue *et al.*, 2017). Ces observations viennent confirmer le potentiel œstrogénique de l'extrait de *L. acida* tel qu'obtenu *in vivo* chez des rates ovariectomisées. En effets, 4 flavonoïdes, nommés : 6,7-(2,2-dimethyl chromeno) -8- $\gamma$ ,  $\gamma$ -dimethyl allyl flavanone 1 ; 3,4-dihydroxy-7,8 (2,2-dimethylchromeno) -6 $\gamma$ ,  $\gamma$ -dimethylallylflavonol ; 7-methyltectorigenin et l'Irisolidone 4 ont été isolés de l'extrait de *L. acida* (Sultanat et Ilyas, 1986 ; Muhaisen, 2013). Parmi ces flavonoïdes, l'irisoline 4 et la tectorigenin (analogue de la 7-methyltectorigenine) ont montré des effets œstrogéniques *in vitro* par induction de la prolifération des cellules MCF-7 à des concentrations de 0,1, 1, et 10 µM (Shin *et al.*, 2006).

Dans leurs travaux, Keshri *et al.* (2008) ont émis l'hypothèse selon laquelle, l'augmentation du taux de protéines et de glycogène dans les cellules utérines serait responsable de l'imbibition d'eau dans l'utérus. Dans la présente étude, l'E<sub>2</sub>V à la dose de 1 mg/kg et *L. acida* aux doses de 50, 100 et de 200 mg/kg PC ont induit une augmentation significative du taux de glycogène dans l'utérus. Ces résultats sont en accord avec ceux de Bayala *et al.* (2006) qui ont montré que l'administration d'œstradiol et des substances à activités œstrogéniques provoquent une accumulation du glycogène dans les cellules du myomètre utérin. En effet, l'utérus est un organe qui fonctionne de manière cyclique et l'endomètre subit des changements réguliers pour procurer un environnement propice à l'implantation et au développement de l'ovule fécondé. Un apport en glycogène pour la nutrition du fœtus serait indispensable jusqu'à l'établissement des connexions vasculaires avec l'environnement maternel. L'augmentation du taux de glycogène dans l'utérus est donc une marque d'œstrogénicité.

Les résultats obtenus sur la cytologie vaginale montrent d'une part qu'après ovariectomie, le cycle œstral est bloqué en phase de dioœstrus, caractérisée par la présence quasi exclusive des cellules épithéliales normales ou parabasales sur les frottis vaginaux. Ceci suggère un état de dessèchement vaginal dû à l'arrêt de la prolifération et de la maturation de l'épithélium vaginal consécutive à la carence en œstrogènes gonadiques, causée par l'ovariectomie (Tchatchou, 2014). Après 3 jours de traitement à l'E<sub>2</sub>V et à l'extrait de *L. acida* aux doses de 100 et de 200 mg/kg PC, les résultats obtenus sur la cytologie vaginale ont montré la présence des cellules superficielles sur les frottis vaginaux. Sachant que ces cellules sont des cellules sécrétrices, ces résultats suggèrent que le traitement a induit une lubrification vaginale

par reprise de la prolifération et de la maturation de l'épithélium vaginale (Kulkarni *et al.*, 2012). La cytologie vaginale est l'une des méthodes employées pour évaluer l'œstrogénicité des substances et la cornification de l'épithélium vaginal quant à elle une des méthodes employées pour mesurer les effets œstrogéniques d'une substance à tester (Njamen *et al.*, 2013).

La mesure de la taille des épithélia vaginaux a montré que l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 50, 100 et de 200 mg/kg PC a induit une augmentation significative de la taille de l'épithélium vaginal. Cette augmentation se traduirait par une stimulation de la prolifération des cellules de l'épithélium vaginal avec accumulation des cellules aplaties et cornification vaginale. Ces effets seraient médiés par les récepteurs aux œstrogènes (ER $\alpha$  et ER $\beta$ ) présents au niveau du vagin (Mowa et Iwanaga, 2001). Les études réalisées *in vitro* par Resende *et al.* (2013) ont montré qu'un effet prolifératif relativement supérieur ou égal à 80% correspond à un effet agoniste aux récepteurs  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) aux œstrogènes. Dans la présente étude, *L. acida* a induit à des concentrations de 100 et de 200  $\mu$ g/mL, une prolifération des cellules MCF-7 supérieure à 80%, suggérant son potentiel effet agoniste aux récepteurs  $\alpha$  (ER  $\alpha$ ) aux œstrogènes. Cependant, le cotraitement des cellules MCF-7 à l'œstradiol Benzoate (E<sub>2</sub>B) et à l'extrait éthanolique de *L. acida* à toutes les concentrations, a induit des réductions du nombre total des cellules MCF-7 comparativement aux cellules traitées uniquement à l'E<sub>2</sub>B (10 nM). Les mêmes observations ont été faites par Zingué *et al.* (2017) après traitement des cellules à l'extrait éthanolique de propolis. Ce résultat montre que les composés contenus dans l'extrait de *L. acida* entreraient en compétition avec l'E<sub>2</sub>B sur les récepteurs aux œstrogènes et empêcheraient la prolifération des cellules MCF-7. En effet à des concentrations de 100 à 1000 fois supérieures à celles de l'E<sub>2</sub>V, les phytoœstrogènes compétissent efficacement avec l'E<sub>2</sub>V pour la fixation sur les récepteurs aux œstrogènes.

Les œstrogènes jouent également un rôle indéniable dans le développement de la glande mammaire. Dans des études antérieures, l'analyse histomorphologique des alvéoles et la présence des sécrétions éosinophiles dans la lumière alvéolaire ont été considérées comme des critères d'évaluation de l'activité œstrogénique au niveau des glandes mammaire (Zingue *et al.*, 2013). En effet, la glande mammaire est caractérisée chez l'adulte par la présence des acini formés de deux couches, une couche des cellules épithéliales et une couche des cellules myoépithéliales. On y observe également la présence des tissus de connections et des tissus adipeux. En absence des œstrogènes, les acini restent indifférenciés avec une lumière acinaire rétrécie ainsi qu'une absence des sécrétions éosinophiles (Santell *et al.*, 1997). Dans ces travaux, l'observation des coupes histologiques des glandes mammaires montre que *L. acida*

aux doses testées (100, 200 et 300 mg/kg PC) tout comme l'E<sub>2</sub>V (1mg/kg PC) a augmenté la taille et le diamètre de la lumière des acini, avec une différenciation nette des couches cellulaires constituant l'alvéole, ainsi que la présence d'abondantes sécrétions éosinophiles dans la lumière des acini. Ces résultats sont concordants à ceux de Njamen *et al.* (2013) et Ketcha *et al.* (2016) qui ont montré que, l'administration des substances œstrogéniques inverse la régression de la glande mammaire consécutive à l'ovariectomie. Les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* montrent que l'extrait éthanolique de *L. acida* possède des effets œstrogéniques. Ces effets seraient attribuables à la présence des composés tels que les flavonoïdes et en particulier les isoflavonoïdes qui ont été détectés dans cet extrait (Muhaisen, 2013).

La déficience œstrogénique durant la ménopause est bien connue comme l'un des facteurs pathogéniques de l'ostéoporose. Des nombreux travaux ont montré que, 4 à 12 semaines après ovariectomie, la rate présente un ensemble de troubles caractéristiques de l'ostéoporose (Bagath *et al.*, 2010 et Zhigen *et al.*, 2016). Ayant montré les effets œstrogéniques *in vitro* et *in vivo*, l'extrait éthanolique de *L. acida* pourrait protéger contre l'installation de l'ostéoporose consécutive à l'ovariectomie. Ainsi dans ces travaux, ciblant les effets préventifs de *L. acida* contre l'ostéoporose induite par l'ovariectomie bilatérale, nous avons évalués les effets de l'extrait sur les cibles primaires d'œstrogènes, sur quelques paramètres du métabolisme osseux et sur l'histopathologie des os. Un aperçu toxicologique après 12 semaines de traitement a également été effectué. Au cours de cette étude, les doses utilisées ont été 50 et 200 mg/kg (doses ayant montré les meilleurs effets au cours du test œstrogénique *in vivo*). Les résultats de ces travaux ont montré que, l'ovariectomie a induit une réduction significative ( $p < 0,001$ ) de la masse relative de l'utérus et de la taille des épithélia utérin et vaginal après 84 jours de traitement. Ces résultats sont semblables à ceux de Yoon-Bok *et al.* (2004) et prouvent que l'œstrogénopénie a eu lieu et donc l'installation de l'ostéoporose.

Les travaux de Tabakoğlu *et al.* (2013) ont montré que l'ovariectomie bilatérale entraîne une perte osseuse rapide chez la rate qui est similaire à celle observée chez une femme ostéoporotique. Wronski *et al.* (1986) ont émis l'idée selon laquelle, l'ostéoporose est caractérisée par une perte de la masse osseuse et une diminution du "turn over" osseux chez les rates ovariectomisées. Nos résultats ont montré que, l'ovariectomie a induit une réduction significative ( $p < 0,05$ ) de la masse relative du fémur (frais et sec) ainsi que de la masse relative du tibia (frais et sec), suggérant l'installation de l'ostéoporose. Cependant *L. acida* à la dose optimale (200 mg/kg) tout comme l'E<sub>2</sub>V (1mg/kg) a contrecarré les effets de l'ovariectomie sur les paramètres sus-évoqués. L'augmentation de la masse relative du fémur et du tibia (frais et

sec) suite à l'administration de *L. acida* à la dose de 200 mg/kg indiquerait alors un effet ostéoprotecteur.

Les travaux de Thomas *et al.* (2008) ont montré que le calcium et le phosphore inorganique sont des constituants majeurs de la matrice minérale osseuse. Ils s'associent et se précipitent sous forme d'hydroxyapatite contribuant à la solidification de l'os (Kuhn *et al.*, 2008). Toute variation de la concentration de ces ions dans l'os serait à l'origine de la variation subséquente de la masse osseuse (Ateba *et al.*, 2013). De plus, Heaney *et al.* (2010) ont montré que, la baisse du taux de calcium osseux consécutive à l'ovariectomie est un indicateur d'ostéoporose. Dans ces travaux, l'ovariectomie a induit une baisse du taux de calcium [dans le fémur et le tibia], du taux de phosphore inorganique dans le tibia et une réduction (bien que non significative) du taux du phosphore dans le fémur. *L. acida* à la dose de 200 mg/kg a prévenu la baisse du taux de calcium (dans le fémur) et du phosphore inorganique (dans le tibia et le fémur) indiquant un effet anti-ostéoporotique. De plus, ces résultats suggèrent également que, l'augmentation de masse relative du tibia et du fémur (frais et sec) serait due à l'accumulation des ions calcium et phosphore inorganique dans lesdits os. Des résultats similaires ont été obtenus par Arjmandi *et al.* (2003). Des nombreux travaux (Etuk *et al.*, 2009 ; Muhaisen, 2013) ont montré que *L. acida* possède des alcaloïdes, des tannins et des flavonoïdes/isoflavonoïdes, qui sont des composés ayant des effets bénéfiques sur la masse osseuse (Bhagath *et al.*, 2010). Prise ensemble, ces résultats suggèrent que l'extrait éthanolique de *L. acida* à la dose de 200 mg/kg PC préviendrait la baisse de la masse osseuse consécutive à l'ovariectomie tels que suggéré par Ateba *et al.* (2013) et Zingue *et al.* (2014) après observations des variations physiologiques semblables lorsqu'ils travaillaient respectivement sur les extraits au méthanol de *Eriosema laurentii* De Wild (Leguminosae) et de *Millettia macrophylla* Benth (Fabaceae) .

La densité minérale osseuse (DMO) qui exprime la quantité de minéral en gramme contenu dans un centimètre carré d'os (Ngandeu et Amvene, 2008) a été calculée dans ce travail suivant la méthode de Yoon-Bok *et al.* (2004). Sa détermination constitue une approche diagnostique des risques de fractures osseuses dans le cadre des maladies comme l'ostéoporose. Ainsi, toute baisse de la DMO présage un risque accru de la survenue de fractures (Ozgoçmen *et al.*, 2007 ; Altindag *et al.*, 2008). Les travaux de Zingue *et al.* (2013) ont montré que l'ovariectomie entraîne une baisse de la densité minérale osseuse. Dans la présente étude, l'ovariectomie a induit une réduction de la densité minérale du fémur (33,60%,  $p < 0,01$ ) et du tibia (108,01%,  $p < 0,001$ ) comparé au groupe OVX. Ces résultats corroborent ceux obtenus par Sohair *et al.* (2009) et indiquent un risque de fractures osseuses. *L. acida* à la dose de 200

mg/kg PC a prévenu la baisse de la densité minérale du fémur (24,56%) et du tibia (78,41%). Les résultats semblables ont été obtenus par Njamen *et al.* (2007) et Zhigen *et al.* (2016) qui ont montré que les phytoestrogènes préviennent la résorption osseuse et augmentent la densité minérale osseuse. Les résultats de plusieurs autres travaux ont montré que l'activité de l'alkaline phosphatase sérique (ALPser), biomarqueur de l'activité ostéoblastique et du remaniement osseux augmente lors de l'ostéoporose (Zhang *et al.*, 2006 et Wei *et al.*, 2007). Dans cette étude, l'ovariectomie a induit l'augmentation ( $p < 0,001$ ) de l'activité de l'ALPser. Les résultats semblables ont été obtenus par Zhang *et al.* (2006), suggérant ainsi l'installation de l'ostéoporose chez des rates. L'extrait éthanolique de *L. acida* à la dose de 200 mg/kg tout comme l'E<sub>2</sub>V a empêché l'augmentation de l'activité de l'ALPser. Ces résultats sont conformes à ceux de Wei *et al.* (2007) qui ont émis l'idée selon laquelle les substances à activités œstrogéniques possèdent des effets préventifs contre l'ostéoporose post-ovariectomie.

L'analyse histomorphologique des os est une technique utilisée pour fournir des informations sur l'état de l'os (Lucinda *et al.*, 2010). Elle constitue ainsi un examen privilégié pour le diagnostic de l'ostéoporose. Bonjour *et al.* (2005) ont montré que l'altération de la microarchitecture du tissu osseux chez la rate ovariectomisée indique un état d'ostéoporose. Les résultats montrent que, l'ovariectomie a induit des altérations des microarchitectures du tibia, du fémur, de l'os mandibulaire et de la vertèbre lombaire numéro-3 (VL-3). L'observation des coupes histologiques desdits os indique des détériorations des réseaux trabéculaires suivit d'une diminution de l'imprégnation en moelle osseuse, indiquant une situation d'ostéoporose causée par la carence en œstrogènes consécutive à l'ovariectomie. Des résultats semblables ont été obtenu par Sohair *et al.* (2009) et Zhigen *et al.* (2016). Kindmark *et al.* (1995) ont montré que, la perte osseuse est liée à une augmentation de l'activité des ostéoclastes, source de perforation, de fragmentation du réseau trabéculaire et d'érosion des plaques trabéculaires. Connaissant le rôle des ostéoclastes dans le tissu osseux, les ainsi obtenus indiqueraient une augmentation du nombre et de l'activité des ostéoclastes au détriment des ostéoblastes (Wronski *et al.*, 1986). En outre, le traitement préventif à l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses testées (50 et 200 mg/kg PC) pendant 12 semaines a protégé l'abrasion de la moelle osseuse et/ou la détérioration du réseau trabéculaire et la diminution de l'imprégnation en moelle osseuse à l'intérieur du réseau trabéculaire. Ces résultats sont similaires à ceux de Njamen *et al.* (2013) qui ont montré que les substances à activités œstrogéniques agiraient en réduisant la sensibilité du tissu osseux à la résorption, en bloquant la libération des interleukines 1, 6 et 11 (puissants agents de la résorption osseuse) ou en modulant l'activité des ostéoclastes (Aurbach *et al.*, 1992). Les effets bénéfiques de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur l'os trabéculaire

pourraient être dus à l'habilité de ses métabolites secondaires à inhiber la détérioration de l'os trabéculaire par diminution de la vitesse de résorption osseuse, étant donné que les phytoestrogènes ont été décrits comme ayant des effets inhibiteurs sur l'activités des ostéoclastes (Silvestini *et al.*, 2000).

De nombreux travaux ont montré qu'une déplétion progressive en œstrogène contribue au gain pondéral chez la femme (Tchenof *et al.*, 2000). De même, Dagnault *et al.* (1996) ont montré que la déplétion œstrogénique consécutive à l'ovariectomie mène à un stock d'énergie chez les rates, contribuant à un gain pondéral. Les résultats de la présente étude ont montré que, l'ovariectomie a induit une augmentation de la masse corporelle des animaux de la huitième semaine jusqu'à la fin de l'expérience (douzième semaine). Ce résultat est conforme aux observations précédentes rapportées par Mvondo *et al.* (2011). En effet, le gain pondéral est le résultat de plusieurs processus, impliquant la résistance à la leptine, une diminution de l'expression de l'adiponectine et/ou de la conversion excessive des glucides en matières grasses (Lima *et al.*, 2005). Il pourrait également s'expliquer par une accumulation de graisse suite au changement du métabolisme énergétique des lipides et à l'accumulation du tissu adipeux abdominal causée par l'insuffisance des œstrogènes engendrée par l'ovariectomie (Liu *et al.*, 2009 ; Zhen-Guo *et al.*, 2009). *L. acida* à la dose de 200 mg/kg PC tout comme l'E<sub>2</sub>V a prévenu le gain pondéral consécutive à l'ovariectomie. En effet, Naaz *et al.* (2002) ont montré que, les composés à activités œstrogéniques sont capable d'induire une réversibilité du gain pondéral induit par l'ovariectomie. Ce résultat confirme les effets œstrogéniques de l'extrait éthanolique de *L. acida*. Le mécanisme d'action par lequel les œstrogènes et les substances à activités œstrogéniques inhibent la prise alimentaire reste encore mal connu. Cependant des études menées sur les modèles de souris ERKO ont montré l'implication des ER $\alpha$  dans le contrôle de la prise alimentaire et la modulation du bilan énergétique (Geary *et al.*, 2001). Plusieurs travaux ont montré que l'augmentation de la masse relative des organes est un indicateur des effets toxiques des drogues (Tchoumtchoua *et al.*, 2015 ; Awounfack *et al.*, 2016). Dans cette étude, aucune variation significative de la masse relative du foie, de la rate, du poumon, des reins, des surrénales, du cœur et de l'estomac n'a été observée aux doses testées comparativement au groupe OVX recevant de l'eau distillée. L'examen macroscopique et l'analyse histomorphologique du foie, des reins et des poumons (principaux organes de la détoxification) n'ont révélé aucun changement structural suite au traitement à l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 50 et de 200 mg/kg PC. Ces résultats suggèrent que l'extrait éthanolique de *L. acida* serait faiblement toxique après douze semaines de traitement. Ainsi, selon Piao *et al.*, (2013), après un traitement à long terme avec un extrait, l'absence de signes pathologiques en

examen macroscopique et microscopique des organes permettent de suggérer la faible toxicité de l'extrait.

Les travaux de Lavenus *et al.* (2010) et Noukrati, (2015) ont montré que le tissu osseux joue un rôle dans le processus de l'hématopoïèse, processus au cours duquel il y'a renouvellement des cellules sanguines. Ainsi, le système hématopoïétique constitue un indicateur important du statut physiologique et physiopathologique (Diallo *et al.*, 2009). Il donne des informations sur l'activité de la moelle osseuse et sur des effets intravasculaires (Voigt, 2000). Garnero *et al.* (1994) ont montré que devant toute raréfaction osseuse, la réalisation d'un hémogramme constitue l'un des examens de première intention en plus d'un bilan inflammatoire et phosphocalcique. Les résultats obtenus montrent qu'après 84 jours d'expérimentation, l'ovariectomie a induit une augmentation significative du pourcentage de lymphocytes et de l'hématocrite, du taux de globule rouge et de la concentration en hémoglobine par comparaison au témoin normal. L'augmentation du taux de globule rouge, de l'hématocrite et de la concentration en hémoglobine suggère une polyglobulie et l'augmentation du pourcentage de lymphocyte un état inflammatoire général (Osama *et al.*, 2019). Toutefois, il est à noter que ces légères variations bien que significative se situent dans la fourchette des valeurs physiologiques normales (Fallon, 1996) et semble ne pas constituer un effet toxique mais plutôt un effet temps- dépendant (Tchoumtchoua *et al.*, 2014). *L. acida* a provoqué des réductions du poucentage d'hématocrite aux doses de 50 et de 200 mg/kg et de la concentration en hémoglobine à la dose de 50 mg/kg suggérant une anémie microcytaire. Ces résultats sont opposés à ceux rapportés par Koné *et al.* (2004) qui ont montré que les écorces du tronc de *L. acida* sont utilisées pour traiter l'anémie. Les résultats ainsi obtenus seraient dus aux doses administrées ou au temps d'exposition des animaux à l'extrait de *L. acida*. En effet, l'administration chronique de *L. acida* agirait sur les cellules souches et empêcherait soit la production des globules rouge ou diminuerait le taux de globule rouge circulant. *L. acida* à la dose de 200 mg/kg a significativement baissé les taux de lymphocytes ( $p < 0,01$ ) et de l'hématocrite ( $p < 0,05$ ) et prévenue la baisse du taux de granulocytes. Sachant que les lymphocytes et les granulocytes sont des sous-populations des globules blancs, les résultats ainsi obtenus montrent que l'extrait éthanolique de *L. acida* agit de façon différente sur les sous-populations des leucocytes. En effet, de nombreux travaux ont montré que, les œstrogènes ont une action immunosuppressive (Katerere et Luseba, 2010). Ils ont la capacité de diminuer la chimiotaxie des monocytes en diminuant l'expression des molécules d'adhésion induites par l'environnement pro-inflammatoire. Ainsi, la baisse du taux de lymphocytes, (bien que se trouvant dans la fourchette physiologique normale), présage d'un effet immunosuppressif.

Cette immunosuppression est dû à la présence des flavonoïdes contenus dans l'extrait (Hasan, 2013) dont les propriétés immunosuppressives ont été démontrées (Bruneton, 2009). Pris ensemble, ces résultats montrent au moins en partie que l'extrait éthanolique de *L. acida* prévient l'installation de l'ostéoporose induite par l'ovariectomie.

Les femmes ostéoporotiques au quotidien font face à un risque accru de fractures osseuses. Etant donné que, *L. acida* a montré des effets préventifs sur un modèle d'ostéoporose post-ovariectomie, il a nous a été important d'évaluer par la suite, ses effets sur l'une des complications la plus fréquente de l'ostéoporose : la fracture de l'extrémité supérieure du fémur. Au cours de cette expérimentation, trois doses ont été utilisées (50 ,100 et 200 mg/kg PC). Les travaux de Briot *et al.* (2012) ont montré que les fractures ostéoporotiques sont associées à une morbidité et a une mortalité accrue. Dans notre étude, les résultats ont montré chez les animaux ovariectomisés et fracturés un taux de survie de 65% chez les témoins négatifs, contre 100% chez le témoin normal. Chez des rates traitées à l'extrait de *L. acida* aux doses de 100 et de 200 mg/kg PC, le taux de survie a été de 85% ; soit au total 15% de décès. *L. acida* à la dose de 50 mg/kg PC tout comme l'E<sub>2</sub>V a présenté un taux de survie de 100%. Les résultats ainsi obtenus montrent que *L. acida* à la dose de 50 mg/kg PC empêcherait la mortalité de suite de fracture chez les animaux. Chez les animaux non-ovariectomisés ayant été fracturés, les rates traitées à l'extrait éthanolique de *L. acida* aux doses de 100 et de 200 mg/kg PC tout comme celles du groupe normal ont présenté un taux de survie de 85% tandis que celles traitées à la dose de 50 mg/kg PC présentaient un taux de survie de 100%. L'ensemble de ces résultats montre que, l'extrait éthanolique de *L. acida* réduirait le taux de mortalité consécutive à la fracture du fémur chez les rates ovariectomisées et chez les rates non ovariectomisées.

Quatre-vingt-dix jours post-ovariectomie, les effets de l'extrait éthanolique de *L. acida* ont été évalués sur les cibles primaires des œstrogènes à savoir le vagin et l'utérus. Les résultats ont montré que l'ovariectomie a induit une réduction significative de la masse relative de l'utérus et de la taille des épithélia utérin et vaginal comparativement au témoin normal (SHAM). Ces résultats sont en accord avec des travaux (Ateba *et al.*, 2013 ; Zingue *et al.*, 2014) et indiquent une déplétion en œstrogène endogène.

Les travaux de Lavenus *et al.* (2010) ont montré que, la moelle rouge des os contenue dans fémur est le principal site de l'hématopoïèse. Ainsi, toute lésion du fémur pourrait affectée le processus de l'hématopoïèse. Les résultats sur les paramètres hématologiques n'ont montré aucune variation significative des paramètres hématologiques chez les animaux OVX- fracturés recevant de l'eau distillée (témoins négatifs) par comparaison au témoin normal. Les mêmes résultats ont été obtenus chez les animaux OVX- fracturés traités à l'E<sub>2</sub>V (1mg/Kg) et/ ou *L.*

*acida* à toutes les doses testées (50,100 et 200 mg/kg PC). Ces résultats montrent que le processus d'hématopoïèse n'a pas été affecté suite à la fracturation du fémur. Chez les animaux SHAM-fracturés, *L. acida* a induit à toutes les doses testées (50, 100 et 200 mg/kg PC) des réductions significatives ( $p < 0,001$ ) du taux de globules blancs par comparaison au témoin normal. Connaissant le rôle des globules blancs dans la défense immunitaire, ces résultats suggèrent une activité immunosuppressive. Outre son rôle de support mécanique de la protection de la moelle osseuse, le fémur intervient également dans le maintien de l'homéostasie du métabolisme osseux (Ramajayam *et al.*, 2007). Ainsi, toute baisse de la masse ou de la densité minérale du fémur indique un risque accru de fracture (Njamen *et al.*, 2007). Les résultats de ces travaux ont montré une réduction de la masse relative du fémur (frais et sec) et de sa densité minérale ( $p < 0,05$ ) chez le témoin négatif. *L. acida* (50 et 100 mg/kg) a induit chez les animaux OVX-fracturés, une augmentation de la masse relative du fémur frais ( $p < 0,05$ ), du fémur sec ( $p < 0,001$ ) et de la densité minérale du fémur doses de 50 mg/kg ( $p < 0,05$ ) et de 100 mg/kg ( $p < 0,01$ ) comparé au témoin négatif. Ces résultats montrent que l'extrait éthanolique de *L. acida* diminue le risque de fracture du fémur. Il est bien connu que la masse relative de l'os varie en fonction de sa richesse en calcium et en phosphore. Les résultats ont montré chez le témoin négatif une baisse ( $p < 0,001$ ) du taux de calcium (sérique et osseux) et du phosphore inorganique sérique. Ces résultats montrent que la baisse de la masse relative du fémur est consécutive à la baisse du taux de calcium et du phosphore comme observer dans notre précédant travail portant sur l'ostéoporose. L'extrait éthanolique de *L. acida*, a induit chez les animaux OVX- fracturés, une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) du taux de calcium sérique (50, 100 et 200 mg/kg PC) et osseux (100 et 200 mg/kg PC), ainsi que du taux de phosphore inorganique sérique ( $p < 0,01$ , 100 mg/kg PC) et osseux ( $p < 0,01$  ; 200 mg/kg PC). Chez les animaux SHAM-fracturés une augmentation ( $p < 0,001$ ) du taux de calcium sérique aux doses de 50 et de 200 mg/kg PC et du phosphore inorganique osseux ( $p < 0,05$ ) a été observée par comparaison au témoin normal. En effets, les travaux de Leung *et al.* (1968) ont montré que, les feuilles de *L. acida* contiennent des ions calciums et phosphores. De plus, la détermination de la composition minérale de l'extrait éthanolique des écorces du tronc de *L. acida* a révélé entre autres la présence des ions calcium ( $1657,2 \pm 52,65 \mu\text{g/g}$ ) et phosphore ( $680,11 \pm 3,38 \mu\text{g/g}$ ) qui sont des principaux ions qui participent à la minéralisation du tissu ostéoïde durant la phase de formation osseuse (Kini *et al.*, 2012 ; Ngueguim *et al.*, 2017). Ces résultats indiquent que l'augmentation du taux de calcium et de phosphore est due à l'administration de l'extrait éthanolique de *L. acida*. Ainsi, l'administration de l'extrait éthanolique de *L. acida* aux rates fracturées et non fracturées contribuerait à la consolidation

des os par apport des minéraux important pour la minéralisation du tissu ostéoïde. Cette minéralisation osseuse est consécutive non seulement à la présence des ions, mais également à la présence des flavonoïdes (Sultanat et Ilyas, 1986 ; Muhaisen, 2013). De nombreux travaux ont montré que les flavonoïdes stimulent le recrutement des ostéoblastes sur les sites osseux fracturés (Doblare *et al.*, 2004), augmentent leur nombre ainsi que leur activité et contribuent ainsi à la consolidation des os (Sharan *et al.*, 2011). En effet, le processus de consolidation et de remodelage de la fracture est directement dépendant du "turnover" et du métabolisme phosphocalcique (Marongiu *et al.*, 2020). Les travaux de Matsuoka *et al.* (2014) ont montré que les ostéoblastes sont responsables de la formation de l'os nouveau, initiée par l'accumulation du calcium et du phosphore inorganique et les ostéoclastes quant à eux sont des acteurs de la résorption osseuse. Ainsi, l'augmentation des taux de calcium osseux et du phosphore inorganique suite à l'administration de l'extrait éthanolique de *L. acida* indique la formation osseuse. D'autres part, l'augmentation du taux de calcium peut être une conséquence de l'ostéoporose, l'hyperthyroïdisme et/ou d'une maladie maligne, la thyrotoxicose et d'une diminution de l'excrétion urinaire. Cependant, dans le cas d'ostéoporose, de l'hyperthyroïdisme et/ou d'une maladie maligne et de la thyrotoxicose, le mécanisme global est l'activation des ostéoclastes qui induisent la résorption osseuse et l'augmentation du taux de calcium demeure seulement dans le sang avec une incapacité d'élimination à travers le rein (Žofková, 2016 ; Zagzag *et al.*, 2018 ; Feldenzer *et al.*, 2018). Ainsi *L. acida* diminuerait l'excrétion urinaire du calcium. D'autre part, les résultats montrent des augmentations des taux de calcium et de phosphore osseux suite au traitement à *L. acida* suggérant que l'extrait apporterait des matériels qui entreraient dans la constitution de l'os. Cette constitution osseuse ne peut être possible que si les ostéoblastes, chefs d'orchestre de la formation osseuse sont activées.

L'alcaline phosphatase (ALP) est un biomarqueur spécifique de la formation osseuse sécrétée par les ostéoblastes durant la phase de la formation osseuse (Kini *et al.*, 2012). Les résultats obtenus montrent chez les témoins négatifs, une augmentation significative de l'activité de l'alcaline phosphatase sérique ( $p < 0,05$ ) et osseuse ( $p < 0,05$ ) comparée au témoin normal. L'extrait éthanolique de *L. acida* tout comme l'E<sub>2</sub>V (1 mg/kg) a significativement baissé les activités de l'ALPser aux doses de 50 et de 100 mg/kg ( $p < 0,001$ ) et de l'ALPos a toutes les doses testées (50, 100 et 200 mg/kg). Chez les animaux normaux-fracturés, le traitement à l'extrait éthanolique de *L. acida* a induit l'augmentation de l'activité de l'ALPos à la dose de 100 mg/kg et une réduction significative ( $p < 0,001$ ) de l'activité de l'ALPser à la dose de 50 mg/kg comparé au témoin normal. Plusieurs études ont montré que la réduction de l'activité de l'alcaline phosphatase osseuse et sérique correspond à la phase de la guérison des

fractures (Komnenou *et al.*, 2005 ; Sousa *et al.*, 2011 ; Nguéguim *et al.*, 2017). En effet, Komnenou *et al.* (2005) ont montré que le processus normal de guérison de la fracture est initié par l'augmentation de l'activité des ostéoblastes qui sécrètent une grande quantité de l'ALP responsable de la formation et de la minéralisation osseuse. Ainsi, une guérison osseuse rapide entraîne une baisse rapide de l'activité de l'ALP. Les résultats obtenus indiquent que le traitement à l'extrait éthanolique de *L. acida* accélère la cicatrisation osseuse chez les animaux OVX-fracturés et normaux-fracturés.

La radiographie du fémur des animaux du groupe OVX-fracturés (témoin négatif) montre une cicatrisation osseuse incomplète. Les résultats similaires ont été obtenus par de nombreux auteurs (Pereira *et al.* 2007) qui ont montré que l'œstrogénopénie entraîne une cicatrisation osseuse imparfaite. *L. acida* à toutes les doses testées (50, 100 et 200 mg/kg PC) a entraîné chez les animaux OVX-fracturés, une cicatrisation osseuse totale. Des observations similaires ont été faites chez les animaux normaux-fracturés. Ces résultats corroborent ceux de Nguéguim *et al.* (2017) qui ont observé une régénération totale du fémur chez les rates après 14 jours de traitement à l'extrait aqueux de *Peperomia pellucida* à la dose de 400 mg/kg PC. En effet, le processus de cicatrisation osseuse nécessite trois événements : le recrutement (qui consiste à la migration des cellules ostéoprogénitrices vers le site de réparation), suivie de la modulation (représentant l'activation et la différenciation des cellules ostéoprogénitrices en ostéoblastes actifs) ; et enfin de l'ostéo-construction (qui implique la formation d'un échafaudage tridimensionnel sur lequel les ostéoblastes déposent de l'os nouveau) (Yoneda *et al.*, 2013). Plusieurs travaux ont montré que les œstrogènes induisent sur les ostéoblastes des effets bénéfiques sur la formation osseuse par activation de la prolifération, l'induction de la sécrétion de protéines collagéniques et non collagéniques ainsi que des facteurs de croissance (IGF I et II, TGF $\beta$  3) qui sont à leur tour responsables d'une augmentation de la multiplication et de la différenciation cellulaire (Ernst *et al.*, 1989 ; Pacifici *et al.*, 1996). Les résultats observés sur la radiographie du fémur suggèrent que *L. acida* stimulerait l'ostéoblastogénèse responsable de la production des facteurs de croissance qui induiraient des effets mitogènes conduisant à la cicatrisation des os. Les résultats de l'analyse histologique et l'histomorphométrie du fémur montrent chez les témoins négatifs une destruction de la microarchitecture du fémur caractérisée par une diminution de la concentration de la moelle osseuse dans le réseau trabéculaire et une diminution ( $p < 0,001$ ) de l'épaisseur de l'os trabéculaire. *L. acida* à toutes les doses testées (50, 100 et 200 mg/kg PC) tout comme l'E<sub>2</sub>V a restauré le tissu osseux (chez les animaux OVX-fracturés et normaux - fracturés) et augmenté ( $p < 0,001$ ) l'épaisseur de l'os trabéculaire des animaux OVX-fracturés. Aucune variation significative de l'épaisseur de l'os

trabéculaire n'a été observée chez les animaux normaux-fracturés comparée au control normal. D'après Bhagath *et al.* (2010), la fracture osseuse résulte de la réduction des épaisseurs de l'os trabéculaire et de l'os cortical. L'extrait éthanolique de *L. acida* empêcherait donc la perte osseuse et donc la survenue des fractures osseuses.

Les travaux de Kuyumcu *et al.*, 2012 et Young *et al.*, 2015 ont montré que le stress oxydant est l'un des processus de base des dommages cellulaires et tissulaires impliqués dans les pathologies dégénératives telles que : le cancer, l'athérosclérose, l'arthrite et l'ostéoporose. Les travaux de Cervellati *et al.* (2013) et Carlo *et al.* (2014) ont montré qu'au cours de l'ostéoporose postménopausique, il y'a une surproduction des radicaux libres qui sont impliqués dans le processus de reperfusion ischémique durant la formation des calles osseuses après la fracture (Cetinus *et al.*, 2005 ; Sheweita et Koshhal, 2007 ;). En effet, les radicaux libres de notre organisme sont contrôlés par des antioxydants. Quand cet équilibre est rompu soit par une baisse de l'activité antioxydante ou par une augmentation du nombre de radicaux libres, il survient un stress oxydatif associée à une variété de troubles (Sheweita *et al.*, 2012). Un antioxydant est défini comme toute substance qui, lorsqu'elle est présente à des concentrations faibles par rapport à celles d'un substrat oxydable, retarde ou empêche l'oxydation de ce substrat de manière significative. Des résultats des tests *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'augmentation de la quantité des espèces réactives à l'oxygène (ERO) dans le tissu osseux lors d'une situation de carence œstrogénique est un mécanisme qui contribuerait à la destruction osseuse accélérée et aux risques de fractures. En effet, Muthusami *et al.* (2005) ont montré que chez la rate, l'ovariectomie induit un stress oxydatif et altère l'expression d'antioxydant. De même, Maggio *et al.* (2003) ont montré que chez la femme, les ERO jouent un rôle dans la perte osseuse post-ménopausique. Ainsi, la catalase est une enzyme qui catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène, protégeant ainsi les tissus (Sajeeth *et al.*, 2011). La glutathion peroxydase (GPx) quant à elle est une enzyme qui catalyse le catabolisme du peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène (Sajeeth *et al.*, 2011). Les résultats de la présente étude montrent chez les témoins négatifs une réduction significative ( $p < 0,01$ ) de l'activité de la GPx comparé au témoin normal. Ces résultats corroborent ceux de Sohair *et al.* (2009) et suggèrent que la fracture est à l'origine de la surproduction des radicaux libres chez les animaux ovariectomisés. L'E<sub>2</sub>V et l'extrait éthanolique de *L. acida* à toutes les doses testées (50, 100 et 200 mg/kg PC) ont induits des augmentations ( $p < 0,001$ ) de l'activité de la GPx chez les animaux OVX-fracturés. Seule *L. acida* à la dose de 100 mg/kg a significativement augmenté ( $p < 0,001$ ) l'activité de la catalase. Chez les animaux normaux-fracturés, l'extrait éthanolique de *L. acida* a induit des augmentations significatives ( $p < 0,001$ ) des activités de la catalase à

la dose de 100 mg/kg, de la GPx aux doses de 100 et 200 mg/kg et une réduction ( $p < 0,05$ ) de l'activité de la GPx à la dose de 50 mg/kg PC par comparaison au témoin normal. L'augmentation de l'activité de la catalase et de la GPx indique que l'extrait éthanolique de *L. acida* possède des propriétés antioxydantes telles que montré par Ouattara *et al.* (2011). Les propriétés antioxydantes ainsi obtenues seraient dues à la présence des composés phénoliques contenus dans cet extrait dont l'activité antioxydante a été largement documentée (Orshal et Khalil, 2004). En effet, des nombreux travaux ont montré que, les composés à activités oestrogéniques exerceraient des effets antioxydants en limitant soit la production des ERO, du peroxyde d'hydrogène, la peroxydation lipidique, soit en empêchant l'accumulation intracellulaire du peroxyde d'hydrogène ou en protégeant contre le stress oxydant (Jakob *et al.*, 2011). La capacité antioxydante totale a été déterminée par la méthode de la FRAP "*Ferric Reducing Antioxidant Power*" telle que décrite par Benzie *et al.* (1996) et les résultats ont montré une réduction ( $p < 0,001$ ) de l'activité de la FRAP osseuse chez les témoins négatifs comparé au témoin normal. Des résultats semblables ont été obtenus par Sanchez-Rodriguez *et al.* (2007) et Carlo *et al.* (2014) et indiquent que la fracture induit chez les animaux ovariectomisés le stress oxydant et donc l'altération de l'expression d'antioxydant. En outre, *L. acida* aux doses testées (50, 100 et 200 mg/kg PC) a induit l'augmentation ( $p < 0,001$ ) de l'activité de la FRAP osseuse chez les animaux OVX-fracturés et chez animaux normaux-fracturés. Les mêmes résultats ont été obtenus par Ozlan *et al.* (2008). Des études ont montré que les œstrogènes pourraient exercer leurs propriétés antioxydantes en piégeant les radicaux libres (Reyes *et al.*, 2006), et de ce fait, préviendraient les dommages induits par l'oxydation des substrats organiques (Prokai *et al.*, 2008). Les résultats obtenus montrent que *L. acida* possède des propriétés antioxydantes (Ouattara *et al.*, 2011). Ces propriétés antioxydantes de l'extrait éthanolique de *L. acida* observées *in vivo*, ont été confirmées *in vitro* par la méthode de la FRAP (Benzie et Strain, 1996) et par la détermination de l'activité antiradicalaire de la DPPH suivant la méthode décrite par Katalinié *et al.* (2003). En effet, plusieurs classes de composés à l'instar des polyphénols ont montré leur efficacité antioxydante au niveau osseux (Sarma *et al.*, 2015). De ce fait les polyphénols totaux et les flavonoïdes contenus dans l'extrait éthanolique de *L. acida* seraient des composés responsables de ces effets antioxydants. Les travaux de Sandukji *et al.* (2011) ont montré qu'un traitement à l'aide d'un antioxydant améliore le paramètre osseux et les marqueurs du stress oxydant chez les patients souffrant de fractures osseuses et pourrait de ce fait être bénéfique dans la guérison de la fracture. Ces résultats pris ensemble montrent que *L. acida* accélère la cicatrisation osseuse par augmentation de la capacité antioxydante dans l'os.

L'action physiologique des composés à activités œstrogéniques pourrait se faire via la fixation sur les récepteurs aux œstrogènes. Ainsi, ayant montré des effets bénéfiques contre l'ostéoporose postménopausique et ses complications, nous avons évalué les mécanismes d'action par lesquels *L. acida* pourrait agir pour induire ses effets sur les cellules cibles. Les effets de *L. acida* sur les cellules cibles *in vitro*, l'évaluation de l'activation des récepteurs aux œstrogènes stablement transfectés sur les cellules de la lignée HEK293T du rein humain et l'antagonisation des récepteurs aux œstrogènes *in vivo* ont été réalisés. *In vivo*, les résultats ont montré que l'extrait éthanolique de *L. acida* à la dose de 50 mg/kg tout comme l'E<sub>2</sub>V a induit des augmentations significatives ( $p < 0,001$ ) de la masse et de la taille des épithélia utérin et vaginal (histologie) par comparaison au témoin négatif. Par ailleurs, l'ICI (0,15 mL) a inversé les effets de l'E<sub>2</sub>V sur l'utérus et sur le vagin. Le cotraitement avec LA50+ICI n'a induit aucune variation significative sur la masse relative de l'utérus et de la taille des épithélia utérin et vaginal comparé au groupe recevant uniquement *L. acida* à la dose de 50 mg/kg. Sur la glande mammaire, les résultats ont montré une augmentation du diamètre et de la lumière des alvéoles, avec une différenciation nette des couches cellulaires et des sécrétions éosinophiles chez les animaux du groupe SHAM comparés au témoin négatif (OVX). Ces résultats renforcent l'effet œstrogénique de *L. acida* tel qu'obtenu dans nos précédents travaux. Par ailleurs, l'ICI a antagonisé les effets de l'E<sub>2</sub>V et de *L. acida* (50 mg/kg) sur la glande mammaire, induisant le rétrécissement du diamètre des acini avec une faible sécrétion éosinophile (avec l'E<sub>2</sub>V) et une absence des acini et de sécrétions éosinophiles avec *L. acida*. Ces résultats suggèrent que les effets œstrogéniques de l'extrait éthanolique de *L. acida* se feraient via des mécanismes indépendants des récepteurs aux œstrogènes. Les résultats de l'œstrogénicité *in vitro*, ont montré que l'E<sub>2</sub>B a induit une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) de l'activité de la luciférase pour les deux sous types de récepteurs aux œstrogènes (ER $\alpha$ ) et (ER $\beta$ ) par comparaison au groupe control recevant le DMSO. Le fulvestrant a antagonisé l'effet de l'E<sub>2</sub>B sur les deux types de récepteurs. Par ailleurs, l'extrait éthanolique de *L. acida* a toutes les concentrations testées ( $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$  et  $10^{-1}$   $\mu\text{g/mL}$ ) a significativement baissé l'activité de la luciférase sur les deux sous-types des récepteurs aux œstrogènes. *L. acida* a antagonisé l'E<sub>2</sub>B pour les deux sous types de récepteurs aux œstrogènes ER $\alpha$  (0,01 et 0,1  $\mu\text{g/mL}$ ) et ER $\beta$  (0,01  $\mu\text{g/mL}$ ). La réduction de l'activité de la luciférase suite à l'administration conjointe de l'E<sub>2</sub>B et *L. acida* pour les deux types de récepteurs prouvent que *L. acida* contient des métabolites secondaires qui entreraient en compétition sur les récepteurs aux œstrogènes. Ainsi, l'ensemble des résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* montrent que l'extrait de *L. acida* n'agirait pas via les récepteurs aux œstrogènes. Des nombreux travaux *in vitro* ont montré que les cellules

MCF-7 ont la capacité d'activer l'aromatase et la 5  $\alpha$ -réductase enzymes de la conversion des androgènes en œstrogènes (Korner *et al.*, 1999 ; Resende *et al.*, 2013) et d'induire les effets œstrogéniques via la voie génomique et non génomique (Schiliro *et al.*, 2011). Nos résultats ont montré que *L. acida* a induit la prolifération des cellules MCF-7 suggérant qu'elle agirait par activation de l'aromatase ou de la 5  $\alpha$ -réductase.

Les données obtenues après un essai de toxicité orale aiguë chez l'animal peuvent être utilisées pour satisfaire à des besoins de classification du danger par le biais de la DL<sub>50</sub>, et pour l'évaluation des risques pour la santé humaine et/ou pour l'environnement (OECD, 2001a). C'est sur cette base qu'une évaluation de la toxicité orale aiguë de l'extrait éthanolique de *L. acida* a été réalisée chez la rate Wistar. Il en ressort de cette étude que, l'administration de l'extrait éthanolique de *L. acida* à la dose unique de 2000 mg/kg PC, suivant les deux (02) premières heures n'a induit aucun changement dans l'apparence physique et dans la somatomotricité durant la période d'observation. Aucune manifestation de convulsions, salivation et diarrhée liée au traitement n'a été observée. Cet extrait n'a induit aucune morbidité et/ou mortalité chez les animaux durant de 14 jours après administration orale d'une dose unique de 2000 mg/kg PC. Comparé au groupe témoin recevant de l'eau distillée, la masse corporelle et la masse relative des organes n'ont présenté aucune différence significative. L'autopsie des animaux d'essai n'a révélé aucune anomalie liée au traitement. Le poumon, le foie, et les reins ont gardé leur structure normale. Ainsi, selon la méthode d'évaluation de toxicité orale aiguë utilisée dans cette étude (OECD, 2001a), l'extrait éthanolique de *L. acida* est classé dans la catégorie 5 ou non classifié dans le système de classification globalement harmonisé des substances chimiques et les mélanges chimiques (GHS) comme adopté par l'OECD (2001b). Sur cette base, la DL<sub>50</sub> est estimée supérieure à 2000 mg/kg PC. Ces résultats suggèrent que l'extrait éthanolique de *L. acida* serait à faible risque pour la santé en administration orale.

**CONCLUSION, RECOMMANDATIONS  
ET  
PERPECTIVES**

La présente étude avait pour objectif de déterminer *in vitro* et *in vivo* les effets œstrogéniques et anti-ostéoporotiques de l'extrait éthanolique des écorces du tronc de *L. acida*. Il ressort que l'extrait éthanolique de *L. acida* possède aux doses de 50 et de 200 mg/kg des effets œstrogéniques *in vivo* au niveau de l'utérus, du vagin et des glandes mammaires et *in vitro* par induction de la prolifération des cellules MCF-7 aux concentrations de 10, 100 et de 200 µg/ mL. Au terme de 12 semaines de traitement post-ovariectomie, *L. acida* a prévenu aux doses de 50 et 200 mg/kg, les variations négatives des paramètres physiques et biochimiques du métabolisme osseux et donc l'ostéoporose induite par l'ovariectomie. L'analyse histologique des os (fémur, tibia, VL-3 et de l'os mandibulaire) a montré que *L. acida* a protégé de la désorganisation de la microarchitecture desdits os. L'extrait éthanolique de *L. acida* a également prévenu la réduction de l'épaisseur de l'os trabéculaire et induit une cicatrisation de la fracture fémorale aux doses de 50, 100 et de 200 mg/kg. Cet extrait préviendrait les dommages cellulaires par augmentation du taux de calcium et de phosphate inorganique, et en améliorant les paramètres du stress oxydant (l'activité de la catalase, de la glutathion peroxydase et de la capacité antioxydante totale) après 60 jours de traitement. Ces effets bénéfiques seraient dû aux composés polyphénoliques dont la concentration a été déterminée dans cet extrait. *L. acida* induirait ses effets par activation de l'aromatase ou de la 5  $\alpha$ -réductase enzymes responsables de la conversion des androgènes en œstrogènes. L'évaluation de la toxicité orale aiguë et l'aperçue toxicologique établie à l'issue du traitement à long terme ont montré que l'extrait éthanolique de *L. acida* serait faiblement toxique. La DL<sub>50</sub> en administration orale de l'extrait de *L. acida* a été estimée supérieure à 2000 mg/kg PC. Ces résultats montrent que *L. acida* posséderait des effets œstrogéniques et anti-ostéoporotiques et soutiendraient son utilisation traditionnelle dans le traitement de l'infertilité, des douleurs osseuses et musculosqueletiques post-ménopausiques.

Nous recommandons aux phytothérapeutes d'utiliser les doses 50 et 200 mg/kg pour traiter l'infertilité et des douleurs osseuses et musculosqueletiques post-ménopausiques.

### **Perspectives :**

En complément à ce travail, nous nous proposons dans un avenir proche :

- D'évaluer les effets préventifs et curatifs de l'extrait éthanolique de *L. acida* sur d'autres modèles d'ostéoporose chez les rats Wistar ;
- Faire un fractionnement bio-guidé, isoler et tester les différents composés bioactifs de *L. acida in vitro et in vivo* ;
- Réaliser une étude sur la toxicité orale subchronique et chronique de l'extrait éthanolique de *L. acida*.

## REFERENCES

- Abdellah SMB, Ngbanda AR, Bensaoud M, Rezqui A, Tazi MA.** Age-adjusted incidence rates of hip fractures between 2006 and 2009 in Rabat, Morocco. *Osteoporos Int.* 2012; 79: 112-117
- Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A.** Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Rev Rhum.* 2007; 74: 636 - 643.
- Agatonovic-Kustrin S, Turner JV, Glass BD.** Molecular structural characteristics as determinants of estrogen receptor selectivity. *J Pharm Biomed Anal.* 2008; 48: 369-375.
- Ahmed MK, Mabrouk MA, Anuka JA, Attahir A, Tanko Y, Wawata AU and Yusuf MS.** Studies of the effect of methanolic stem bark extract of *Lannea acida* on fertility and testosterone in male Wistar rats. *Asian J Med Sci.* 2010; 2: 253-258.
- Ahn H, Seo DH, Kim HS, Choue R.** Calorie restriction aggravated cortical and trabecular bone architecture in ovariectomy-induced estrogen-deficient rats. *Nutr Res.* 2014; 34:707-713.
- Aimé CM T, Pepin ANE, Désiré MA, Georges RFB, Albert k and Pierre W.** Colibri® insecticide induces male reproductive toxicity: alleviating effects of *Lannea acida* (Anacardiaceae) in rats. *B clin Andocrinol.* 2019; 29: 1-13.
- Akinsinde KA, Olukoya DK.** Vibriocidal activities of some local herbs. *J Diarrhoeal Dis Res.* 1995; 13:127-9.
- Al-Anazi AF, Qureshi VF, Javid K, Qureshi S.** Preventive effects of phytoestrogens against post-menopausal osteoporosis as compared to the available therapeutic choices: an overview. *J Nat Sci Biol Med.* 2011; 2:154 -163.
- Altindag O, Erel ON, Soran H, Celik and Selek S.** Total oxidative/anti-oxidative status and relation to bone mineral density in Osteoporosis. *Rheumatol Int.* 2008;28: 317-321.
- Amantea D, Russo R, Bagetta G, Corasaniti MT.** From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens. *Pharmacol Res.* 2005; 52: 119-132
- Anagnostis P, Paschou SA, Mintziori G, Ceausu I, Depypere H, Lambrinoudaki I.** Drug holidays from bisphosphonates and denosumab in postmenopausal osteoporosis: EMAS position statement. *Maturitas.* 2017; 101: 23-30.

- Anastasilakis AD, Polyzos SA, Makras P.** Therapy of endocrine disease: denosumab vs bisphosphonates for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Eur J Endocrinol.* 2018; 179: 31- 45.
- Anderson HC and Shapiro IM.** The Epiphyseal Growth Plate. In Bone and Development. F. Bronner, M.C. Farach-Carson *HI.* 2010; *Roach, eds.* Pp. 39-6.
- Aoki H.** Medical applications of hydroxyapatite. Ishiyaku Euro America. *Incorporated.* 1994.
- Arbonier, M.** Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d’Afrique de l’ouest. Editions Quæ RD 10 ; F- 78026 Versailles Cedex, France 2009 ; ISBN Quæ 978-2-7592- 0313-0 Muséum National d’histoire Naturelle (MNHN) ; Service des publications scientifiques, 57 Rue Cuvier, F- 75005 Paris, France ; ISBN MNHN. 978-2-85653- 626-1 :140-141.
- Arjmandi BH, Khalil DA, Lucas EA.** Dried plums improve indices of bone formation in postmenopausal women. *J Women’s Health Gend Based Med.* 2002; 11:61- 68.
- Arjmandi BH, Khalil DA, Smith BJ.** Soy protein has a greater effect on bone in postmenopausal women not on hormone replacement therapy, as evidenced by reducing bone resorption and urinary calcium excretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88:1048-1054.
- Asase A, Oteng-Yeboah AA, Odamtten GT, Simmonds MS.** Ethnobotanical study of some Ghanaian anti-malarial plants. *J Ethnopharmacol.* 2005; 99:273-9.
- Ashman RB, Rho JY, Turner CH.** Anatomical variation of orthotropic elastic moduli of the proximal human tibia. *J Biomech.*1989; 22: 895-900.
- Ateba SB, Njamen D, Medjakovic S, Hobiger S, Mbanya JC, Jungbauer A, Krenn L.** *Eriosema laurentii* de Wild (Leguminosae) methanol extract has estrogenic properties and prevents menopausal symptoms in ovariectomized Wistar rats. *J Ethnopharmacol.* 2013 ;150 : 298-307.
- Aurousseau B.** Les radicaux libres dans l’organisme des animaux d’élevage : conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Prod Anim.* 2002; 15: 67-82.
- Awounfack CF, Ateba SB, Zingue S, Riepouo MO, Njamen D.** Safety evaluation (acute and subacute studies) of the aqueous extract of the leaves of *Myrianthus arboreus* P. Beauv. (Cecropiaceae) in Wistar rats. *J Ethnopharmacol.* 2016; 194:169-178.

- Babiker FA, De Windt LJ, Van Eickels M, Grohe C, Meyer R, Doevendans PA.** Estrogenic hormone action in the heart: regulatory network and function. *Cardiovas Res.* 2002; 53: 709-719.
- Baccaro LF, Conde DM, Costa-Paiva L, Pinto-Neto AM:** The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: a viewpoint from Brazil. *Clin Interv Aging.* 2015; 10:583-91.
- Baker L, Meldrum KK, Wang M, Sankula R, Vanam R, Raiesdana A, Tsai B, Hile K, Brown JW, Meldrum DR.** The role of estrogen in cardiovascular disease. *J Surg Res.* 2003 ; 115 : 325- 344.
- Backlouti M, Ben HA, Kétata N, Maamri M, Yaich S, Karray R, Jdidi J, Kassis M, Feki H, Dammak J.** Les fractures compliquant l'ostéoporose : épidémiologie et tendance chronologique. *Revue d'épidémiologie et de santé publique.* 2022 ; Vol 70 : N° S3 PS225.
- Bayala B, Tamboura HH, Pellicer MTR, Zongo D, Traoré A, Ouédraogo L et Sawadogo L.** Effets œstrogéniques du macéré aqueux des feuilles de *Holarrhena floribunda* (G. Don) *Dur & Schinz* chez la rate ovariectomisée. *Biotec Agro Soc En.* 2006 ;10 :173-180.
- Beecher GR, Khachik F.** Qualitative relationship of dietary and plasma carotenoids in human beings. *Beyond Deficiency: New Views on the Function and Health Effects of Vitamins. Ann N Y Acad Sci.* 1992; 669: 320-321.
- Benzie IF, Strain JJ:** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power, the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996; 239: 70- 6.
- Bhagath KP, Muddanna SR, Gopalan KN, Mallikarjuna RC, Soubhagya RN, Huban T.** Anti-osteoporotic Activity of the Petroleum Ether Extract of *Cissus quadrangularis* Linn in: Ovariectomized Wistar Rats. *Chang Gung Med J.* 2010; 33: 252-257.
- Bischoff-Ferrari H, Stähelin HB et Walter P.** "Vitamin D effects on bone and muscle." *Int J Vit Nutr Res.* 2011; 81: 264-272.
- Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes P, Walter C, Willet DPH, John BW, Andreas ES, Hannes BS, John O, Douglas PK et Jana H.** "Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials." *BMJ.* 2009; 339: 36-92.

- Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willet WC, Dietrich T, Hughes BD.** "Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes." *A J Clin Nutr.* 2006; 84: 18-28.
- Blain H, Chavassieux P, Portero-Muzy N, Bonnel F, Canovas F, Chammass M, Maury P, and Delmas PD.** Cortical and trabecular bone distribution in the femoral neck in osteoporosis and osteoarthritis. *Bone.* 2008, 43: 862- 868.
- Bleu GM, Kouakou K, Touré A et Traoré F.** Effects of *Passiflora foetida L.* (Passifloraceae) on genital tract, serum estradiol, pituitary gonadotropin and prolactin level in female adult and immature ovariectomized rats. *Pakistan J Sci Industrial Res.* 2012; 55 :138-144.
- Bonewald LF.** Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1116: 281-290.
- Bonjour JP.** "Dietary protein: an essential nutrient for bone health." *J Am Coll Nutr.* 2005; 24: 526S-536S.
- Bonnet N, Laroche N, Beaupied H, Vico L, Dolleans E, Benhamou CL, Courteix D.** Doping dose of salbutamol and exercise training: impact on the skeleton of ovariectomized rats. *J Appl Physiol Bethesda Md.* 2007; 103: 524-533.
- Boskey AL, Rinnac CM, Bansal M, Federman M, Lian J, Boyan BD.** Effect of short-term hypomagnesemia on the chemical and mechanical properties of rat bone. *J Orthop Res. Off Publ Orthop Res Soc.* 1992; 10: 774 -783.
- Braidman IP, Hainey L, Hainey L, Batra G, Selby PL, Saunders PTK, Hoyland JA.** "Localization of estrogen receptor beta protein expression in adult human bone." *J Bone Miner Res.* 2009; 16: 214-220.
- Brinton EA.** Oral estrogen replacement therapy in postmenopausal women selectively raises levels and production rates of lipoprotein A-I and lowers hepatic lipase activity without lowering the fractional catabolic rate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996; 16: 431-440.
- Briot K, Cortet B, Thomas T, Audran M, Blain H, Breuil V.** Update of French guidelines for the pharmacological treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Spine.* 2012 ; 79 : 304-13.
- Bruneton J.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Paris : *Tec & Doc. ISBN.* 2009; 978-2-7430-1188-8.

- Bu SY, Lucas EA, Franklin M.** Comparison of dried plum supplementation and intermittent PTH in restoring bone in osteopenic orchidectomized rats. *Osteoporos Int.* 2007 ;18 : 931- 942.
- BUCREP.** Bureau Central des Recensements et des Etudes des Populations. Rapport de présentation des résultats définitif de Recensement Générale des Populations et Habitat du Cameroun, 2011.
- Buochuama A and Akhabue EF.** Ethnomedicinal and phytochemical evaluation of tree species among some local folks of northern Nigeria. *World Sci News.* 2018; 99:60-70.
- Burkill HM.** The Useful Plants of West Tropical Africa. Kew: *London: Royal Botanic Gardens Kew*, 1995.
- Canalis E, Economides AN, Gaggero E.** Bone morphogenetic proteins, their antagonists and the skeleton. *Endocrinol Rev.* 2003 ; 24 : 218-235.
- Cannet C. Artefacts :** les difficultés de la technique histologique de la circulation à la coupe. *In Rev Fr Histotechnol.* 2006; 19:71-84.
- Carlo C, Gloria B EC, Arianna R, Enrica F, Maria CC, Stefania F, Melchiorre G, and Leo M.** Oxidative Stress and Bone Resorption Interplay as a Possible Trigger for Postmenopausal Osteoporosis. *Bio Med Research Inter.* 2014; 6:1-8.
- Cauley JA.** Estrogen and bone health in men and women. *Steroids.* 2015; 99: 11-15.
- Cervellati C, Bonaccorsi G, Cremonini E.** Bone mass density selectively correlates with serum markers of oxidative damage in post-menopausal women. *Clin Chem Lab Med.* 2013; 51:333-338.
- Cetinus E, Kilinc M, Uzel M, Inanc F, Kurutas EB, Bilgic E.** Does long-term ischemia affect the oxidant status during fracture healing. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2005; 125: 376-380.
- Chambers TJ.** The birth of the osteoclast. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1192 :19-26.
- Chang KP, Center JR, Nguyen TV, Eisman JA.** Incidence of hip and other osteoporotic fractures in elderly men and women: Dubbo Osteoporosis Epidemiology Study. *J Bone Miner Res.* 2004 ; 19 :532-6.
- Chapurlat R. and Chappard D.** L'ostéoporose - Mieux la comprendre pour mieux la traiter. *Rueil-Malmaison, Wolters Kluwer Health.* 2009.
- Chapurlat R.** Epidémiologie de l'ostéoporose : *J de la Société de Biol.* 2008 ; 202 : 251-255.

- Chapurlat RD, Arlot M, Burt-Pichat B, Chavassieux P, Roux JP, Portero-Muzy N and Delmas PD.** Microcrack frequency and bone remodeling in postmenopausal osteoporotic women on long-term bisphosphonates: a bone biopsy study. *J Bone Miner Res.* 2007; 22: 1502-9.
- Chen CH, Ho ML, Chang JK, Hung SH, Wang GJ.** Green tea catechin enhances osteogenesis in a bone marrow mesenchymal stem cell line. *Osteoporos Int.* 2005; 16:2039-2045.
- Chen H, Emura S, Yao XF, Shoumura S.** Morphological study of the parathyroid gland and thyroid cell in senescence-accelerated mouse (SAMP6), a murine model for senile osteoporosis. *Tissue Cell.* 2004; 36: 409- 415.
- Chen JR, Lazarenko OP, Singhal R, Liu X, Hogue WR.** "Dietary-induced serum phenolic acids promote bone growth via p38 MAPK/beta-catenin canonical Wnt signaling. *J Bone Miner Res.* 2010; 25: 2399-2411.
- Cheng SY, Levy AR, Lefavre KA, Guy P, Kuramoto L and Sobolev B.** Geographix trends in incidence of hip fractures: a comprehensive review. *Osteoporosis Int.* 2011; 22: 2575- 2586.
- Cheong SH and. Chang K J.** The preventive effect of fermented milk supplement containing tomato (lycopersicon esculentum) and taurine on bone loss in ovariectomized rats. *Adv Exp Med Biol.* 2009; 643: 333-340.
- Chlebowski RT, Anderson GL.** Changing concepts: menopausal hormone therapy and breast cancer. *J Nation Canc Instit (Abstract).* 2012.
- Clunie G, Keen R.** Osteoporosis. Issy-les-Moulineaux : *Elsevier Masson.* 2009 ; p198.
- Cohen MM.** The new bone biology: pathologic, molecular and clinical correlates. *Am J Med Genet A.* 2006; 140: 2646-2706.
- Connelly PW, Hegele RA.** Hepatic lipase deficiency. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1998; 35: 547-572.
- Cooper C, Cole ZA, Holroyd CR, Earl SC, Harvey NC, Dennison EM, Melton LJ, Cummings SR and Kanis JA.** Secular trends in the incidence of hip and other osteoporotic fractures. *Osteoporosis Int.* 2011 ; 22 : 1277-1288.
- Coulibaly FA, Moyabi A GA, Kande B, KONE MW.** Effet œstrogénique de l'extrait aqueux des feuilles de *Cissus aralioides* chez la rate Wistar, *Rattus norvegicus*. *J Anim Plant Sci.* 2022; 53: 9657-9667.

- Cowin SC, Han Y, Schaffler MB, and Weinbaun S.** "Mechanotransduction and strain amplification in osteocyte cell processes." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 ;101 : 16689-16694.
- Curran D, Maravic M, Kiefer P, Tochon V, Fardellone P.** Epidémiologie des fractures liées à l'ostéoporose en France : revue de la littérature. *Rev Rhum.* 2010; 3643: 1-7.
- Dagnault A, Deshaies Y, Richard D.** Involvement of type I corticosteroid receptor in the effects of ovariectomy on energy balance. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* 1996 ; 270 : 199-206.
- Dargent MP.** Epidémiologie et facteurs de risque d'ostéoporose. *Rev Med Int.* 2004; 25: 8517-8525.
- Das AS, Das D, Mukherjee M, Mukherjee S, Mitra C.** Phytoestrogenic effects of black tea extract (*Camellia sinensis*) in an oophorectomized rat (*Rattus norvegicus*) model of osteoporosis. *Life Sci.* 2005; 77:3049- 3057.
- De Vernejoul MC.** "Dynamics of bone remodeling: biochemical and pathophysiological basis." *Eur J Clin Chem Clin Biochem.*1996; 34: 729-734.
- Dekkers JC, Lorenz JP, Van Doornen et Kemper HCG.** The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sport Med.* 1996; 21: 213-238.
- Devareddy L, Khalil DA, Smith BJ, Lucas EA, Soung DY, Marlow DD, Arjmandi BH.** Soy moderately improves microstructural properties without affecting bone mass in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *Bone.* 2006; 38 :686- 693.
- Di Croce L, Bruscalupi G, Trentalance A.** Independent behavior of rat liver LDL receptor and HMGCoA reductase under estrogen treatment. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 224: 345-350.
- Diallo A, Eklou GK, Agbonon A, Aklidikou K, Creppy EE, Gbeassor M.** Acute and subchronic (28-days) oral toxicity studies of hydroalcoholic extract of *Lannea kerstingii* Engl. And Krause K (*Anacardiceae*) stem bark. *J Pharmacol Toxicol Royal Soc Chem.* 2009; p174.
- Djoueche CM, Azebaze AB, Dongmo AB.** Investigation of plants used for the ethnoveterinary control of gastrointestinal parasites in Bénoué region, Cameroon. *Tropicultura.* 2011; 29:205-11.

- Doblare M, Garcia JM, Gomez MJ.** Modelling bone tissue fracture and healing: A review. *Eng Frac Mecha.* 2004; 71 :1809 - 1840.
- Dobnig H, Sipos A, Jiang Y, Fahrleitner-Pammer A, Ste-Marie LG, Gallagher JC, Pavo I, Wang J and Eriksen EF.** Early changes in biochemical markers of bone formation correlate with improvements in bone structure during teriparatide therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 ; 90 : 3970-7.
- Ducros V et Favier A.** Metabolisme du sélénium. *Encyclopédie -Chirurgicale.* 2004 ; 10 : 359-6.
- Ducy P, Schinke T et Karsenty G.** "The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science.* 2000 ; 289 : 1501-1504.
- Ehnert S, Falldorf K, Fentz AK, Ziegler P, Schröter S, Freude T, Ochs BG, Stacke C, Ronniger, M, Sachtleben J, Nussler AK.** Primary human osteoblasts with reduced alkaline phosphatase and matrix mineralization baseline capacity are responsive to extremely low frequency pulsed electromagnetic field exposure clinical implication possible. *Bone.* 2015.
- Ellenberg H, Galat-Luong A, von Maydell HJ, Mühlenberg M, Panzer KF, Schmidt-Lorenz R. Pirrang:** Ecological investigation in forest island in the Gambia. Hamburg: Stiftung Walderhaltung in Afrika und Bunde sanstalt für Forst-und Holzwirtschaft. *Traute Warnke Verlag Reinbeck.* 1998.
- Ernst M, Heath JK, Rodan GA.** Estradiol effects on proliferation, messenger ribonucleic acid for collagen and insulin-like growth factor-I, and parathyroid hormone stimulated adenylate cyclase activity in osteoblastic cells from calvariae and long bones. *Endocrinol.* 1989;125: 825-33.
- Espeland MA, Hogan PE, Fineberg SE, Howard G, Schrott H, Waclawiw MA, Bush TL.** Effect of postmenopausal hormone therapy on glucose and insulin concentrations. PEPI. Investigators. Postmenopausal estrogen/progestin interventions. *Diabetes Care.*1998; 21: 1589-1595.
- Etuk EU, Ugwah OP, Ajagbonna and Onyeyili PA.** Ethnobotanical survey and preliminary evaluation of medicinal plants with antidiarrhoea properties in sokoto state, Nigeria. *J Med Plants Res.* 2009; 3: 763-766.
- Fairbrother F and Warn J.** Work place dimensions, stress and job satisfaction. *J M Psychol.* 2003; 18: 8-21.

- Fallon MT.** Rats and Mice, in: K. Laber-Laird, M.M. Swindle, P. Fleck-nell (Eds), Hand book OF Rodent and Rabbit Medicinæ. *Elsevier Science Ltd., Oxford.* 1996; pp1-38.
- Faraci FM and Didon SP.** Superoxide dismutase isoforms in the vessel Wall. *Arteriosclerosis, Throm Vasc Biol.* 2004; 24: 1367-1373.
- Feldenzer KL, Sarno J.** Hypercalcemia of Malignancy. *J Adv Pract Oncol.* 2018; 9: 496-504.
- Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR.** Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol.* 2000; 14:1649-1660.
- Filardo EJ, Quinn JA, Frankelton AR JR, Bland KI.** Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR 30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol.* 2002; 16:70-84.
- Filippo M, Nicola M, Giorgia C, Jörg E, Markus T and Marcel B.** Effect of drugs on bone mineral density in postmenopausal osteoporosis: a Bayesian network meta-analysis. *J Orthopaedic Surg and Res.* 2021;16: p533
- Fluiter K, van der Westhuijzen DR, van Berkel TJ.** In vivo regulation of scavenger receptor B and the selective uptake of high-density lipoprotein cholesteryl esters in rat liver parenchymal and Kupffer cells. *J Biol Chem.* 1998; 273: 8434- 8438.
- Folin O and Wu H.** Cited from the *Extra Pharmacopoeia* (1955). Martindale, 23<sup>rd</sup> Edn. London: *The Pharmaceutical Press.* 1920; p1175.
- Fox KM, Cummings SR, Powell-Threets K, Stone K.** Family history and risk of osteoporotic fracture. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Osteoporos Int.* 1998; 8: 557-562.
- Franklin M, Bu SY, Lerner MR.** Dried plum prevents bone loss in a male osteoporosis model via IGF-I and the RANK pathway. *Bone.* 2007; 39:1331-1342.
- Freeman EW, Sammel MD, Sanders RJ.** Risk of long-term hot flashes after natural menopause: evidence from the penn ovarian aging study cohort. *Menopause.* 2014; 21: 924-32.
- Gale EA, Gillespie KM.** Diabetes and gender. *Diabetologia.* 2001; 44: 3 - 15.

- Garnero P, Grimaux M, Patrick S, Pierre DDD.** Characterization of immunoreactive forms of human osteocalcin generated in vivo and in vitro. *J Bone Min Res.* 1994; 9: 255-264.
- Gasser JA, Ingold P, Venturiere A, Shen V, Green JR.** Long-term protective effects of zoledronic acid on cancellous and cortical bone in the ovariectomized rat. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2008; 23: 544 -551.
- Geary N, Asarian L, Korach KS, Pfaff DW, Ogawa S.** Deficits in E<sub>2</sub>-dependent control of feeding, weight gain, and cholecystokinin satiation in ER-alpha null mice. *Endocrinol.* 2001;142: 4751- 4757.
- George O and Jones OA.** Anti-inflammatory and Analgesic Effects of an Aqueous Extract of *Lannea acida* Stem Bark British. *J Pharma Res.* 2017;16: 1-8.
- Gill LS.** Ethno-Medicine Uses of Plant in Nigeria, Bieger N. Bee- keep in gand Community Forest Management, 276, *University of Benin Press, Nigeria* 1992.
- Godsland IF.** Effects of postmenopausal hormone replacement therapy on lipid, lipoprotein, and apolipoprotein (a) concentrations: analysis of studies published from 1974-2000. *Fertil Steril.* 2001; 75: 898-915.
- Grigoriadis S, Kennedy SH.** Role of estrogen in the treatment of depression. *Am J Ther.* 2002; 9: 503-50
- Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC.** Mechanism of disease: production and actions of estrogens. *N Engl J Med.* 2002 ; 346 : 340-352.
- Guyène T, Heather L, Csott, Donna LR, John JR, Brett DT, Laure AT, Roland G, Brenda JW.** Recommandation sur le dépistage pour la prévention primaire des fractures de fragilisation. *CMAJ.* 2023 May 8; 195: E639- 49. doi : 10.1503/cmaj.221219-f.
- Gytte J.** profils des lipides et des lipoprotéines chez les femmes ménopausées. Effets d'un traitement hormonal substitutif associé. Thèse de doctorat. Université de Copenhague 1992.
- Habold C, Momken I, Ouadi A, Bekaert V, Brasse D.** Effect of prior treatment with resveratrol on density and structure of rat long bones under tail-suspension. *J Bone Miner Metab.* 2011; 29: 15-22.
- Hamosh M, Hamosh P.** The effect of estrogen on the lipoprotein lipase activity of rat adipose tissue. *J Clin Invest.* 1975; 55: 1132-1135.

- Han K, Ko Y, Park YG and Park JB.** Associations between the number of natural teeth in postmenopausal women and hormone replacement therapy. *Maturitas*.2016 ; 94 : 125-130.
- Handgraaf S.** Prévention de l'obésité et du diabète de type 2 par les œstrogènes : rôle des fonctions transactivatrices du récepteur des œstrogènes  $\alpha$ . Thèse de doctorat, physiopathologie. *Université de Toulouse* 2013.
- Hart LL, Davie JR.** the estrogen receptor: more than the average transcription factor. *Biochem Cell Biol.* 2002; 80: 335-341.
- Heaney RP, Robert RR, Patrice Watson, Joan ML.** Phosphate and carbonate salts of calcium support bone building in osteoporosis. *The American J C Nut.* 2010; 1: 101-105.
- Heino TJ, Hentunen TA, Väänänen HK.** Osteocytes inhibit osteoclastic bone resorption through transforming growth factor-beta: enhancement by estrogen. *J Cell Biochem.* 2002; 85 :185-97.
- Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Ström A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA.** Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev.* 2007; 87: 905 - 931.
- Henriksson P, Stamberger M, Eriksson M, Rudling M, Diczfalusy U, Berglund L, Angelin B.** Oestrogen-induced changes in lipoprotein metabolism: role in prevention of atherosclerosis in the cholesterol-fed rabbit. *Eur J Clin Invest.* 1989; 19: 395- 403.
- Hernlund E, Svedbom A, Ivergard M, Compston J, Cooper C, Stenmark J.** Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos.* 2013; 8:136.
- Hewitt SC, Deroo BJ, Hansen K, Collins J, Grissom S, Afshari CA, Korach KS.** Estrogen receptor-dependent genomic responses in the uterus mirror the biphasic physiological response to estrogen. *Mol Endocrinol.* 2003; 17: 2070 - 2083.
- Hewitt SC, Deroo BJ, Hansen K, Collins J, Grissom S, Afshari CA, Korach KS.** Estrogen receptor-dependent genomic responses in the uterus mirror the biphasic physiological response to estrogen. *Mol Endocrinol.* 2003; 17: 2070 - 2083.
- Hewitt SC, Korach KS.** Oestrogen receptor knockout mice: roles for estrogen receptor alpha and beta in reproductive tissues. *Reproduct.* 2003; 125: 143-149.

- Hunziker EB and Schenk RK.** Physiological Mechanisms adopted by Chondrocytes in regulating Longitudinal bone growth in rats. *J of Physiol.* 1989; 414 :55-71.
- Imai Y, Kondoh S, Kouzmenko A and Kato S.** "Minireview: osteoprotective action of estrogens is mediated by osteoclastic estrogen receptor-alpha." *Mol Endocrinol.* 2010; 24: 877-885.
- Imbeault P, Alméras N, Richard D, Després JP, Tremblay A, Mauriège P.** Effect of a moderate weight loss on adipose tissue lipoprotein lipase activity and expression: existence of sexual variation and regional differences. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1999; 23: 957-965.
- Imoro AZ, Khan AT, Eledi JD.** Exploitation and use of medicinal plants, Northern region, Ghana. *J Med Plant Res.* 2013; 7 :1984 -1993.
- International Osteoporosis Foundation (IOF).** Capture the Fracture Report. Disponible sur : <http://share.iofbonehealth.org/WOD/2012/report/FR/WOD12-report-FR.pdf>. Consulté le 19.10.2014 : s.n., 2012.
- International Osteoporosis Foundation.**The Middle East & Africa Regional Audit: Epidemiology, costs & burden of osteoporosis. 2011.
- Jean MV, Edith B, Brigitte F, Vincent L.** L'effet des œstrogènes sur l'os : une histoire de famille. *Med Sc.* 1999; 15: 538 - 44.
- Jee WS, Yao W.** Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculo-Skeletal Neuronal Interact.* 2001; 1: 193-207.
- Ji MX, Yu Q.** Primary osteoporosis in postmenopausal women. *Chronic Dis. Transl Med.* 2015;1: 9 -13.
- Jilka RL.** Cytokines, bone remodeling, and estrogen deficiency: a 1998 update. *Bone.* 1998; 23: 75-81.
- Johnson RJ, Sautin YY, Oliver WJ, Roncal C, Mu W, Gabriela Sanchez-Lozada L, Rodriguez-Iturbe B, Nakagawa T, Benner SA.** Lessons from comparative physiology: could uric acid reprente a physiologic alarm signal gone awry in western society? *J Comp Physiol B.* 2009; 5: 67-76.
- Kalu DN:** The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone miner* 1991; 15: 171-192.

- Kanis JA, Johansson H, Johnell O, Oden A, Laet CD, Eisman JA, Pols H, Tenenhouse A.** Alcohol intake as a risk factor for fracture. *Osteoporos Int.* 2005; 16 :737- 42.
- Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Oden A, Melton LJ, Khaltav N.** A reference standard for the description of osteoporosis. *Bone* 2008; 42:467-75.
- Kanis JA, Melton LJ, 3rd, Christiansen C, Johnston CC, Khaltav N.** The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1994; 9:1137-41.
- Kanis JA.** Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet.* 2002; 359 :1929-36.
- Katalinić V, Milos M, Modu D, Musi I et Boban M.** Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+) catechin. *Food Chem.* 2004; 86: 593- 600.
- Katerere DR et Luseba.** Ethnoveterinary botanical medicine: herbal medicines for animal health. *Boca Raton Fla.* 2010; 978: 4200 - 4560.
- Kennedy GL, Ferenz RL, Burgess BA.** Estimation of acute oral toxicity in rats by determination of approximative lethal dose rather the DL<sub>50</sub>. *J Appl Toxicol.* 1986; 6 :145-148.
- Keshri G, Kumar S, Kulshreshtha DK, Rajendran SM, Singh MM.** Post-coital interceptive activity of *Wrightia tinctoria* in Sprague Dawley rats: a preliminary study. *Contraception.* 2008; 78: 266 - 270.
- Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster DW, Ebeling PR, Felsenberg D, Gagel RF, Gilsanz V, Guise T, Koka S, McCauley LK, McGowan J, McKee MD, Mohla S, Pendrys DG, Raisz LG, Ruggiero SL, Shafer DM, Shum L, Silverman SL, Poznak CHV, Watts N, Woo SB, Shane E.** Bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res.* 2007; 22: 1479-1491.
- Khosla S, Westendorf JJ and Mödder UI.** "Concise review: Insights from normal bone remodeling and stem cell-based therapies for bone repair." *Stem Cell.* 2010; 28: 2124-2128.
- Kim HJ, Kalkhoff RK.** Sex steroid influence on triglyceride metabolism. *J Clin Invest.* 1975; 56: 888-896.
- Kim KH, Young BD, Bender JR.** Endothelial estrogen receptor isoforms and cardiovascular disease. *Mol Cell Endocrinol.* 2014; 389: 65-70.

- Kindmark A, Melhus H, Ljunghall S and Ljunggren O.** Inhibitory effects of 9-cis and all trans retinoic acid on 1, 25 (OH) vitamin D -induced bone resorption. *Calcif Tissue Int.* 1995; 57: 242-244.
- Kini U, Nandeesh BN.** Physiology of bone formation, remodeling, and metabolism. In: Fogelman I, Gnanasegaran G, Van der Wall H, editors. Radionuclide and Hybrid Bone Imaging. Berlin. *Springer.* 2012; 29-57.
- Knothe Tate ML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW.** The osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36:1-8.
- Kommenou A, Karayannopoulou M, Polizopoulou ZS, Constantinidis TC et Dessiris A.** Correlation of serum alkaline phosphatase activity with the healing process of long bone fractures in dogs. *Vet Clin Pathol.* 2005; 34: 35-38.
- Kone WM, Atindehou KK, Terreaux C, Hostettmann K, Traore D, and Dosso M** Traditional medicine in North Cote-d'Ivoire: Screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol.* 2004; 93: 43-49.
- Koné WM, Atindehou KK, Terreaux C, Hostettmann K, Traoré D, Dosso M.** Traditional medicine in north Côte d'Ivoire: Screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol.* 2004; 93:43-9.
- Korner W, Hanf V, Schuller W, Kempter C, Metzger J, Hagenmaier H.** Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents. *Sci Total Environ.* 1999 ; 225 :33 - 48.
- Kouakou K and Benie T.** Effet Antifertilisant de *Daldinia concentrica* et *Psathyrella efflorescens*. Recherche des effets oestrogéniques. *Ethnopharmacol* 2003 ; 31 : 45-57.
- Kovanen PT, Brown MS, Goldstein JL.** Increased binding of low-density lipoprotein to liver membranes from rats treated with 17alpha-ethinyl estradiol. *J Biol Chem.* 1979; 254: 11367-11373.
- Krust A, Green S, Kumar V, Walter P and Chambon P.** Structural and Functional domains of the Estrogen Receptor. *EMBO J.* 1986; 5: p891.
- Kuhn LT, Grynblas MD, Rey CC, Wu Y, Ackerman JL, Glimcher MJ.** A comparison of the physical and chemical differences between cancellous and cortical bovine bone mineral at two ages. *Calcif Tissue Int.* 2008; 83: 146 -154.
- Kular J, Tickner J, Chim SM and Xu J.** An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin Biochem.* 2012; 45: 863- 873.

- Kulkarni TR, Mateenuddin M, Sahasrabudhe RA, Pandit VA.** Estrogenic activity of alcoholic extract of lemon seeds. *IJRPS*. 2012; 3:1231-1235.
- Kuyumcu ME, Yesil Y, Ozturk ZA, Cinar E, Kızılarlanoglu C, Halil M.** The association between homocysteine (hcy) and serum natural antioxidants in elderly bone mineral densitometry (BMD). *Arch Gerontol Geriatr*. 2012; 55:739-43.
- Kypreos KE, Zafirovic S, Petropoulou PI, Bjelogrljic P, Resanovic I, Traish A, Isenovic ER.** Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase and High-Density Lipoprotein Quality by Estradiol in Cardiovascular Pathology. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2015; 19:256-268.
- Lane NE, Yao W, Kinney JH, Modin G, Balooch M, Wronski TJ.** Both hPTH (1-34) and bFGF increase trabecular bone mass in osteopenic rats but they have different effects on trabecular bone architecture. *J Bone Miner Res*. 2003 ;18 : 2105-2115.
- Lavenus S.** Etudes des interactions entre cellules souches et surfaces implantaires nanostructurées, Thèse de Doctorat en Biologie cellulaire, U.F.R de Medecine. Nantes: *Université de Nantes*. 2010; pp1-192.
- Lee JI, Kim HW, Rhee WI, Park JH, Lim SH, Im S, Ko YJ.** The beneficial effect of intravenous zoledronic acid therapy following an acute stroke in rats. *Bone*. 2006 ; 39 : 377-382.
- Lemieux C.** Effets et mécanismes d'action d'un modulateur sélectif des récepteurs des œstrogènes sur le métabolisme des lipides. Thèse de Doctorat/PhD. Université Laval. 2005 ; pp23-50.
- Lespessailles E, Cotte FE, Roux C, Fardellone P, Mercier F, Gaudin AF.** Prevalence and features of osteoporosis in the French general population: The Instant study. *Joint B Spine*. 2009 ;76 :394 - 400.
- Leung WT, Busson F, Jardin C.** Food Composition Tables for use in Africa. Rome: *F Agricul Org United Nations*.1968.
- Levasseur R, Sabatier JP, Marcelli C.** Physiopathology of osteoporosis. *Rev Med Interne*. 2004; 25: 531-537.
- Levin ER.** Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol*. 2005; 19: 1951-1959.
- Levin VA, Jiang X, Kagan R.** Estrogen therapy for osteoporosis in the modern era. *Osteoporos Int*. 2018; 29:1049-55.

- Li Y, Danmark S, Edlmund U, Finne-Wistrand A, He X, Norgard M, Blomén E, Hultenby K, Andersson G Urban L.** Resveratrol-conjugated poly-epsilon-caprolactone facilitates *in vitro* mineralization and *in vivo* bone regeneration. *Acta Bio.* 2011; 7: 751-8.
- Liang Bo, George B, Shu L and Yan-Chuan S.** Osteoporosis pathogenesis and treatment: existing and emerging avenues. *Cell Mol Biol Letters.* 2022; 27:72p.
- Lilaram et Nazeer AR.** Effect of ethanolic seed extract of *Caesalpinia bonducella* on female reproductive system of albino rat: a focus on antifertility efficacy. *Asian P J Tropical D.* 2012; 957-96.
- Lima WP, Carnevali LC, Eder R, Costa Rosa LF, Bacchi EM, Seelaender MC.** Lipid metabolism in trained rats: effect of guarana (*Paullinia cupana* Mart.) supplementation. *Clin Nutr.* 2005; 24: 1019-1028.
- Ling X, Zhang Y, Lu Y, Huang H.** Superoxide dismutase, catalase and acetylcholinesterase: biomarkers for the joint effects of cadmium, zinc and methyl parathion contamination in water. *Environ Technol.* 2011 ; 32 :1463-1470.
- Liu ZG, Zhang R, Li C, Ma X, Liu L, Wang JP, Mei QB.** The osteoprotective effect of Radix Dipsaci extract in ovariectomized rats. *J Ethnopharmacol.* 2009;123: 74-81.
- Loeser RF, Carlson CS, Del Carlo M, Cole A.** Detection of nitrotyrosine in aging and osteoarthritic cartilage: correlation of oxidative damage with the presence of interleukine-1- beta and with chondrocyte resistance to insulin-like growth factor. *Arthritis Rheum.* 2002; 46: 2349-57.
- Lucinda LMF, Vieira BJ, OliveiraTT, Sà RCS, Peters VM, Reis JEP, Guerra MO.** Evidences of osteoporosis improvement in Wistar rats treated with Ginkgo biloba extract: A histomorphometric study of mandible and femur. *Fitoter.* 2010;81: 982-987.
- Luhmann T, Germershaus O, Groll J, Meinel L.** Bone targeting for the treatment of osteoporosis. *J Control Release.* 2012; 161: 198-213.
- Mackinnon ES, Rao AV, Rao LG.** Dietary restriction of lycopene for a period of one month resulted in significantly increased biomarkers of oxidative stress and bone resorption in postmenopausal women. *J Nutr Health Aging.* 2011; 15: 133-138.
- Maggio D, Barabani M, Pierandrei M, Polidori MC, Catani M, Mecocci P, Senin U, Pacifici R, Cherubini A.** Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic

- women. Results of a cross-sectional study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88 :1523 - 1527.
- Mairet S, Maïsetti O, Rolland E, Portero P.** [Neuromuscular and architectural alterations of the vastus lateralis muscle in elderly patients with unilateral knee osteoarthritis]. *Médecine Physique Revue scientifique Société Française. Médecine Phys.* 2008; 51 :16-23.
- Manson JE, Allison MA, Rossouw JE, Carr JJ, Langer RD, Hsia J, Kuller LH, Cochrane BB, Hunt JR, Ludlam SE, Pettinger MB, Gass M, Margolis KL, Nathan L, Ockene JK, Prentice RL, Robbins J, Stefanick ML.** Estrogen therapy and coronary-artery calcification. *N Engl J Med.* 2007; 356: 2591-2602.
- Manzo LM, Moussa I, Ikhiri K.** Phytochemical screening of selected medicinal plants used against diarrhea in Niger, West Africa. *Int J Herbal Med.* 2017; 5 :32- 38.
- Margaritis I, Palazzeti S, Rousseau AS, Richard MJ, Favier A.** Antioxidant supplementation and tapering exercise improve exercise-induced antioxidant response. *J Am Coll Nutr.* 2003; 22: 147-156.
- Marieb E N et Hoehn K.** *Anatomie et physiologie humaines.* Adaptation de la 8<sup>e</sup> édition américaine, 2010 ; p 206
- Marongiu G, Dolci A, Verona M, Capone A.** The biology and treatment of acute long-bones diaphyseal fractures: Overview of the current options for bone healing enhancement. *B Reports.* 2020; 12 (100249).
- Matsumine H, Herbst MA, Ou SH, Wilson JD, Mc Phaul MJ.** Aromatase mRNA in the extragonadal tissues of chickens with the henny-feathering trait is derived from a distinctive promoter structure that contains a segment of a retroviral long terminal. *J Biol Chem.* 1991; 266: 19900-19907.
- Matsuo K and Otaki N.** Bone cell interactions through Eph/ephrin: bone modeling, remodeling and associated diseases. *Cell Ad Migr.* 2012; 6: 148-156.
- Mélanie S, Laurent L, Marie-Jeanne D, Patrice L, Sylvie M, Elisabeth MN, Laurent R, Yohann W, Véronique C.** Pomegranate and its derivatives can improve bone health through decreased inflammation and oxidative stress in an animal model of postmenopausal osteoporosis. *E J Nut.* 2014; 53:1155-1164
- Mendelsohn ME, Karas RH.** Rapid progress for non-nuclear estrogen receptor signaling. *J Clin Invest.* 2010; 120 :2277-9.

- Mendelsohn ME.** Mechanisms of estrogen action in the cardiovascular system. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000; 74: 337-343.
- Meyrueis P, Cazenave A, Zimmermann R.** Biomechanics of bones and treatment of fractures. *EMC-Rhum Orth.* 2004; p1.
- Mezzeti A, Pierdomenico SD, Costantini F.** Copper/zinc ratio and systemic oxidant load: effect of aging and aging-related degenerative diseases. *Free Rad Biol Med.* 1998; 25: 676-681.
- Migliorini F, Maffulli N, Giorgia C, Eschweiler J, Tingart M and Betsch M.** Effect of drugs on bone mineral density in postmenopausal osteoporosis: a Bayesian network meta-analysis. *J of Orth Surg and Res.* 2021; 16:533p.
- Miller PD, Ward P, Pfister T, Leigh C, Body JJ.** Renal tolerability of intermittent intravenous ibandronate treatment for patients with postmenopausal osteoporosis a review. *Clin Exp Rheumatol.* 2001; 26: 1125 - 1133.
- Modder UI and Khosla S.** Skeletal stem/osteoprogenitor cells: current concepts, alternate hypotheses, and relationship to the bone remodeling compartment. *J Cell Biochem.* 2008; 103: 393- 400.
- Molander M, Staerk D, Nielsen HM, Brandner JM, Diallo D, Chifundera KZ.** Investigation of skin permeation, ex vivo inhibition of venom-induced tissue destruction, and wound healing of African plants used against snakebites. *J Ethnopharmacol.* 2015; 165:1-8.
- Morales DE, McGowan KA, Grant DS, Maheshwari S, Bhartiya D, Cid MC, Kleinman HK, Schnaper HW.** Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model. *Circulation.* 1995; 91: 755-763.
- Mowa CN, Iwanaga T.** Expression of estrogen receptor-alpha and beta mRNAs in the male reproductive system of the rat as revealed by in situ hybridization. *J Mol Endocrinol.* 2001; 26: 165-74.
- Muhaisen, Hasan MH.** Chemical constituents from the bark of *Lannea acida* Rich (Anacardiaceae). *Der Pharma Chemic.* 2013; 5 :88-96.
- Mullender MG et Huiskes R.** Osteocytes and bones lining cells: which are the best candidates for mechano-sensors in cancellous bone. *Bone.* 1997; 20: 527-32.
- Muthusami S, Ramachandran I, Muthusamy B, Vasudevan G, Prabhu V, Subraman V, Jagadeesan A, Narasimhan S.** Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats. *Clin Chim Acta.* 2005; 360 :81-86.

- Mvondo MA, Njamen D, Tanee Fomum S, Wandji J, Günter V.** A postmenopause-like model of ovariectomized Wistar rats to identify active principles of *Erythrina lysistemon* (Fabaceae). *Fitoter.* 2011; 82: 939-949.
- Naaz A, Zakroczymski M, Heine P, Taylor J, Saunders P, Lubahn D, Cooke PS.** Effect of ovariectomy on adipose tissue of mice in the absence of estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ): a potential role for estrogen receptor beta (ER $\beta$ ). *Horm Metab Res.* 2002; 34: 758-763.
- Nadembega P, Boussim JI, Nikiema JB, Poli F, Antognoni F.** Medicinal plants in Baskoure, Kourittenga province, Burkina Faso: An ethnobotanical study. *J Ethnopharmacol.* 2011 ; 133 :378-95.
- Ngandeu SM et Amvene SN.** Densité minérale osseuse de la femme camerounaise à Yaoundé : une étude échographique. *Mali Medical.* 2008 ; tome xxiii n°1 pp 21-26.
- Ngueguim TF, Sakoung TSH, Donfack JH, Gounoue KR, Dzeufiet DP D, Kamtchouin P and Dimo T :** Aqueous extract of *Peperomia pellucida* (L.) HBK accelerates fracture healing in Wistar rats. *BMC Complement Altern Med.* 2017; 17:188,1686 -3.
- Nicotera P, Orrenius S.** Role of thiols in protection against biological reactive intermediates. *Adv Exp Med Biol.* 1986; 197: 41-51.
- Nieves JW, Barrett-Connor E, Siris ES, Zion M, Barlas S, Chen YT.** "Calcium and vitamin D intake influence bone mass, but not short-term fracture risk, in Caucasian postmenopausal women from the National Osteoporosis Risk Assessment (NORA) study." *Osteoporos Int.* 2008;19: 673-679.
- Nilsson S, Mäkela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Anderson G, Enmark E, Pettersson K, Warne M, Gustafsson JA.** Mechanism of estrogen action. *Physiol Rev.* 2001;81: 1535-1565.
- Njamen D, Djiogue S, Zingue S, Mvondo MA, Nkeh-Chungag BN.** *In vivo* and *in vitro* estrogenic activity of extracts from *Erythrina poeppigiana* (Fabaceae). *J Complement Integr Med.* 2013; 10: 1-11.
- Nollet E, Van Craenenbroeck EM, Martinet W, Rodrigus I, De Bock D, Berneman Z, Pintelon I, sebaert D, Vrints CJ, Conraads VM, Van Hoof VOM.** Bone matrix vesicle-bound alkaline phosphatase for the assessment of peripheral blood admixture to human bone marrow aspirates. *Clin Chim Acta.* 2015; 446: 253 - 260.
- Nordin BE.** The effect of calcium supplementation on bone loss in 32 controlled trials in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2009 ; 20 :2135-43.

- Noukrati H.** Étude physicochimique de l'association d'un antibiotique avec un ciment apatitique pour la substitution osseuse 2015. [WWW Document]. URL <http://ethesis.inptoulouse.fr/archive/00003067/> (accessed 10.11.15)
- OCDE.** Toxicité orale aigue méthode de la dose prédéterminée. *Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques*. 2001b ; 1 : 1-15.
- OCDE.** Toxicité orale aigue méthode par classe de toxicité. *Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques*. 2001a, 1: 1-14.
- Odokuma E, Akpoghene O, Osemeke I, Eronimeh O.** Road Traffic Accidents and Bone Fractures in Ughelli, Nigeria. *IOSR-JDMS*. 2015; 14, pp 21-5.
- OECD** (Organization for Economic Cooperation and Development). OECD Guidelines for testing of chemicals: Acute oral toxicity-Acute toxic class method. Test No.423, adopted 22nd March 1996, and revised method adopted 17<sup>th</sup> December 2001a. OEDC, Paris
- Oluranti AC, Michael UO, Ugwah-Oguejiofor JC, Ayembe NA.** Ethnobotanical studies of medicinal plants used in the management of peptic ulcer disease in Sokoto State, North Western Nigeria. *Int Res J Pharm Pharmacol*. 2012 ; 2 : 225-30.
- OMS.** Organisation Mondiale de la Santé. Recherche sur la ménopause : Bilan de la décennie 90, Genève OMS ; 1996.
- Onoshe S, Azubuike MM, Hitler L, Oghenekevwe IE, Mary MA, Amos PI.** Free radical scavenging activity and preliminary phytochemical screening of ethyl acetate fraction of stem bark of *Lannea acida* A. Rich. *J Nat Prod Resour*. 2018; 4:182- 4.
- Orshal JM, Khalil RA.** Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol Regul Inter Comp Physiol*. 2004; 286: 233- 249.
- Osama MA, Adel AA, Hanaa IF et Mohamed YZ.** Quercetin and naringin abate diethylnitrosamine/acetylamino fluorescence-induced hepatocarcinogenesis in Wistar rats: the roles of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Drug Chem Toxicol*. 2019; DOI: 10: 1525-6014.
- Ouattara L, Koudou J, Karou DS, Giacò L, Capelli G, Simpore J, Fraziano M, Colizzi V, Traore AS.** Antioxidant and antibacterial activities of three species of *Lannea* from Burkina Faso. *J Appl Sci*. 2011; 11:157-162.

- Ouattara L, Koudou J, Karou DS, Giacò L, Capelli G, Simpure J.** In vitro anti Mycobacterium tuberculosis H37Rv activity of *Lannea acida* A. Rich from Burkina Faso. *Pak J Biol Sci.* 2011; 14:47-52.
- Owusu G, and Ofori-Amoah J.** Anti-inflammatory and Analgesic Effects of an Aqueous Extract of *Lannea acida* Stem Bark. *B J Pharmal Res.* 2017; 16: 1-8.
- Oyeyemi MO, Esan OO, Oyerinde CM et Uwalaka EC.** Effects of *Momordica Charantia* on the serum chemistry and some reproductive parameters in the female Wistar rats. *Nat Sci.* 2015; 13 :119-123.
- Ozgoemen S, Kaya H, Fadillioglu E, Aydogan R and Yilmaz Z.** Role of antioxidant systems, lipid peroxidation, and nitric oxide in postmenopausal osteoporosis. *Mol Cell Biochem.* 2007; 295: 45-52.
- Pacifici R.** Estrogen, cytokines and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Min Res.* 1996; 11: 1043-51.
- Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson I, Kushner PI, Scalani TS.** Differential ligand activation of estrogen receptors ER alpha and ER beta at AP1 sites. *Sci.* 1997; 277:1508-1510.
- Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR.** Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 1987; 2: 595-610.
- Parini P, Angelin B, Rudling M.** Importance of estrogen receptors in hepatic LDL receptor regulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 1800-1805.
- Pearce A, Richards R, Milz S, Schneider E and Pearce S.** Animal models for implant biomaterial research in bone: A review. *Eur Cell Mater.* 2007; 13, 1–10.
- Pegrum J, Crisp T, Padhiar N.** Diagnosis and management of bone stress injuries of the lower limb in the athletes. *BMC.* 2012; 344: e2511.
- Pell SK, Mitchell JD, Miller AJ, Lobova TA.** Anacardiaceae. In: Kubitzki K, editor. The Families and Genera of Vascular Plants: Flowering Plants Eucodocots Sapindales, Cucurbitales and Myrtaceae. *London Springer.* 2011;10: 7-50.
- Pfeilschifter J, Koditz R, Pfohl M, Schatz H.** Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr Rev.* 2002; 23: 90 -119.
- Piao Y, Liu Y, Xie X.** Change trends of organ weight back ground data in Sprague Dawley rats at different ages. *J Toxicol Pathol.* 2013; 26: 29-34.

- Pichardo SEC, Broek FWT, Fiocco M, Appelman-Dijkstra NM, van Merkesteyn JPR.** A comparison of the cone beams computed tomography findings in medication related osteonecrosis of the jaws related to denosumab versus bisphosphonates: an observational pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2020 ;129 :411-7.
- Pinkerton JV, Stovall DW, Kighlinger RS.** Advances in the treatment of menopausal symptoms. *W Health.* 2009; 5: 361-84.
- Pisani P, Renna MD, Conversano F, Casciaro E, Di Paola M, Quarta E, Muratore M, Casciaro S.** Major osteoporotic fragility fractures. Risk factor updates and societal impact World. *J Ortho.* 2016; 7: 171-181.
- Porter JC. Proceedings: Hormonal regulation of breast development and activity. *J Invest Dermatol.* 1974 ; 63 : 85-92.
- Praillet C, Grimaud J, Lortat-Jacob H.** Les protéoglycanes. (I) Molécules aux multiples fonctions. Futures molécules thérapeutiques médecine/sciences. 1998 ; 14 : p 412.
- Prokai TK, Perjesi P, Rivera PNM, Simpkins JW, Prokai L.** Mechanistic investigations on the antioxidant action of a neuroprotective estrogen derivative. *Steroids.* 2008; 73: 280 - 288.
- Prossnitz ER and Marcello M.** Mechanisms of estrogen signaling via GPR30. *Mol Cell Endocrinol.* 2009; 24: 32-38.
- Rachner TD, Khosla S, Lorenz CH.** "Osteoporosis: now and the future. *The Lancet.* 2011; 377: 1276-1287.
- Rauch F et Schoenau E.** Skeletal development in premature infants: a review of bone physiology beyond nutritional aspects. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2002; 86 (2): F82-F85.
- Resende FA, de Oliveira APS, de Camargo MS, Vilegas W, Varanda EA.** Evaluation of Estrogenic Potential of Flavonoids Using a Recombinant Yeast Strain and MCF7/BUS Cell Proliferation Assay. 2013; 8:748-81.
- Revankar CM, Cimino DF, Jeffrey SBA and Prossnitz ER.** A transmembrane Intracellular Estrogen Receptor Mediates Rapid Cell Signaling. *Sci.* 2005; 307: 1625-1630.
- Reyes MR, Sifuentes-Alvares A, Lazalde B.** Estrogens are potentially the only steroids with an antioxidant role in pregnancy: in vitro evidence. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2006; 85: 1090-1093.

- Reynolds RF, Obermeyer CM.** Age at natural menopause in Beirut, Lebanon: the rôle of reproductive and lifestyle factors. *Ann Hum Biol.* 2001; 28: 21-29.
- Riggs BL.** Postmenopausal and senile osteoporosis: current concepts of etiology and treatment. *Endocrinol.* 1979; 26:31- 41.
- Rimoldi G, Christoffel J, Seidlova-Wuttke D, Jarry H & Wuttke W.** Effects of chronic genistein treatment in mammary gland, uterus and vagina. *Environmental. Health P.* 2007; 115: 62-68.
- Rizzoli R.** "Nutrition: its role in bone health." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2008; 22: 813-829.
- Roman-Blas JA, Castañeda S, Largo R, Herrero-Beaumont G.** Osteoarthritis associated with estrogen deficiency. *Arthritis Res Ther.* 2009 ;11: p 241.
- Roux C, Thomas T.** Optimal use of FRAX. *J Bone Spine.* 2009; 76 :1-3.
- Roy EJ, Wade GN.** Role of food intake in estradiol-induced body weight changes in female rats. *Horm Behav.* 1977; 8: 265-274.
- Sajeeth CI, Manna PK and Manavalan R.** Antioxidant activity of polyherbal Formulation on Streptozotocin Induced Diabetes in experimental, Animals. *Der Pharma Sinica.* 2011; 2 : 220 -226.
- Sánchez-Riera L, Wilson N.** Fragility fractures and their impact on older people. *Best Pract Rest Clin Rheumatol.* 2017; 31: 169-9.
- Sánchez-Rodríguez MA, Ruiz-Ramos M, Correa-Munoz E, Mendoza-Nunez VM.** Oxidative stress as a risk factor for osteoporosis in elderly Mexicans as characterized by antioxidant enzymes. *BMC Musculoskelet Disord.* 2007; 8:124-13.
- Sandukji A, Al-Sawaf H, Mohamadin A, Alrashidi Y, Sheweita S.** Oxidative stress and bone markers in plasma of patients with long-bone fixative surgery: Role of antioxidants. *Human & Experimental Toxicol.* 2011; 30: 435 - 442.
- Santell RC, Chang YC, Nair MG Helderich WG.** Dietary genistein exerts estrogenic effects upon the uterus, mammary gland and the hypothalamic / pituitary axis in rats. *J Nutr.* 1997;127: 263 - 269.
- Sarma P, Borah M, Das S.** Evaluation of the effect of ethanolic extract of fruit pulp of *Cassia fistula Linn.* on forced swimming induced chronic fatigue syndrome in mice. *Res Pharm Sci.* 2015; 10: 206 -213.

- Sarwar M, Idress HA, Abdollahi MA.** Review on the recent advances in pharmacological studies on medicinal plants; animal studies are done but clinical studies need completing. *Asian J Animal Vet Advances*. 2011; 6:867-883.
- Schiliro T, Gorrasi I, Longo A, Coluccia S and Gilli G.** Endocrine disrupting activity in fruits and vegetables evaluated with the E-screen assay in relation to pesticide residues. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011; 127 :139 -146.
- Schmidt E, Lotter M, McClelland W, Borrow JA.** Trees and shrubs of Mpumalanga and Kruger National Park. Johannesburg: *Jacana Media*. 2002;p682.
- Seeman E, Hopper JL, Bach LA, Cooper ME, Parkinson E, McKay J, Jerums G.** Reduced bone mass in daughters of women with osteoporosis. *N Engl J Med*. 1989 ; 320 : 554-558.
- Seve M, Favier A.** Métabolisme du Zinc. *Encyclopédie Medico-chirurgicale*. 2002;10-359D10 p19.
- Sharan K, Mishra JS, Swarnkar G, Siddiqui JA, Khan K.** A novel quercetin analogue from a medicinal plant promotes peak bone mass achievement and bone healing after injury and exerts an anabolic effect on osteoporotic bone: the role of aryl hydrocarbon receptor as a mediator of osteogenic action. *J Bone Metab*. 2011; 26:1-16.
- Sheweita SA, Koshhal K.** Calcium metabolism and oxidative stress in bone fractures: role of antioxidants. *Cur Drug Metabol*. 2007; 8: 519-525.
- Sheweita SA, Yousef MI, Baghdadi HH, Elshemy AG.** Changes of drug metabolizing enzymes in the liver of male sheep exposed to either cypermethrin or dimethoate. *Drug Metab*. 2012; 6:2-6.
- Shin JE, Bae EA, Lee YC, Ma JY, and Kim DH.** Estrogenic effect of main components kakkalide and tectoridin of *Puerariae flos* and their metabolites. *Biol Pharma Bulletin*. 2006; 29: 1202-1206.
- Shuid AN, Ping LL, Muhammad N, Mohamed N, Soelaiman IN.** The effects of *Labisia pumila var. Alata* on bone markers and bone calcium in a rat model of post-menopausal osteoporosis. *J Ethnopharmacol*. 2011; 133: 538 - 542.
- Silvestini G, Ballanti P, Patacchioli FR, Mocetti P, Di Grezia R, Wedard BM, Angelucci L, Bonucci E.** Evaluation of apoptosis and the glucocorticoid receptor in the cartilage growth plate and metaphyseal bone cells of rats after high- dose treatment with corticosterone. *Bone*. 2000; 26: 33- 42.

- Simoncini T, Fornari L, Mannella P, Varone G, Caruso A, Liao JK, Genazzani AR.** Novel non-transcriptional mechanisms for estrogen receptor signaling in the cardiovascular system. Interaction of estrogen receptor alpha with phosphatidylinositol 3OH kinase. *Steroids*. 2002; 67: 935-939.
- Simpson ER.** Sources of estrogen and their importance. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003; 86: 225-23.
- Singleton VL and Rossi JA.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American J Enol Viticulture*. 1965; 37:144 -158.
- Sinha AK.** Colorimetric assay of catalase. *Anal Biochem*. 1972; 47: 389-394.
- Sjögren LL, Mørch LS; Løkkegaard E.** Hormone replacement therapy and the risk of endometrial cancer: A systematic review. *Maturitas*. 2016; 91: 25-35.
- Sohair R, Fahmy and Amel M. Soliman:** Oxidative Stress as a Risk Factor of Osteoporotic Model Induced by Vitamin A in Rats. *Australian J of Basic Appl Sc*. 2009; 3: 1559-1568.
- Soladoye MO, Amusa NA, Raji-Esan SO, Chukwuma EC, Taiwo AA.** Ethnobotanical survey of anti-cancer plants in Ogun State, Nigeria. *Ann Biol Res*. 2010 ;1: 261-73.
- Soltanoff CS, Yang S, Chen W, Li YP.** "Signaling networks that control the lineage commitment and differentiation of bone cells." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2009;19: 1-46.
- Soto AM, Lin TM, Justicia HR, Silvia M and Sonnenschein C.** "An "in culture" bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics," in Chemically induced alterations in sexual development: The wildlife/human connection Princeton T. Colborn and Clement C, Eds: *NJ Prin Sc Pub*. 1992; pp295-309,
- Soung DY, Devareddy L, Khalil DA, Hooshmand S, Patade A, Lucas EA, Arjmandi BH.** Soy affects trabecular microarchitecture and favorably alters select bone specific gene expressions in a male rat model of osteoporosis. *Calcif Tissue Int*.2006; 78: 385- 391.
- Sousa C, Abreu H, Viegas C. Azevedo J, Reis R, Reis RL, Gomes ME, Dias MI.** Serum total and bone alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase activities for the assessment of bone fracture healing in dogs. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2011; 63:1007-11.
- Spencer JL, Waters EM, Romeo RD, Wood GE, Milner TA, McEwen BS.** Uncovering the mechanisms of estrogen effects on hippocampal function. *Front Neuroendocrinol*. 2008; 29: 219-237.

- Stein HJ, Esplugues J, Whittle BJ, Bauerfeind P, Hinder RA, Blum AL.** Direct cytotoxic effect of oxygen free radicals on the gastric mucosa. *Surg.* 1989; 106: 318-324.
- Stevenson JC.** A woman's journey through the reproductive, transitional and postmenopausal periods of life: impact on cardiovascular and musculo-skeletal risk and the role of estrogen replacement. *Maturitas.* 2011; 70:197-205.
- Stocco DM, Wang X, Jo Y, Manna PR.** Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and StAR expression: more complicated than we thought. *Mol Endocrinol.* 2005 ; 19 : 2647- 2659.
- Strom O, Borgström F, Kanis JA, Compston J, Cooper C, McCloskey EV, Jonsson B.** Osteoporosis: burden, health care provision and opportunities in the EU: a report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos.* 2011; 6: 59-155.
- Sultanat S, Ilyas M.** A flavanone from *Lannea acida*. *Phytochem.* 1986; 25: 963- 964.
- Svedbom A, Hernlund E, Ivergard M, Ivergard JC, Cooper C, Stenmark, McCloskey EV, Jönsson B, Kanis JA.** Osteoporosis in the European Union: A compendium of country-specific reports. *Arch Osteoporos.* 2013 ; 8 :137.
- Tchatchou J.** Evaluation des propriétés œstrogéniques des extraits des écorces de *Ficus umbellata Vahl* (Moraceae) chez la rate ovariectomisée de souche *Wistar*. Mémoire de Master, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé I. 2014 ; p 1-52.
- Tchernof A, Poehlman ET, Després JP.** Body fat distribution, the menopause transition, and hormone replacement therapy. *Diabetes Metab.* 2000; 26: 12-20.
- Tchoumtchoua J, Mouchili OR, Ateba SB, Zingue S, Halabalaki M, Mbanya JC, Skaltsounis AL, Njamen D.** Safety assessment of methanol extract of the stem bark of *Amphimas pterocarpoides* harms: Acute and subchronic oral toxicity studies in *Wistar* rats. *Toxicol Rep.* 2014; 1:877- 884.
- Tella SH. and Gallagher JC.** Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *The J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014; 142: 155-170.
- Therond P.** Le sélénium. Un oligo-élément essentiel pour la santé humaine. *Cahier de Nutrition et Diabétique.* 2003 ; 38 : 250 - 256.
- Thomas T, Martin A, Lafage-Proust MH.** Physiologie du tissu osseux. *EMC Appar. Locomoteur.* 2008; 3, 1-16.

- Thomson CA, Sherry CHH, Wertheim BC, Roe DJ, Stopeck A, Maskarinec G.** A randomized, placebo-controlled trial of diindolylmethane for breast cancer biomarker modulation in patients taking tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 2017;165: 97-107.
- Toppets V, Pastoret V et al. "Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux." *Annales de Médecine Vétérinaire*. 2004 ; 148 : 1-13.
- Traber MG, Atkinson J.** Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biol Med*. 2007; 43: 4-15.
- Voigt GL.** Anemia and polychythenias in : GL Voigt (Ed), Hematology Techniques and Concepts for Veterinary Technicians Iowa State. *U Pres Iowa*. 2000; pp95-101.
- Wang Y, Nishida S, Elisabeth HZ, Long RK, Halloran BP, Bikle DD.** Role of IGF-I signalling in regulating osteoclastogenesis. *J Bone Miner Re*. 2006; 21: 1350 - 1358.
- Wauquier F, Leotoing L, Coxam V, Guicheux J, Wittrant Y.** Oxidatif stress in bone remodelling and disease. *Trends Mol Med*. 2009; 15 :468 - 477.
- Wei M, Zhonglin Y, Ping L, Yabo Z and Wing CS.** Antiosteoporosis Activity of Naringin in the retinoic Acid-induced osteoporosis Model. *The American J Ch Med*. 2007; 4: 663-667.
- Weitzmann MN and Roberto P.** The role of T lymphocytes in bone metabolism. *Immunol Rev*.2005; 208, Vol. 154168.
- Westwood FR.** The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicol Pathol*. 2008 ; 36 : 375-380.
- WHO "Veillissement et qualité de la vie." 2012.
- White RE, Darkow DJ, Lang JL.** Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP- dependant mechanism. *Circ Res*. 1995; 77: 936-942.
- WHO** (World Health Organization). Traditional medicine. Fact sheet 134. 2003-05. Archived from the original. 2008; 07-28
- WHO** (World Health Organization). WHO Guideline for assessing quality of herbal medicine with reference to contaminants and residues. *World health Organization, Geneva* 2007.
- Williams SA, Chastek B, Sundquist K, Barrera-Sierra S, Leader DJR.** Economic burden of osteoporotic fractures in US managed care enrolees. *The American J of Managed Care*. 2020; 26: 142-149.
- Williamson S, Landeiro F, McConnell T, Fulford-Smith L, Javaid MK, Judge A, Leal J.** Costs of fragility hip fractures globally: a systematic review and meta-regression analysis. *Osteoporos Int*. 2017; 28: 2791-2800.

- Wongdee KN, Krishnamra and Charoenphandhu N.** Endochondral bone growth, bone calcium accretion and bone mineral density: how are they related? *J Physiol Sci.* 2012; 62:299-307.
- Wronski TJ, Walsh CC, Ignaszewski LA.** Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Bone.* 1986; 7: 119-123.
- Wuttke W, Jarry H, Seidlovà-Wuttke D.** Isoflavones-safe food additives or dangerous drugs. *Ageing Res Rev.* 2007 ; 6 : 150-188.
- Xavier G.** Régulation par les œstrogènes du contrôle nitreurgique du bas appareil urinaire. Thèse doctorat, Physiopathologie. Université de Toulouse. 2012.
- Yang Q, Populo SM, Zhang J, Yang G, Kodama H.** Effect of *Angelica sinensis* on the proliferation of human bone cells. *Clin Chim Acta.* 2002; 324:89-97.
- Yaoitcha AS, Houehanou TD, Fandohan AB, Houinato MR.** Prioritization of useful medicinal tree species for conservation in Wari Maro Forest reserve in Benin: A multivariate analysis approach. *For Policy Econ.* 2015; 61:135-146.
- Yoneda N, Yasue A, Watanabe T et Tanaka E.** Down-regulation of Smad 3 accelerates palatal wound repair. *J Dental Res.* 2013; 92: 716- 720.
- Yoon-Bok L, Hyong JL, Kans SK, Jae-Yong L, Sang-Yoon N, Sang-Hee C and Heon-Soo S.** Evaluation of the preventive effect of isoflavone extract on Bone loss in ovariectomized rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004; 68: 1040-1045.
- Young JL, Ji YH, Seung CK, Jong KJ, Yong JN, Kyu SL.** The association between oxidative stress and bone mineral density according to menopausal status of Korean women. *Obstet Gynecol Sci.* 2015; 58:46-52.
- Yousefzadeh N, Kashfi K, Jeddi S, Ghasemi A.** Ovariectomized rat model osteoporosis: a practical. *Excli J.* 2020; 19: 89-107.
- Zagzag J, Hu MI, Fisher SB, Perrier ND.** Hypercalcemia and cancer: Differential diagnosis and treatment. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68:377-386.
- Zebaze RMD.** and Seeman E. Epidemiology of hip and wrist fractures in Cameroon. *Africa Osteoporosis Inter.* 2003; 14: 301-305.
- Zhang YH, Heulsmann A, Tondravi MM, Mukherjee A, and Abu-Amer Y.** Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF) Stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF Type 1 Receptor and RANK Signaling Pathways. *J Biol Chem.* 2006; 276:563-568.

- Zhang ZM, Jiang LS, Jiang SD, and Dai LY.** Osteogenic potential and responsiveness to leptin of mesenchymal stem cells between postmenopausal women with osteoarthritis and osteoporosis. *J Orthop Res.* 2013, [Epub ahead of print].
- Zhen-Guo L, Rong Z, Chen L, Xue M, Li L, Jie-Pin W, Qi-Bing M.** The osteoprotective effect of Radix Dipsaci extract in ovariectomized rats. *J Ethnopharmacol.* 2009;123: 74-7.
- Zhigen Y, Guoan J, Sanqing F, Qiang L, Like C, Kewu P, Wei G, Jun Z, Zan T, Yuan A, Lei M.** Original Article Correlation between autophagy of osteoblasts and oxidative stress of osteoporosis rats. *Int J Clin Exp Pathol.* 2016; 9: 9907- 9915.
- Zingue S, Michel T, Nde CBN, Njuh AN, Cisilotto J, Ndinteth T, Njamen D.** Estrogen-like and tissue-selective effects of 7-methoxycoumarin from *Ficus umbellata* (Moraceae): an *in vitro* and *in vivo* study. *BMC Compl Altern Med.* 2017; 17: 383 p.
- Zingue S, Njamen D, Mvondo MA, Nde CBM:** Preventive effects of the methanol soluble fraction of *Millettia macrophylla* Benth (Fabaceae) on an osteoporosis-like model of ovariectomized Wistar rats. *J Complemen Int Med.* 2014; 11: 83-92.
- Žofková I.** Hypercalcemia. Pathophysiological aspects. *Physiol Res* 2016; 65:1-10.
- Zougrou NE, Blahi AN, D’Almeida MA et Kouakou K.** Fertility enhancing effects of aqueous extract of leaves of *Cnestis ferruginea Vahl ex De Cantolle* on female Wistar rats. *Inter J Biosci.* 2016 ; 9 :79-91.



**ANNEXE**

### **Annexe.1.1- Substances de références**

Les substances de références utilisées ont été : le diazépam et l'œstradiol valérate.

-**La solution de diazépam** 1 mg/mL a été préparée en introduisant 1 ml de diazépam (10 mg/2 mL) dans une fiole jaugée (5 mL) et le volume complété à 5 ml avec de l'eau distillée.

- **La solution d'œstradiol valérate** 0,1 mg/mL a été préparée par dilution de 2 mg d'œstradiol valérate dans une fiole jaugée (20 mL) avec 5 mL d'eau distillée et le volume final complété à 20 mL avec de l'eau distillée.

### **Annexe.1.2- Tampon utilisé pour la préparation des homogénats**

Le tampon utilisé pour la préparation des homogénats de l'utérus a été le tampon phosphate sodium 0,1 M, pH 7,5. Pour la préparation, 1,74 g de phosphate monosodique hydraté ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) et 1,57 g de phosphate disodique hydraté ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) ont été dissous dans 200 mL d'eau distillée. Le pH du tampon a été réajusté en utilisant soit quelques gouttes d'un acide fort (acide chlorhydrique) ou d'une base forte (soude). Un pH-mètre a permis de vérifier son obtention.

### **Annexe.1.3 - Solutions pour le dosage des protéines**

Les solutions utilisées ont été : la solution de Biuret et la solution d'albumine sérique bovine.

- **La solution de Biuret** résulte du mélange de deux solutions. Solution A : 0,75 g de sulfate de cuivre hydraté ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) et 3 g de tartrate de sodium et de potassium ont été dissous dans 100 mL d'eau distillée. La solution B quant à elle était constituée de 15 g de soude qui ont été dissouts dans 100 mL d'eau distillée. Les deux solutions ont été mélangées dans une fiole jaugée et le volume final ajusté à 500 mL avec de l'eau distillée.

- **La solution d'albumine** sérique bovine 10 mg/mL a été préparée à partir de 100 mg de solution d'albumine sérique bovine (BSA) dissous dans une fiole jogée (10 mL) avec 8 mL d'eau distillée et le volume final complété à 10 mL avec de l'eau distillée. Cette solution mère a été diluée de flacon sérié pour avoir des solutions de BSA de concentration décroissante. Ces différentes solutions ont permis d'établir la courbe d'étalonnage des protéines totales par la méthode de Biuret.

## **Annexe.1.4 - Solutions, réactifs et tampons utilisés pour le dosage des composés**

### **polyphénoliques et la détermination du pouvoir antioxydant *in vitro* et *in vivo***

Le dosage des composés polyphénoliques et la détermination du pouvoir antioxydant *in vitro* et *in vivo* ont été réalisés à l'aide de plusieurs solutions, réactifs et tampons. Ce sont : la solution standard, le réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/10e, la solution de carbonate de sodium 7,5 %, la solution de nitrite de sodium 5 %, la solution de chlorure d'aluminium 10 %, la solution hydroxyde de sodium 1mM, le tampon acétate 300 mM, pH 3,6, le HCl 40 mM, la solution de 2,4,6-tris (2 pyridyl)- S-triazine (TPTZ) 10 mM, la solution FeCl<sub>3</sub> 10 mM et le réactif de FRAP.

- **La solution standard** utilisée était de la quercétine aux concentrations de 1 µg/mL et 1 mg/mL. Ces concentrations ont été obtenues en dissolvant respectivement 5 µg et 5 mg de quercétine dans des fioles jaugées (5 mL) avec 3 mL d'eau distillée et le volume final complété à 5 mL avec de l'eau distillée. Ces solutions ont été utilisées lors de la détermination des concentrations des polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et potentiel antioxydant *in vitro*.

-**Le réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/10e** a été obtenu par le mélange de 2 mL de Folin Ciocalteu dans une fiole jaugée (20 mL) avec 5 mL d'eau distillée et le volume final complété à 20 mL avec de l'eau distillée. Cette solution a été utilisée lors de la détermination de la concentration des polyphénols totaux.

-**La solution de carbonate de sodium 7,5 %** a été obtenue par dissolution de 3,75 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dans une fiole jaugée (50 mL) avec 10 mL d'eau distillée et le volume final complété à 50 mL avec de l'eau distillée. Cette solution a été utilisée lors de la détermination de la concentration des polyphénols totaux.

- **La solution de nitrite de sodium 5 %** a été obtenue de la dissolution de 1 g de NaNO<sub>2</sub> dans une fiole jaugée (20 mL) avec 5 mL d'eau distillée et le volume final complété à 20 mL avec de l'eau distillée. Cette solution a été utilisée lors de la détermination de la concentration des flavonoïdes totaux.

- **La solution de chlorure d'aluminium 10 %** a été obtenue par dissolution de 2 g de AlCl<sub>3</sub> dans une fiole jaugée (20 mL) avec 10 mL d'eau distillée et le volume final complété à 20 mL avec de l'eau distillée. Cette solution a été utilisée lors de la détermination de la concentration des flavonoïdes totaux.

- **La solution hydroxyde de sodium 1mM** a été préparé en dissolvant de 2 g de NaOH dans une fiole jaugée (50 mL) avec 10 mL d'eau distillée et le volume final complété à 50 mL avec de l'eau distillée. Cette solution a été utilisée lors de la détermination de la concentration des flavonoïdes totaux.

- **Le tampon acétate 300 mM, pH 3,6** a été obtenu par dissolution de 0,66 g d'acétate de sodium dans une fiole jaugée (250 mL) avec 200 mL d'eau distillée, puis le pH est ajusté à 3,6 par titration avec 4,13 mL d'acide acétique. Le volume obtenu est complété à 250 mL avec de l'eau distillée. Cette solution a été utilisée pour la préparation du réactif de FRAP lors de la détermination du potentiel antioxydant *in vitro*.

- **Le HCl 40 mM** a été obtenu par le mélange de 0,86 mL de HCl 12 M dans une fiole jaugée (25 mL) avec 5 mL d'eau distillée et le volume final complété à 25 mL avec de l'eau distillée. Cette solution a été utilisée pour la préparation du TPTZ lors de la détermination du potentiel antioxydant *in vitro*.

-**La solution de 2,4,6-tris(2-pyridyl)-S-triazine (TPTZ) 10 mM** a été préparé par dissolution de 0,078 g de TPTZ dans une fiole jaugée (25 mL) avec 5 mL de HCl 40 mM et le volume final complété à 25 mL avec du HCl 40 mM. Cette solution a été utilisée pour la préparation du réactif de FRAP lors de la détermination du potentiel antioxydant *in vitro*.

- **La solution FeCl<sub>3</sub> 10 mM** est obtenue par la dissolution de 0,34 g de FeCl<sub>3</sub> dans une fiole jaugée (25 mL) avec 5 mL d'eau distillée et le volume final complété à 25 mL avec de l'eau distillée. Cette solution a été utilisée pour la préparation du réactif de FRAP lors de la détermination du potentiel antioxydant *in vitro*.

- **Le réactif de FRAP** est obtenu par le mélange des solutions de tampon acétate (300 mM, pH 3,6), de TPTZ (10 mM) et de FeCl<sub>3</sub> (10 mM) dans les proportions 10 :1 :1. Ce réactif a été utilisé lors de la détermination du potentiel antioxydant *in vitro* et *in vivo*.

#### **Annexe.1.5 - Solutions et tampons utilisés pour le dosage de quelques paramètres du stress oxydant**

Les solutions et tampons utilisés pour le dosage de quelques paramètres du stress oxydant ont été : le tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, la solution d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,37 %, la solution d'acide trichloracétique (TCA) 15 %, le HCl 0,25N, la solution TCA-TBA-HCL, le tampon phosphate 0,1M, pH 6,5 et le réactif d'Ellman.

- **Le tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,4** est obtenu par dissolution de 1,21 g de tris base et 2,79 g de KCl dans une fiole jagée (500 mL) avec 250 mL d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7,4 par ajout de HCl 11,8 N et un pH-mètre a permis de vérifier son obtention. Le volume final (500 mL) est obtenu par ajout d'eau distillée. Cette solution a été conservée à 4°C et a été utilisée lors du dosage du glutathion réduit (GSH).

- **La solution d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,37 %**. Pour préparer cette solution, 0,37 g de TBA a été dissous dans une fiole jaugée (100 mL) avec 5 mL d'eau distillée et le volume final complété à 100 mL avec de l'eau distillée. Cette solution a été utilisée pour préparer la Solution TCA-TBAHCL.

- **La solution d'acide trichloracétique (TCA) 15 %** a été préparée en dissolvant 7,5 g de TCA dans une fiole jaugée (50 mL) avec 20 mL d'eau distillée et le volume final complété à 50 mL avec de l'eau distillée. Cette solution a été utilisée pour préparer la Solution TCA-TBA-HCl.

- **Le HCl 0,25 N** a été obtenu par un mélange de 1,04 mL de HCl 0,25 N dans une fiole jagée (50 mL) avec 5 mL d'eau distillée et le volume final complété à 50 mL avec de l'eau distillée. Cette solution a été utilisée pour préparer la Solution TCA-TBA-HCl.

- **La solution TCA-TBA-HCL** a été obtenue par le mélange des solutions de TBA, TCA et HCl dans les proportions 1 : 1 : 1.

- **Le tampon phosphate 0,1M, pH 6,5** a été obtenu à partir du mélange de deux solutions : Solution A : 6,5 g de phosphate monosodique hydraté ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ) dissous dans 500 mL d'eau distillée. Solution B : 8,9 g de phosphate disodique hydraté ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ) dans 500 mL d'eau distillée. Un mélange de 500 mL de la solution A obtenue et de 200 mL de la solution B a été réalisé puis 80 mL de la même solution A a été ajouté goutte à goutte pour un volume final de 780 mL. Cette solution a été utilisée pour la préparation du Réactif d'Ellman lors du dosage du glutathion réduit (GSH).

- **Le réactif d'Ellman** a été obtenu en dissolvant 4,96 mg de DTNB dans une fiole jagée (250 mL) avec 100 mL de tampon phosphate (0,1 M ; pH 6,5) et le volume final complété à 250 avec du tampon phosphate (0,1 M ; pH 6,5). Ce réactif a été utilisé lors du dosage du glutathion réduit (GSH).

#### **Annexe.1.6- Solutions et colorants utilisés pour les coupes histologiques**

Les solutions et colorants ci-après ont été préparés avec de l'eau distillée et/ou avec de l'alcool absolu ou de l'éthanol concentré à 95 %.

- **La solution saturée d'eau lithinée** est utilisée pour renforcer la coloration nucléaire. Pour un volume final de 300 mL, 10 mg de carbonate de lithium ont été introduits dans un bécher et le

volume final a été atteint après ajout d'eau distillée. La solution obtenue a été filtrée avant d'être utilisée.

- **La solution aqueuse de vert lumière à 2 %** a été obtenue par le mélange de 25 mL de solution aqueuse de vert lumière dans une fiole jaugée avec (1000 mL) avec 50 mL d'éthanol à 95% et le volume final complété à 1000 mL avec de l'éthanol à 95%.

- **La solution de brun Bismarck à 0,5 %** a été obtenue par dissolution de 0,5 g de brun Bismarck dans une fiole jaugée avec (100 mL) avec 5 mL d'éthanol à 95% et le volume final complété à 100 mL avec de l'éthanol à 95%.

- **Le Formol à 10%** a été utilisé pour fixer les organes et les tissus. La préparation a été réalisée à partir du formol commercial (solution concentrée à 40%). Pour avoir un volume final (Vf) de 1000 mL, un volume initial (Vi) de 250 mL de formol a été introduit dans une éprouvette graduée et le Vf a été obtenu par ajout d'eau distillée.

- **L'acide nitrique à 10%** a été utilisé pour la décalcification des os. La préparation a été faite à partir de la solution d'acide nitrique (concentrée à 95%). Ainsi, pour l'obtention d'un volume final (Vf) de 1000 mL, un volume initial (Vi) de 105,26 mL d'acide nitrique à 95% a été introduit dans une éprouvette graduée et le volume final (Vf) a été atteint par ajout d'eau distillée.

- **L'alcool à 50°, 70° et 80°** ont été obtenu par dilution de l'éthanol à 95% d'après la table de Gay-Lussac (Annexe II). Cette opération consiste à amener un alcool à un degré plus faible en lui ajoutant de l'eau distillée.

- **La solution d'Hématoxyline de Harris** est un colorant nucléaire. Pour la préparation de 200 mL, 1 mg d'hématoxyline, 10 mL d'alcool absolu, 20 g d'alun potassique ont été mélangés et 0,5 g d'oxyde rouge de mercure a été graduellement ajouté. La solution finale a été complétée à 200 mL par ajout de l'eau distillée. Le mélange obtenu a été porté à ébullition puis refroidi et filtré. La solution d'Hématoxyline de Harris a été recueillie.

- **La solution d'éosine alcoolique à 0,5%** est un colorant cytoplasmique. Pour obtenir une solution de 500 mL, nous avons fait dissoudre 3 g d'éosine dans 100 mL d'eau distillée. A cette solution initiale, un volume de 125 mL d'éthanol à 95° a été ajouté et le tout a été complété jusqu'à 500 mL avec de l'eau distillée. Après homogénéisation et filtration, 2 gouttes d'acide acétique ont été ajoutées. La solution finale obtenue a été laissée à l'abri de la lumière et filtrée avant usage.

- **La solution d'eau gélatinée** permet l'étalement des coupes histologiques et une bonne adhésion de celles-ci sur les lames. Pour la préparation de 100 mL de cette solution, 5 mg de

poudre de gélatine ont été dissous dans 80 mL d'eau distillée et le volume du mélange a été complété à 100 mL avec de l'eau distillée.

- **La solution d'orange G à 10 %** est un colorant sec utilisé pour la cytologie vaginale. Elle a été obtenue par dilution de 10 g d'orange G dans 100 mL d'eau distillée.

- **La solution d'éthanol/xylène** résulte du mélange d'éthanol absolu avec du xylène dans les proportions d'un volume d'éthanol pour un volume de xylène (1v/1v) et utilisée pour le déparaffinage.

- **La solution d'éosine alcoolique 65 (mélange polychrome EA-65)** a été obtenue par le mélange de 450 mL de vert lumière à 0,02%, de 100 mL de brun Bismarck à 0,5% et de 450 mL de solution d'éosine à 0,5%. Six grammes d'acide phosphotungstique ont ensuite été dissous dans le mélange.

- **La solution tampon phosphate 0,1 M, pH 7,5** a été obtenue en dissolvant dans de l'eau distillée 4,08 g de phosphate monosodique hydraté ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) et 11,75 g de phosphate disodique hydraté ( $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) quantité suffisante pour faire 1 litre

#### **Annexe.1.7- Solutions pour dosage de la phosphatase alcaline.**

La solution du dosage de la phosphatase alcaline était constituée d'un mélange de deux réactifs. Le contenu de chaque réactif est présenté dans le tableau ci-dessous.

Réactif (A) ALP Volume = 40 /80 mL	Tampon AMP Magnésium ions Zinc ions EDTA	500 mmol/L 2 mmol/L 1mmol/L 2 mmol/L
Réactif (B) ALP Volume = 10 mL	p- nitrophenyl phosphate	16 mol/L

#### **Annexe.1.8- Solutions de dosage du taux de calcium :**

La solution du dosage du taux de calcium était constitué de trois réactifs dont les contenues sont présentées dans le tableau ci-dessous.

<b>Réactif (1)</b>	Standard	Calcium	10 mg/dL (2,5 mmol/L)
<b>Réactif (2)</b>	Tampon	Amino-2-methyl-2-propanol-1 Acide chlorhydrique	1,70 mol/L 210 mmol/L
<b>Réactif (3)</b>	Chromogène	Complexes d'o-crésol phtaléine Hydroxy-8-Quinoline Acide chlorhydrique	78 $\mu\text{mol/L}$ 3,36 mmol/L 25 mmol/L

## Annexe.1.9- solution de dosage du taux de phosphore inorganique

Le tableau VIII suivant montre le contenu du kit de dosage du phosphore inorganique

Réactif (1)	Standard	5 mg/dL (1,615 mmol/L)
Réactif (2)	Détergent, chlorure de Sodium	1,2 % < 1%
Réactif (3)	Molybdate d'ammonium Acide sulfurique	< 1% < 2%

## Annexe.2. Table de Gay-Lussac

La table de Gay-Lussac, encore appelé table de mouillage de l'alcool, est utilisée pour la dilution de l'alcool.

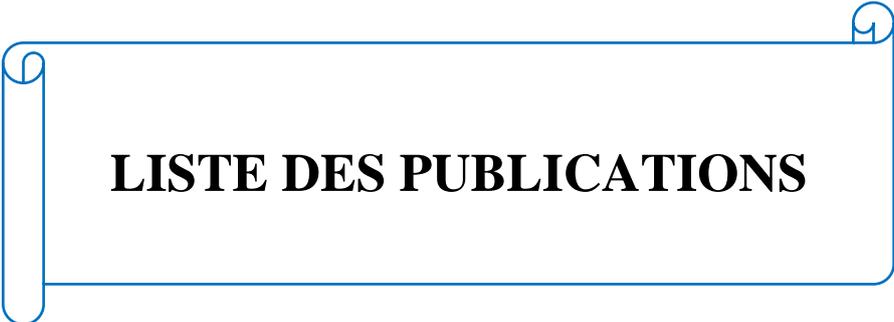
Table pour la dilution de l'alcool (Table de Gay-Lussac) appelée aussi Table de mouillage de l'alcool

		Concentration initiale													
		100	99	98	97	96	95	90	85	80	75	70	65	60	50
Concentration finale	95	6,5	5,15	3,83	2,53	1,25									
	90	13,25	11,83	10,43	9,07	7,73	6,41								
	85	20,54	19,05	17,58	16,15	14,73	13,33	6,56							
	80	28,59	27,01	25,47	23,95	22,45	20,95	13,79	6,83						
	75	37,58	35,9	34,28	32,67	31,08	29,52	21,89	14,48	7,2					
	70	47,75	45,98	44,25	42,54	40,85	39,18	31,05	23,14	15,35	7,64				
	65	59,37	57,49	55,63	53,81	52	50,22	41,53	33,03	24,66	16,37	8,15			
	60	72,82	70,80	68,8	65,85	64,92	63	53,65	44,48	35,44	26,47	17,58	8,76		
	55	88,6	86,42	84,28	82,16	80,06	77,99	67,87	57,9	48,07	38,32	28,63	19,02	9,47	
	50	107,44	105,08	102,75	100,44	98,15	95,89	84,71	73,90	63,04	52,43	41,73	31,25	20,47	
	45	130,26	127,67	125,11	122,57	120,06	117,57	105,34	93,30	81,38	69,54	57,78	46,09	34,46	11,41
	40	158,56	155,68	152,84	150,02	147,22	144,46	130,8	117,34	104,01	90,76	77,58	64,48	51,43	25,55
	35	194,63	191,39	188,19	185,01	181,85	178,71	163,28	148,01	132,88	117,82	102,84	87,93	73,08	43,59
	30	242,38	238,67	234,99	231,33	227,70	224,08	206,22	188,57	171,05	153,61	136,04	118,94	101,71	67,45
	25	308,9	304,52	300,18	295,86	291,56	287,28	266,12	245,15	224,3	203,61	182,83	162,21	141,65	100,73
	20	408,5	403,13	397,79	392,47	387,17	381,9	355,8	329,84	304,01	278,26	252,58	226,98	201,43	150,55
15	574,75	567,43	560,53	553,55	546,59	539,66	505,27	471	436,85	402,81	368,83	334,91	301,07	233,64	
10	907,09	896,73	886,4	876,1	865,15	855,15	804,5	753,65	702,89	652,21	601,6	551,06	500,50	399,85	

Les chiffres en noir indiquent la quantité d'eau en mL à ajouter à 100mL d'alcool de concentration initiale x (en bleu) pour obtenir la concentration désirée.

**Exemple** : la table indique qu'il faut ajouter 105,34 ml d'eau à 100 mL d'alcool à 90° pour obtenir de l'alcool à 45°.

Attention : Le volume final est inférieur à la somme des volumes mis en jeu ! C'est le phénomène dit de « contraction de volume », variable en fonction du titre de l'alcool initial.



## **LISTE DES PUBLICATIONS**

➤ **Liste des publications**

1- **Oumarou RM**, Zingue S, Bakam BY, Ateba SB, Foyet SH, Mbakop FT and Dieudonné N. *Lannea acida* A. Rich. (Anacardiaceae) ethanol extract exhibits estrogenic effects and prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *Evid Based Complem Altern Med* 2017; Article ID: 7829059, pp 1-16.

2-**Oumarou RM**, Sylvain BA, Chantal BM, Stéphane Z, and Dieudonné N. Ethanol extract of *Lannea acida* A. Rich stem bark (Anacardiaceae) accelerates bone healing through estrogenic and antioxidant properties in ovariectomized Wistar rat. *Biomed J Sci & Tech Res* 45(2)-2022. BJRST MS.ID. 007172.

➤ **Communication**

1- **Mouchili RO**, Zingue S, Bakam BY, Ateba SB, Foyet SH, Mbakop FT and Dieudonné N. *Lannea acida* A. Rich. (Anacardiaceae) ethanol extract exhibits estrogenic effects and prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. Poster presentation at the Sixth Life Sciences Conference, August 8-10. (University of Dschang, Cameroon 2018).

## Research Article

# ***Lannea acida* A. Rich. (Anacardiaceae) Ethanol Extract Exhibits Estrogenic Effects and Prevents Bone Loss in an Ovariectomized Rat Model of Osteoporosis**

**Mouchili Riepouo Oumarou,<sup>1</sup> Stéphane Zingue,<sup>1,2</sup>  
Berlise Yengwa Bakam,<sup>2</sup> Sylvin Benjamin Ateba,<sup>1</sup> Simplicie Harquin Foyet,<sup>3</sup>  
Fritz Teddy Tchaptchet Mbakop,<sup>2</sup> and Dieudonné Njamen<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Yaounde I, P.O. Box 812, Yaounde, Cameroon

<sup>2</sup>Department of Life and Earth Sciences, Higher Teachers' Training College, University of Maroua, P.O. Box 55, Maroua, Cameroon

<sup>3</sup>Department of Biological Sciences, Faculty of Sciences, University of Maroua, P.O. Box 814, Maroua, Cameroon

Correspondence should be addressed to Stéphane Zingue; [stephanezingue@gmail.com](mailto:stephanezingue@gmail.com)  
and Dieudonné Njamen; [dnjamen@gmail.com](mailto:dnjamen@gmail.com)

Received 6 July 2017; Accepted 25 October 2017; Published 27 November 2017

Academic Editor: Eman Al-Sayed

Copyright © 2017 Mouchili Riepouo Oumarou et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Phytoestrogens have been shown to prevent postmenopausal osteoporosis. *Lannea acida* is a medicinal plant traditionally used in Cameroon to treat infertility, gynaecological complaints, and rheumatism. These uses prompted us to evaluate estrogenic activity of *Lannea acida* bark ethanolic extract and its antiosteoporotic potential in ovariectomized Wistar rats. *In vitro*, the E-screen assay was used to assess the ability of *L. acida* extract to induce MCF-7 cells proliferation. *In vivo*, a 3-day uterotrophic assay and a 12-week oral treatment in ovariectomized adult rats were carried out to evaluate the ability of *L. acida* extract to prevent bone mass loss. *L. acida* extract induced MCF-7 cell proliferation. *In vivo*, it significantly increased the uterine wet weight, uterine and vaginal epithelial heights, and mammary glands differentiation. At 200 mg/kg, a long-term treatment with the extract prevented body weight gain ( $p < 0.05$ ) and loss of bone mass and/or density ( $p < 0.05$ ) induced by ovariectomy. Also, a significant ( $p < 0.001$ ) decrease of alkaline phosphatase activity was observed with 50 mg/kg. *L. acida* extract improved bone microarchitecture and could restore normal bone mineralization by increasing the inorganic phosphorus and calcium level in bone. These findings provide evidence that *Lannea acida* is a potential alternative for the prevention of postmenopausal osteoporosis.

## 1. Introduction

Estrogen is steroidal hormone mainly produced by ovaries, which greatly fluctuates during women's lifespan and declines with menopause [1]. In addition to its role in primary organs like uterus, vagina, and mammary glands, it plays an important role in bone growth and homeostasis. Genetic, nutritional, and lifestyle factors as well as estrogen deficiency following the menopause are known to increase osteoclastic bone resorption rate and then risk of osteoporosis [2, 3]. Osteoporosis is a worldwide threat characterized by a bone mass loss linked to a low mineral content and microarchitectural deterioration of bone tissue leading to bone fragility and

increased risk of fracture [4]. These fractures occur mainly in hip, spine, and wrist and are a major cause of morbidity and mortality in elderly populations [3, 5]. According to the International Osteoporosis Foundation [6], the number of elderly people is increasing throughout the globe. Accordingly, the incidence of related fractures and costs for treatment will rise dramatically unless effective prophylactic measures are taken. It is estimated that the incidence of hip fracture will rise from 1.66 million in 1990 to 6.26 million by 2050 [7]. Osteoporosis and fragility fractures are believed to be uncommon in Africa. However, in a 2-year period study conducted in two urban hospitals in Cameroon, Zebaze and Seeman [8] reported that among all women patients aged 35 years and older diagnosed

for fracture the hip and wrist fractures related to bone fragility were the most common pattern.

For decades, effective treatment such as antiresorptive bisphosphonates and hormone replacement therapy (HRT) has been used for managing postmenopausal osteoporosis [9, 10]. Unfortunately, the uses of bisphosphonates are often associated with gastrointestinal intolerance and osteonecrosis of the jaws [11]. Moreover, HRT is involved in adverse outcomes after long-term use such as increased risk of endometrial and breast cancers, stroke, and pulmonary thromboembolism [12, 13]. Due to these reports women turned to alternatives. Efforts have been made for decades to find nonhormonal, effective and safer antiosteoporotic alternatives. In line with this interest in phytoestrogens rose significantly as they mimic estrogenic activity and might be promising.

In our ongoing research of novel phytoestrogens from plant, we sought a scientific rationale for the traditional use of *Lannea acida* (syn. *Odina acida*) (Anacardiaceae), commonly called “faruhi” in Fulani-Fulfulde (Nigeria), “faàrú” in Hausa, “Mipadi” in Giziga, or “Timbiya” in Moundang in Cameroun [14], and growth in Sub-Saharan Africa. Barks of *L. acida* are traditionally used in Nigeria as antiabortifacient, vermifuge and to treat anal haemorrhoids, diarrhoea, dysentery, malnutrition, and debility [15] and in Cameroon to treat dysmenorrhoea, amenorrhoea, and infertility, while the leaves treat rheumatism [16]. Information provided by the traditional healer in Moutourwa (Far North Region of Cameroon) revealed that the maceration of *L. acida* stem bark in local alcoholic drink (palm wine) is used to treat diarrhoea and gynaecological complaints. Ahmed et al. [17] showed that the methanolic extract of *L. acida* increased mobility, morphology, and sperm count as well as testosterone level in Wistar rats. Moreover, 4 flavonoids have been isolated from barks of *L. acida* [18], but to the best of our knowledge, no estrogenic activity of this plant has been investigated to date. Therefore, the present study aimed to evaluate *in vitro* and *in vivo* estrogenic activities of the ethanolic extract of stem bark of *L. acida* and to assess the antiosteoporotic potential of this extract in ovariectomized Wistar rats.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Chemicals.** 17 $\beta$ -Estradiol valerate (Progynova® 2 mg) was purchased from DELPHARM (Lille, France). Penicillin (Xtopen®) was provided by CSPC Zhongnuo Pharmaceutical (Shijiazhuang City, China). Diclofenac (Dicloecnu®) was provided by ECNU Pharmaceutical (Yanzhou City, China). The cell culture medium was purchased from Cultilab (São Paulo, SP). Serum and antibiotics were purchased from GIBCO (Grand Island, NY). The 17 $\beta$ -estradiol benzoate [(estr-1,3,5(10)-trien-3,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol); purity  $\geq$  98%] was obtained from Sigma-Aldrich (Hamburg, Germany). The 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethane sulfonic acid (HEPES, purity  $\geq$  99.5%) was purchased from Ludwig Biotecnologia Ltda (Alvorada, RS, Brazil). Trypan blue, quercetin, Alamar Blue, and Sulforhodamine-B were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

## 2.2. Plant Material

**2.2.1. Collection and Authentication.** The stem barks of *Lannea acida* A. Rich. (Anacardiaceae) were harvested in Moutourwa (Far North Region of Cameroon) on 6 July 2014 (pluvial season) around 11:30 a.m. The plant was localized at the geographical coordinates of N10°12.681' East and E0 14°11.623' altitude with a “ESTREX” Global Positioning System. This botanical sample was identified and authenticated by Mr. Victor Nana, botanist at the National Herbarium of Cameroon (HNC-IRA), by comparison to the specimen deposited under the voucher number 40942 HNC.

**2.2.2. Extraction.** The collected stem barks of *L. acida* were cleaned and air-dried at room temperature for 14 days. Then, 2000 g of the powder was macerated in 95% ethanol at room temperature (6 L of solvent  $\times$  3, 48 h per extraction). The combined solutions were filtered using a Whatman filter paper number 4 and evaporated under reduced pressure (337 mbar at 40°C) using a rotary evaporator to afford 272 g of crude extract (a yield of 13.6%). The extract was kept at 4–8°C and dissolved in distilled water prior to administration.

**2.2.3. Preliminary Phytochemical Screening.** Investigation on phytochemical composition of *L. acida* ethanol extract was performed according to the method described by Odebiyi and Sofowora [19]. Concentrations of some bioactive phytochemicals, such as total phenols, flavonoids, and alkaloids, were measured according to methods described by Singleton and Rossi [20], Zhishen et al. [21], and Fazel et al. [22], respectively.

## 2.3. In Vitro Experiments

**2.3.1. Cell Line System.** The human ER<sup>+</sup> breast adenocarcinoma MCF-7 cells were obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (Federal University of Rio de Janeiro, Brazil).

**2.3.2. Cell Culture.** MCF-7 cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with fetal bovine serum (FBS) 10% as previously reported by Zingue et al. [23]. Briefly, cell cultures were also supplemented with penicillin 100 U/mL, streptomycin 100  $\mu$ g/mL, and HEPES 10 mM. They were maintained at 37°C in a CO<sub>2</sub> 5% humidified atmosphere and pH 7.4. Every two days, cells were passaged by removing 90% of the supernatant and replaced by fresh medium. Viable cells (a minimum of 95%) were checked at the beginning of the experiment by Trypan Blue dye exclusion test.

**2.3.3. Cell Viability Assay.** Cytotoxicity potential of *L. acida* extract was evaluated by Alamar Blue (resazurin) assay in MCF-7 cells as described in our previous report [24]. This assay evaluates the mitochondrial production as a measurement of cell viability. To evaluate the influence of concentration and time on cytotoxicity, 1  $\times$  10<sup>4</sup> cells/well were seeded in a 96-well plate in 100  $\mu$ L of culture medium. After 24 h to permit their adhesion, cells were exposed to *L. acida* extract at concentrations from 0.1 to 200  $\mu$ g/mL for 24 h. The CC<sub>50</sub> (cytotoxic concentration, which means concentration

required to reduce the cell number by 50%) was determined by nonlinear regression analysis of the logarithm of concentration in function of the normalized response (percentage of cell viability) using the software GraphPad Prism 5.0. Each experiment was performed at least in triplicate and repeated three times.

**2.3.4. E-Screen Assay.** In order to evaluate estrogenic-like effects of *L. acida* extract a simple and sensitive E-screen cell proliferation assay was performed with MCF-7 cells. This assay indirectly determines the estrogenicity/antiestrogenicity of compounds through measurement of the proliferation of MCF-7 cells and was performed as previously described by Zingue et al. [23]. Briefly, cells were trypsinized and seeded in 24-well plates at an initial concentration of  $5 \times 10^4$  cells per well in RPMI supplemented with FBS 10%. After 24 h of incubation (37°C, CO<sub>2</sub> 5%) to permit their adhesion, cells were washed with phosphate-buffered saline-PBS (NaCl 137 mM; KCl 2.7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mM; pH 7.4) and the Serum Replacement 2 (0.5x) supplemented phenol red-free RPMI was substituted for the seeding medium. A stock solution of *L. acida* ethanolic extract 100 mg/mL prepared in DMSO was then added to the experimental medium in order to reach concentrations from 0.1 to 200 µg/mL. The DMSO concentration of 0.01% was fixed based on the final volume on different wells. For antiestrogenic evaluation, before cell incubation, 17β-estradiol 10 nM was added to the wells. Cells treated with DMSO (0.01%) and FBS 10% in RPMI served as solvent and medium controls, respectively. Quercetin (10 nM) was used as the reference/standard. The assay was stopped after 144 h by removing the medium from the wells, fixing the cells with cold trichloroacetic acid 10%, and incubation at 4°C for 1 h. Thereafter, cells were washed four times with tap water and dried. Cells were stained for 30 min with Sulforhodamine-B (SRB) 0.057% (w/v) which was dissolved in 1% acetic acid, rinsed four times with acetic acid 1%, and air-dried. Bound dye was solubilized with Tris base 10 mM (pH 10.5) in a shaker. Finally, aliquots were read in a Biotek EL800 absorbance reader (Winooski, USA) at 510 nm. The results related to estrogenic activity were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) of the proliferative effect (PE), which was calculated according to Schilirò et al. [25]:  $PE = \frac{\text{max cell number of sample}}{\text{cell number of DMSO control}}$ . The estrogenic activity of a sample was determined as the relative proliferative effect (RPE%). The RPE compares the maximum proliferation induced by a sample with that induced by 17β-estradiol:  $RPE\% = \left[ \frac{PE \text{ for sample}}{PE \text{ for } 17\beta\text{-estradiol}} \right] \times 100$  [26].

#### 2.4. In Vivo Experiments

**2.4.1. Animals.** Healthy female albinos Wistar rats (10–12 weeks old) weighing ~150 g were supplied by the production facility of the Animal Physiology Laboratory, University of Yaounde I (Cameroon). All rats were housed in clean plastic cages at the room temperature and lit with natural light. They were given free access to tap water and free-soy rat chow. The composition of animal diet was corn (36.7%), bone flour (14.5%), wheat (36.6%), fish flour (4.8%), crushed palm

kernel (7.3%), sodium chloride (0.3%), and vitamin complex (Olivitazol®, 0.01%). All experiments were conducted in accordance with the principles and procedures of the European Union on Animal Care (CEE Council 86/609) guidelines adopted by the Cameroon Institutional National Ethic Committee, Ministry of Scientific Research and Technology Innovation (Reg. number FWA-IRD 0001954).

**2.4.2. The 3-Day Uterotrophic Assay.** The estrogenic activity of *L. acida* extract was evaluated using a classical 3-day uterotrophic assay in ovariectomized adult rats [27]. Thirty female Wistar rats were ovariectomized (OVX) under ketamine and valium anesthesia (10 mg/kg and 50 mg/kg BW *i.p.*, resp.) and randomly grouped into six groups of five rats each, after 14 days of endogenous hormonal decline. The first group (OVX) received 10 mL/kg distilled water. The second group served as positive control and received 17β-estradiol valerate (E2V) at the dose of 1 mg/kg BW/day. The four remaining groups were treated with *L. acida* ethanolic extract at the doses of 50, 100, 200, and 300 mg/kg BW. Animals were orally treated for 3 days; then vaginal smears were analyzed and animals were sacrificed by decapitation under light anesthesia (10 mg/kg BW diazepam and 50 mg/kg BW ketamine *i.p.*). Estrogen target organs (uterus, vagina, and mammary gland) were collected and fixed in 10% formaldehyde for histomorphological analysis. Prior to the fixation, wet uteri were trimmed of fat and weighed. As endpoints, the uterine wet weight, uterine protein and glycogen levels, uterine water content, and uterine and vaginal epithelial heights as well as mammary gland alveolar and ductal structures were assessed.

**2.4.3. The Postmenopausal-Rat Model of Osteoporosis.** Twenty-five rats were either sham operated (Sham) or bilaterally ovariectomized (OVX) using the dorsal approach. Seven days later, animals were further distributed in five different groups ( $n = 5$ ) and treated by gavage once daily (9:00–10:00 a.m.) for 84 consecutive days as follows: Sham and one OVX group received vehicle (distilled water), while the third group received 1 mg/kg of E2V. The two further groups received *L. acida* extract at the doses of 50 and 200 mg/kg BW. Animals were weighed weekly. Twenty-four hours after the last administration and following a 12 h of overnight fasting, animals were sacrificed under light anesthesia. Blood samples were taken and centrifuged at 3500 rpm (15 min at 4°C) to obtain serum samples which were kept at –15°C for the determination of alkaline phosphatase activity as well as inorganic phosphorus levels. The uterus, vagina, femur, tibia, third lumbar vertebrae (VL-3), mandible (the interradicular septum of the second molar) [28], liver, lungs, kidneys, stomach, adrenal, spleen, and heart were dissected out and cleaned of all soft tissues. Prior to immersion-fixation of organs in the 10% formaldehyde solution for histological analysis, they were weighted. Fresh bone (femur and tibia) volumes were measured using a plethysmometer and their density was calculated using the formula:  $\text{density} = \left[ \frac{\text{bone wet weight (kg)} \times 1000 (\text{kg/mm}^3)}{\text{volume of bone (mm}^3\text{)}} \right]$  as described by Lee et al. [29]. After measuring the above parameters, bones were dried at 200°C for 24 h and weighed again. Further, they were calcined and the ashes obtained

were dissolved in deionized water (0.5 g per 2 mL) and kept in  $-15^{\circ}\text{C}$  for the measurement of calcium and inorganic phosphorus content. The femur, VL-3, and mandible were successively fixed in 10% formalin for 1 week and decalcified in 10% nitric acid [30] for histological analysis.

**2.5. Cytological and Histological Analysis.** Vaginal smears were taken using an eyedropper containing 10 mL of NaCl 0.9%, placed on ringed slides, fixed in ethanol 95% for 30 min, and stained with a Papanicolaou method [31]. Cellular types were observed under a light microscope using 400 magnifications. To determine the histomorphological changes in mammary gland, uterus, vagina, femur, VL-3, mandibular bone, liver, lungs, and kidneys, paraffin-embedded organs were cut to  $5\ \mu\text{m}$  tissue sections and stained with hematoxylin and eosin. Stained sections were visualized and images captured using the complete Zeiss equipment consisting of a microscope Axioskop 40 connected to a computer where the images were transferred and analyzed with the MRGrab1.0 and Axio Vision 3.1 software, all provided by Zeiss (Hallbergmoos, Germany).

**2.6. Biochemical Analysis.** Total protein and glycogen levels in uteri were determined using the colorimetric method described by Gonal et al. [32] and Montgomery [33], respectively. The total calcium and inorganic phosphorus levels in bones were determined using reagent kits purchased from fortress Diagnostic (Muckamore, United Kingdom) and Human Gesellschaft (Germany). Serum alkaline phosphatase activity in serum was measured using reagent kits purchased from BIOLABO (Maizy, France).

For hematological analysis, white blood cell count, lymphocytes, monocytes, granulocytes, red blood cells (RBC) count, hematocrit (Ht), hemoglobin (Hb), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), and platelet count were evaluated using a Humacount 30<sup>TS</sup> Automated Hematology Analyzer from Human Diagnostics Worldwide (Wiesbaden, Germany).

**2.7. Statistical Analysis.** Results were presented as means  $\pm$  standard error of mean (SEM). *In vitro* experiments were performed in triplicate and repeated three times. All formulas and function were calculated with Microsoft Excel software. Data analysis was performed with GraphPad Prism 5.0 Software, using the ANOVA test followed by Dunnett's post hoc test. Differences were considered significant at a probability level of 5% ( $p < 0.05$ ).

### 3. Results

**3.1. Results of Phytochemical Analyses.** Preliminary phytochemical analysis showed that the ethanolic extract of stem bark of *L. acida* ethanolic possess phenols, flavonoids, saponins, tannins, and alkaloids. Quantitative phytochemical analysis of this extract revealed the quantity per g of dried extract of total phenols ( $786.75 \pm 82.33$ ), flavonoids ( $250.61 \pm 48.17$ ), and alkaloids ( $31.64 \pm 5.63$ ) (Table 1).

TABLE 1: Quantitative analyses of selected phytochemicals present in *L. acida* ethanolextract.

Number	Phytochemical class	Concentration in <i>L. acida</i> extract
1	Total phenols	$786.75 \pm 82.33$ mg eq quercetin
2	Flavonoids	$250.61 \pm 48.17$ mg eq quercetin
3	Alkaloids	$31.64 \pm 5.63$ mg eq berberine

Total phenols and flavonoids are expressed in mg eq quercetin/g of dried extract while alkaloids content is expressed in mg eq berberine/g of dried extract. Data are represented as mean  $\pm$  SEM of triplicates from at least three independent experiments.

#### 3.2. In Vitro Estrogenicity Assessment

**3.2.1. Cytotoxicity.** Ethanolic extract of *Lansea acida* did not induce cytotoxic effects in MCF-7 cells at tested concentrations (Figure 1(a)).

**3.2.2. E-Screen Assay.** Effects of *L. acida* ethanolic extract on MCF-7 cells proliferation are depicted in Figure 1(b). It can be observed that  $17\text{-}\beta$  estradiol benzoate (1 nM) and quercetin (10 nM) induced a significant ( $p < 0.001$ ) increase of MCF-7 cells yield. The *L. acida* ethanol extract induced a significant increase of MCF-7 cells yield at concentrations of 10 ( $p < 0.05$ ), 100 ( $p < 0.05$ ), and 200 ( $p < 0.01$ )  $\mu\text{g}/\text{mL}$  as compared to DMSO control. Further, a significant ( $p < 0.001$ ) and concentration-dependent antiestrogenic effect was noted with *L. acida* extract when administered with E2B.

#### 3.3. Results of the 3-Day Treatment with *L. acida*

**3.3.1. Effects on the Uterine Wet Weight and Uterine Content Parameters.** As shown in Table 2, the 3-day oral administration of *L. acida* extract induced a significant increase in uterine wet weight and uterine water content at all tested doses as compared to OVX group. Similarly, the uterine total protein and glycogen levels significantly increased at all the tested doses except at the dose of 300 mg/kg. The maximum increase was observed at the dose of 200 mg/kg BW; however, this increase remained much lower than in E2V-treated group.

**3.3.2. Effects on the Uterine Epithelium.** The 3-day treatment with the ethanolic extract of *L. acida* induced a significant ( $p < 0.05$ ) increase in uterine epithelial height only at dose of 200 mg/kg BW (from  $3.17 \pm 0.21$  to  $3.87 \pm 0.22\ \mu\text{m}$ ). However this increase remained much lower than that induced by E2V at the dose of 1 mg/kg BW, which showed a 3-fold ( $p < 0.001$ ) increase of uterine epithelial height (Figure 2(b)). The photomicrographs of uteri of OVX animals showed a low cuboidal epithelium, while in the E2V treated group, all structures are hypertrophic; the endometrium is lined by tall columnar cells with squamous metaplasia and atypic mitotic pattern surrounded by anaplastic epithelial nuclei (Figure 2(a)). Microphotographs of uteri of animals receiving *L. acida* ethanol extract at the dose of 200 mg/kg displayed an endometrium consisting of tall cuboidal single-layered epithelial cells with abundant mitotic figures and necrosis;

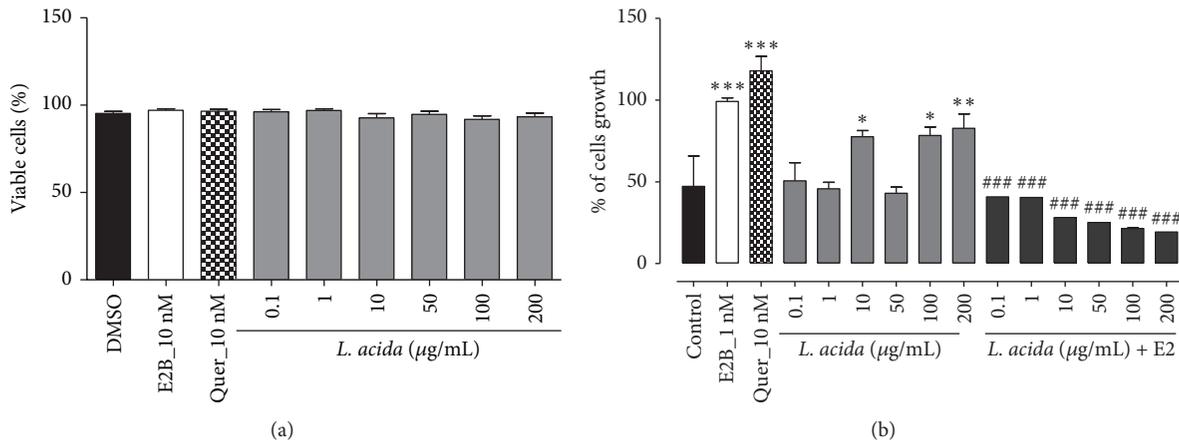


FIGURE 1: Effects of *L. acida* ethanol extract on MCF-7 cells proliferation viability (a) and growth (b). Its effect was investigated by measuring E-screen assay. The relative MCF-7 cells yields (PE) were measured in the presence of DMSO (0.01%), 17 $\beta$ -estradiol benzoate (E2B, 10 nM), quercetin (10 nM), and *L. acida* extract (from 0.1 to 200  $\mu$ g/mL). PE = max cell number of sample/cell number of DMSO control; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  as compared to the DMSO control. ###  $p < 0.001$  as compared to the E2B control.

TABLE 2: Effects of the ethanol extract of *Lannea acida* on uterus.

Groups	Uterine wet weight (mg/kg)	Water content in uterus WW/DW	Total protein levels in uterus (mg/mL)	Glycogen level in uterus (mg/mL)
OVX	298.75 $\pm$ 33.55	0.13 $\pm$ 0.014	0.1087 $\pm$ 0.0002	5.43 $\pm$ 0.11
E2V	2022.63 $\pm$ 91.81***	0.41 $\pm$ 0.058***	0.1114 $\pm$ 0.0003**	9.21 $\pm$ 0.21**
<i>Lannea acida</i> (mg/kg)				
50	507.64 $\pm$ 10.42**	0.20 $\pm$ 0.008*	0.1096 $\pm$ 0.0003*	6.71 $\pm$ 0.42*
100	424.73 $\pm$ 37.48*	0.31 $\pm$ 0.025**	0.1095 $\pm$ 0.0002*	7.3 $\pm$ 0.25*
200	553.38 $\pm$ 43.72**	0.29 $\pm$ 0.036**	0.1105 $\pm$ 0.0001**	6.9 $\pm$ 0.53*
300	424.69 $\pm$ 31.48*	0.23 $\pm$ 0.032*	0.1090 $\pm$ 0.0002	6.11 $\pm$ 0.3

OVX = ovariectomized animals that received the vehicle (distilled water); E2V = OVX animals treated with 1 mg/kg of 17 $\beta$ -estradiol valerate; *Lannea acida* = OVX animals treated with ethanol extract of *Lannea acida* at doses of 50, 100, 200, and 300 mg/kg BW. WW = wet weight; DW = dried weight. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ); \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$  as compared to the OVX group.

however, this effect is less than those observed in E2V-treated group.

**3.3.3. Effects on Vagina.** As depicted in Figure 3(a) vaginal smears of controls (OVX) had predominantly parabasal and polynuclear cells, corresponding to diestrus. On the other hand, smears of animals treated with E2V and *L. acida* extract at all tested doses suggest that they are in estrus, evidenced by the presence of superficial cells (Figure 3(a)). Furthermore, the microphotographs of vaginal epithelium of the control group (OVX) consist simply of the stratum germinativum (Ge) at the lowest level of approximately the thickness of three to seven cells. After the treatment with E2V (1 mg/kg), the vaginal epithelium became stratified characterized by the presence of stratum germinativum, stratum granulosum (Gg), and stratum corneum (Co) (Figure 3(b)). Following the *L. acida* extract treatment, the vaginal epithelium became hypertrophic and hyperplastic; however compared to E2V there are fewer cell layers and it failed to induce a cornification.

The graphical representation of the vaginal epithelial height (Figure 4) shows that E2V induced a 5-fold ( $p < 0.001$ ) increase of vaginal epithelial height. *L. acida* ethanolic

extract significantly ( $p < 0.01$ ) and in a bell shaped dose response manner increased vaginal epithelial height. The maximum 2.8-fold increment was obtained with the dose of 100 mg/kg BW (from  $3.03 \pm 0.04$  to  $8.6 \pm 0.92 \mu$ m) as compared to the OVX group.

**3.3.4. Effects on Mammary Glands.** Figure 5 presents sections of mammary glands. Ovariectomy induced an atrophy of mammary glands materialized in OVX-histological sections by a modest alveolar development, a small cluster of densely packed epithelial cells without luminal formation, the loss of the gland parenchyma (Tc), and the ductular and alveolar components, while adipocyte tissue (At) appears prominent. Mammary glands of E2V-treated group present well-formed acinar and luminal structures, an increase in proliferative activity compared to OVX group such as increase of the diameter and the lumen of alveoli, abundant eosinophil secretion (Se) in lumen of alveoli, and further compression of stromal fat. Similar changes were observed following a 3-day treatment with *L. acida* extract at all tested doses but only doses of 200 and 300 mg/kg BW presented an eosinophil secretion in their lumens.

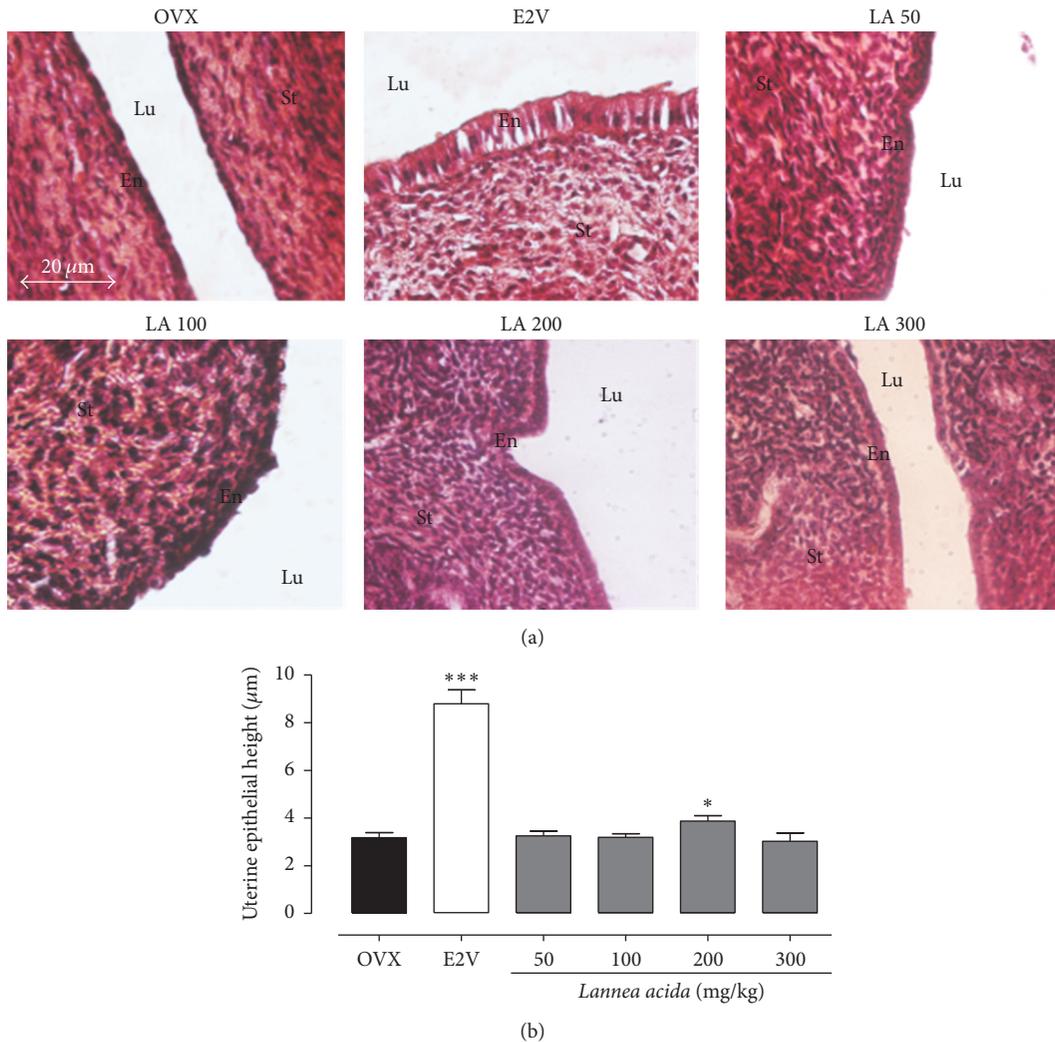


FIGURE 2: Effects of a 3-day treatment with *L. acida* ethanol extract on microphotographs (hematoxylin-eosin staining, 400x) (a) and graphical representation of uterine epithelial height (b). OVX = OVX animals treated with distilled water as vehicle; E2V = OVX animals treated with 17 $\beta$ -estradiol valerate at 1 mg/kg BW; *Lananea acida* = OVX animals treated with *L. acida* ethanol extract at doses of 50, 100, 200, and 300 mg/kg BW. \*  $p < 0.05$  and \*\*\*  $p < 0.001$  as compared with OVX control. Lu: uterine lumen; En: endometrium; St: stroma.

TABLE 3: Effects of the ethanol extract of *Lananea acida* on estrogen target organs in postmenopausal-rat model after 12 weeks of treatment.

Items	Sham	OVX	Ovariectomized rats		
			E2V	<i>Lananea acida</i> (mg/kg BW)	
				50	200
Uterine wet weight (mg/kg)	1761.34 $\pm$ 174.20	248.03 $\pm$ 19.56 <sup>###</sup>	1970.98 $\pm$ 203.67 <sup>**</sup>	226.36 $\pm$ 16.22	277.37 $\pm$ 17.63
Uterine epithelial height (μm)	9.88 $\pm$ 0.29	2.02 $\pm$ 0.06 <sup>###</sup>	10.05 $\pm$ 1.29 <sup>**</sup>	5.79 $\pm$ 1.75 <sup>*</sup>	2.79 $\pm$ 0.19
Vaginal epithelial height (μm)	21.83 $\pm$ 1.82	4.20 $\pm$ 0.29 <sup>###</sup>	46.01 $\pm$ 0.85 <sup>**</sup>	5.98 $\pm$ 0.29	6.38 $\pm$ 0.35

Sham (sham operated) and OVX (ovariectomized) animals received the vehicle (distilled water); E2V = OVX animals treated with 1 mg/kg of 17 $\beta$ -estradiol valerate; *Lananea acida* = OVX animals treated with ethanol extract of *Lananea acida* at doses of 50 and 200 mg/kg BW. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ); \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$  as compared to the OVX group. <sup>###</sup>  $p < 0.001$  as compared to the Sham group.

### 3.4. Results of the 84-Day Treatment with *L. acida*

**3.4.1. Effects on Estrogen Target Organs.** As depicted in Table 3, bilaterally oophorectomy significantly ( $p < 0.001$ ) decreased the uterine wet weight (610.13%) and uterine (388.57%) and vaginal (419.4%) epithelial height as compared

to the Sham operated group. Following E2V treatment, the uterine wet weight (694.65%) and the uterine (397.39%) and vaginal (419.4%) epithelial height increased as compared to OVX group. *L. acida* extract induced a slight but significant ( $p < 0.05$ ) increase of uterine epithelial height at the dose of 50 mg/kg BW (30.82%) compared to OVX control.

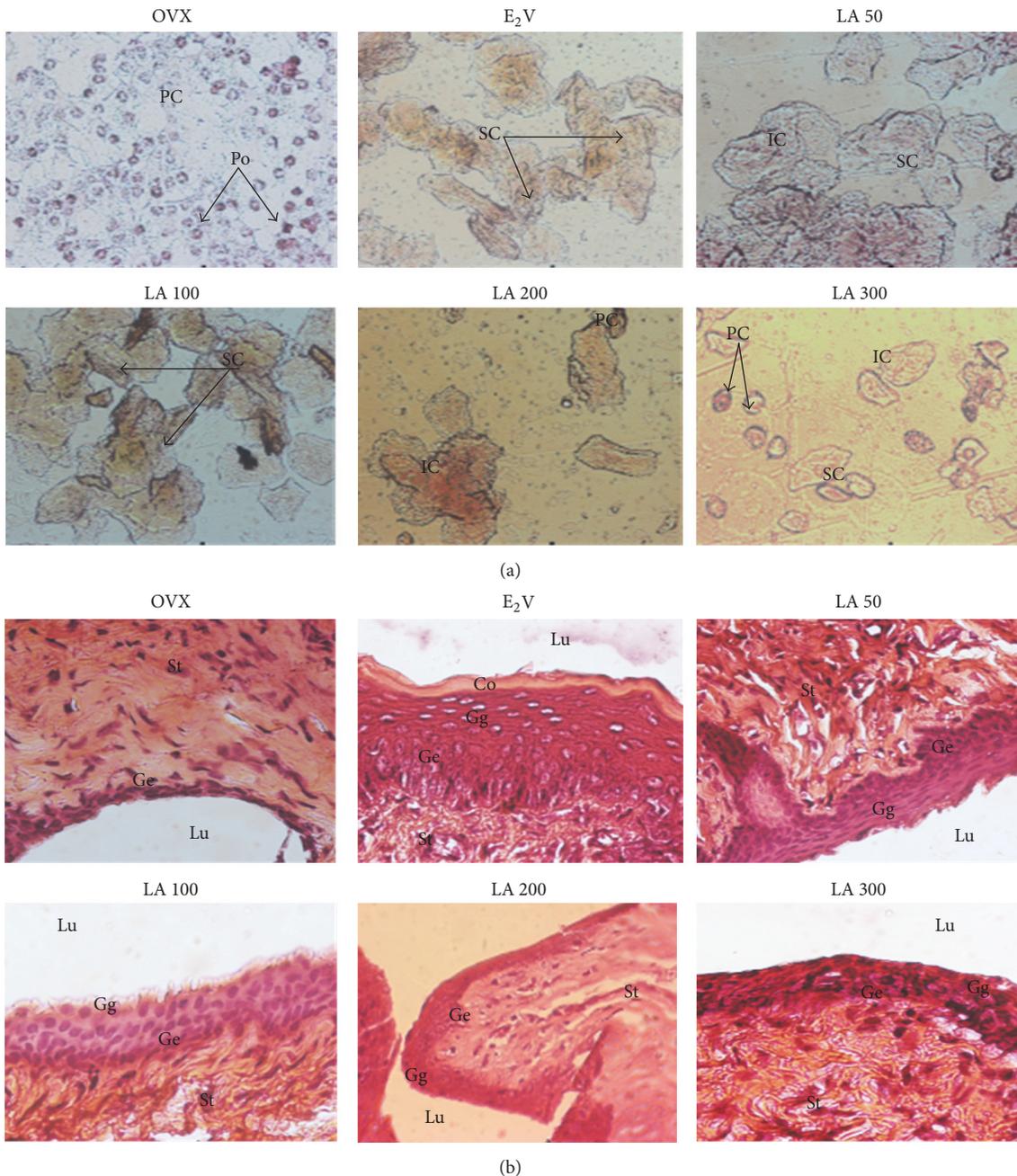


FIGURE 3: Effects of a 3-day treatment with *L. acida* ethanol extract on the vaginal epithelium: smear (Papanicolaou staining, 400x) (a) and microphotographs (hematoxylin-eosin staining, 400x). OVX = OVX animals treated with distilled water as the vehicle; E<sub>2</sub>V = OVX animals treated with 17 $\beta$ -estradiol valerate at 1 mg/kg BW; *Lannea acida* = OVX animals treated with *L. acida* ethanol extract at doses of 50, 100, 200, and 300 mg/kg BW. Po = polynuclear cells, PC = parabasal cells, IC = intermediate cells, SP = superficial cells, Lv = vaginal lumen, Co = stratum corneum, Gg = stratum granulosum, Ge = stratum germinativum, and St: stroma.

**3.4.2. Effects on Bone Weight and Density.** As shown in Figure 6 ovariectomy induced a significant decrease in femur ( $p < 0.05$ ) and tibia ( $p < 0.001$ ) wet weight (Figures 6(a) and 6(b)) and a significant ( $p < 0.05$ ) decrease of dried femur and tibia weight as well as the femur (33.78%,  $p < 0.01$ ) and tibia (38.83%,  $p < 0.001$ ) densities as compared to sham operated rats. E<sub>2</sub>V and *L. acida* extract at the dose of 200 mg/kg induced a significant ( $p < 0.05$ ) increase of femur

and tibia wet and dried weights as compared to OVX group. Furthermore, significant ( $p < 0.05$ ) increases of femur and tibia densities were also observed following administration of E<sub>2</sub>V and *L. acida* extract at the dose of 200 mg/kg as compared to OVX (Figures 6(e) and 6(f)).

**3.4.3. Effects on Body and Organ Weights.** After 84 days of treatment period, a significant ( $p < 0.05$ ) increase of body

TABLE 4: Effects of *L. acida* ethanol extract on body weight and relative organ weights after 12 weeks of treatment in postmenopausal-rat model.

Items	Sham	OVX	Ovariectomized rats		
			E2V	<i>Lannea acida</i> (mg/kg BW)	
				50	200
<i>Body weight (g)</i>					
Initial	155.80 ± 5.67	145.80 ± 2.75	147.00 ± 4.49	153.60 ± 4.43	146.10 ± 5.23
Final	182.10 ± 8.51	203.10 ± 3.22 <sup>#</sup>	185.17 ± 5.13	199.74 ± 6.17 <sup>#</sup>	183.14 ± 7.79
<i>Organ weights (mg/kg)</i>					
Liver	32283.86 ± 845.01	30918.79 ± 701.81	31590.70 ± 948.29	31055.44 ± 905.08	28137.84 ± 1924.21
Lungs	7648.59 ± 166.14	8525.59 ± 243.24	7834.56 ± 374.67	8799.39 ± 472.94	11380.12 ± 1053.63 <sup>**</sup>
Kidneys	5013.12 ± 107.64	5127.95 ± 59.69	5366.69 ± 284.57	5105.20 ± 171.53	5989.34 ± 275.03 <sup>*</sup>
Stomach	10569.99 ± 277.86	11892.14 ± 761.88	12379.29 ± 848.28	12554.57 ± 1102.40	13042.20 ± 1229.32
Spleen	3442.94 ± 82.54	3196.14 ± 67.20	3526.94 ± 324.13	3626.61 ± 135.77	3618.77 ± 166.85
Adrenals	392.17 ± 147.31	211.02 ± 27.70	221.09 ± 24.89	213.17 ± 5.20	197.70 ± 11.40
Heart	3119.72 ± 24.16	3432.90 ± 120.48	3194.82 ± 151.18	3475.69 ± 166.82	3527.98 ± 36.96

Sham (sham operated) and OVX (ovariectomized) animals received the vehicle (distilled water); E2V = OVX animals treated with 1 mg/kg of 17 $\beta$ -estradiol valerate; *Lannea acida* = OVX animals treated with ethanol extract of *Lannea acida* at doses of 50 and 200 mg/kg BW. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ); \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$  as compared to the OVX group. <sup>#</sup>  $p < 0.01$ , initial body weight compared to the final one.

TABLE 5: Effects of *Lannea acida* ethanol extract after 12 weeks of oral treatment in some biomarkers of osteoporosis.

Items	Sham	OVX	Ovariectomized rats		
			E2V	<i>Lannea acida</i> (mg/kg BW)	
				50	200
<i>Alkaline phosphatase (UI/L)</i>	5.03 ± 0.456	8.72 ± 0.618 <sup>***</sup>	6.86 ± 0.377 <sup>*</sup>	5.63 ± 0.096 <sup>***</sup>	7.56 ± 0.330
<i>Calcium (mmol/L)</i>					
Tibia	0.045 ± 0.007	0.028 ± 0.003	0.050 ± 0.011	0.038 ± 0.004	0.028 ± 0.005
Femur	0.03 ± 0.004	0.028 ± 0.002	0.025 ± 0.006	0.032 ± 0.002	0.043 ± 0.005 <sup>*</sup>
<i>Inorganic phosphorus (mmol/L)</i>					
Tibia	7.24 ± 0.622	2.88 ± 0.122 <sup>***</sup>	3.99 ± 0.347	3.23 ± 0.756	4.64 ± 0.344 <sup>*</sup>
Femur	3.99 ± 0.540	2.85 ± 0.384	4.93 ± 0.697 <sup>*</sup>	2.72 ± 0.182	4.30 ± 0.482 <sup>*</sup>

Sham (sham operated) and OVX (ovariectomized) animals received the vehicle (distilled water); E2V = OVX animals treated with 1 mg/kg of estradiol valerate; *Lannea acida* = OVX animals treated with ethanol extract of *Lannea acida* at doses of 50 and 200 mg/kg BW. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ); \*  $p < 0.05$  and \*\*\*  $p < 0.001$  as compared to the OVX group.

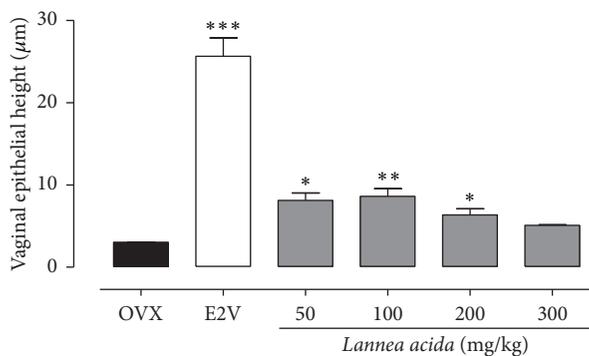


FIGURE 4: Effects of a 3-day treatment with *L. acida* ethanol extract on the vaginal epithelial height. OVX = OVX animals treated with distilled water as the vehicle; E2V = OVX animals treated with 17 $\beta$ -estradiol valerate at 1 mg/kg BW; *Lannea acida* = OVX animals treated with *L. acida* ethanol extract at doses of 50, 100, 200, and 300 mg/kg BW. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$  as compared with OVX control.

weight was observed in OVX and *L. acida* extract (50 mg/kg) groups (Table 4). The E2V and *L. acida* extract at the dose of 200 mg/kg treatments prevented this body weight increase.

The different treatments did not induce change in the organ wet weights, except the relative weights of lungs and kidneys that increased following the 84-day treatment with *L. acida* extract at the dose of 200 mg/kg.

**3.4.4. Biochemical Bone Parameters.** Table 5 shows the effects of *L. acida* extract or E2V treatment on serum and bone biochemical parameters. Ovariectomized rats showed a significant increase (42.29%;  $p < 0.001$ ) in the serum alkaline phosphatase (ALP) activity as compared to Sham rats. E2V treatment significantly decreased (21.29%,  $p < 0.05$ ) the ALP activity as compared to the OVX controls. The *L. acida* ethanol extract induced a similar effect by decreasing ALP activity at all tested doses, although being only significant at the dose of 50 mg/kg BW/day (31.49%,  $p < 0.001$ ).

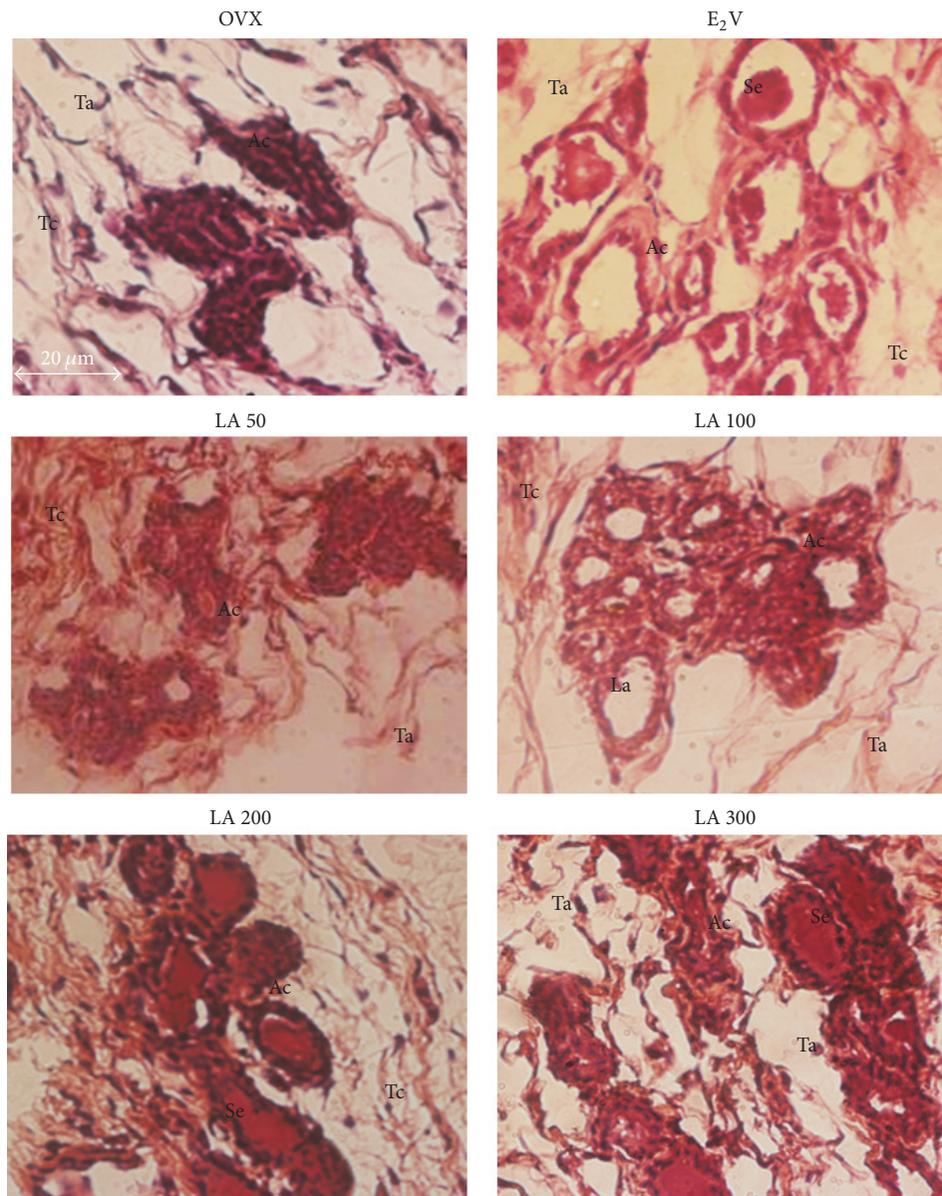


FIGURE 5: Effects of a 3-day treatment with *L. acida* ethanol extract on mammary glands: microphotographs of hematoxylin-eosin staining (400x). OVX = OVX animals treated with distilled water as the vehicle; E2V = OVX animals treated with  $17\beta$ -estradiol valerate at 1 mg/kg BW; LA = OVX animals treated with *L. acida* ethanol extract at doses of 50, 100, 200, and 300 mg/kg BW. La = lumen of alveoli; Ep = alveoli epithelium; At = adipose tissue; Se = eosinophil secretion.

Concerning calcium levels in tibia and femur, no significant changes were observed between OVX, Sham, and E2V groups. However, a significant ( $p < 0.05$ ) increase in the calcium level was observed in rats treated with *L. acida* 200 mg/kg as compared to OVX control.

Regarding inorganic phosphorus (IP) levels in tibia and femur ashes, a decrease of IP in tibia ( $p < 0.001$ ) and femur (nonsignificant) was observed in OVX rats as compared to sham operated controls. E2V treatment significantly (73.03%,  $p < 0.05$ ) increased IP in femur compared to OVX controls. Treatment with *L. acida* extract increased ( $p < 0.05$ ) IP levels in femur (50.86%) and in tibia (61.27%) ashes at the dose of 200 mg/kg.

**3.4.5. Effects on the Hematological Parameters.** Lymphocytes, red blood cell count, and hemoglobin level as well as hematocrit increased in ovariectomized rats as compared to sham operated rats after 84 days of experimentation although these values remain in the normal ranges (Table 6). The E2V-treatment prevented this blood cell increment, although being significant only in the hematocrit parameter. *L. acida* extract also protected rat against the ovariectomy-induced increase in blood cells, evidenced by a significant reduction of lymphocytes, granulocyte, hemoglobin level, and hematocrit.

**3.4.6. Effects on the Microarchitecture of Some Organs.** No alterations in the microarchitecture of liver, lungs, and

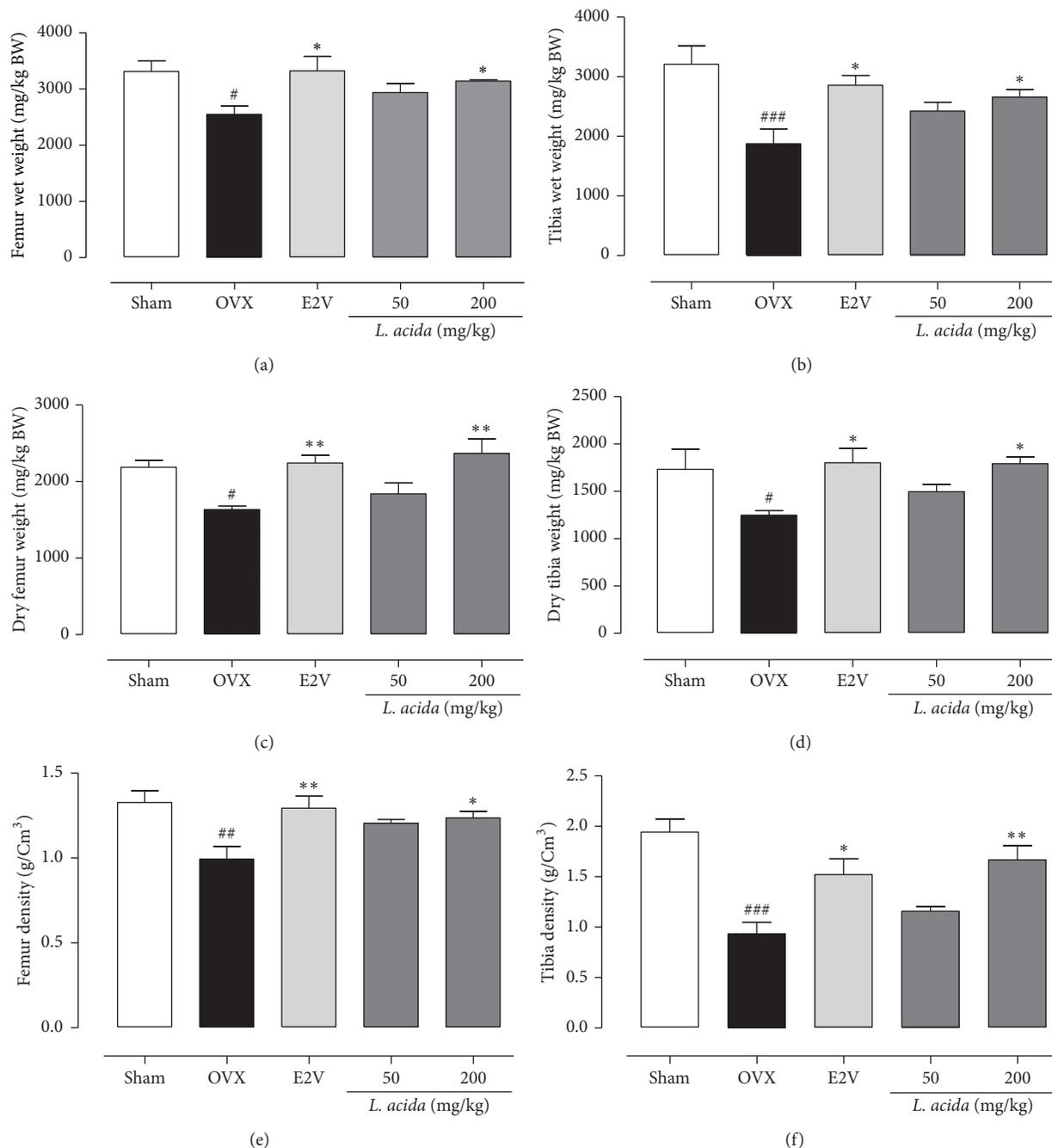


FIGURE 6: Protective effects of *L. acida* ethanol extract on bone loss: in both femur and tibia wet weight ((a) and (b)), dried weight ((c) and (d)), and density ((e) and (f)). Sham (sham operated) and OVX (ovariectomized) animals received the vehicle (distilled water). E2V = OVX animals treated with 1 mg/kg of  $17\beta$ -estradiol valerate; *Lannea acida* = OVX animals treated with ethanol extract of *Lannea acida* at doses of 50 and 200 mg/kg BW. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  compared with control; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , and ### $p < 0.001$  compared with Sham.

kidneys were noted in this work (Figure 7). However, the femur, tibia, VL-3, and mandible microarchitectures of OVX rats showed bone marrow disparities into the trabecular network (Figure 8). E2V and *L. acida* ethanol extract (200 mg/kg) treatments prevented bone resorption, evidenced by the inhibition of bone marrow loss into the trabecular network.

#### 4. Discussion

The present work aimed to investigate the estrogenic and bone loss preventive effects of the ethanol extract of *Lannea acida*, a plant used in the Cameroonian traditional system to treat many ailments including gynaecological problems and rheumatism. To evaluate the *in vitro* estrogenic effect of *L.*

TABLE 6: Effects of *Lannea acida* ethanol extract on hematological parameters after 11 weeks of treatment in postmenopausal-rat model.

Items	Normal ranges	Ovariectomized rats				
		Sham	OVX	E2V	<i>Lannea acida</i> (mg/kg BW)	
					50	200
WBC ( $10^3/\mu\text{L}$ )	5–16	4.02 ± 0.42	4.00 ± 0.21	5.62 ± 0.80	2.48 ± 0.14	5.58 ± 0.54
Lymphocytes (%)	65–85	74.42 ± 1.77	83.06 ± 0.46**	82.6 ± 1.59	85.46 ± 1.148	73.8 ± 2.46**
Monocytes (%)	0–20	13.52 ± 2.14	10.1 ± 0.33	10.86 ± 0.98	9.05 ± 0.74	11.82 ± 0.99
Granulocytes (%)	0–27	10.15 ± 1.58	7.76 ± 0.83	10.32 ± 1.42	5.5 ± 0.55	13.7 ± 1.69*
RBC ( $10^6/\mu\text{L}$ )	5–10	3.65 ± 0.83	7.41 ± 0.18**	4.97 ± 0.85	4.99 ± 0.99	6.24 ± 0.28
Hematocrit (%)	32–53	25.56 ± 2.99	41.72 ± 1.09**	31.93 ± 3.02**	31.60 ± 1.92**	33.48 ± 1.30*
Hemoglobin (g/dL)	12–18	10.48 ± 0.57	14.6 ± 0.54*	13.32 ± 0.09	9.56 ± 1.70**	11.40 ± 0.44
MCV (fL)	52–60	67.80 ± 5.94	56.80 ± 0.58	70.20 ± 7.27	54.2 ± 0.66	68.20 ± 11.84
MCH (pg)	17–29	36.38 ± 8.40	19.62 ± 0.38	32.80 ± 7.35	20.20 ± 1.03	39.92 ± 16.96
MCHC (g/dL)	32–45	50.45 ± 7.21	34.90 ± 0.58	44.00 ± 4.94	37.20 ± 1.60	48.68 ± 11.32
Platelets ( $10^3/\mu\text{L}$ )	200–1100	343.00 ± 42.97	338.8 ± 26.36	485.00 ± 53.95	241.20 ± 45.33	483.00 ± 17.68

Sham (sham operated) and OVX (ovariectomized) animals received the vehicle (distilled water); E2V = OVX animals treated with 1 mg/kg of 17 $\beta$ -estradiol valerate; *Lannea acida* = OVX animals treated with ethanol extract of *Lannea acida* at doses of 50 and 200 mg/kg BW. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ); \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  as compared to the OVX group.

*acida*, a suitable biological screening described by Soto et al. [34] and reported in our previous study [24] has been used. The basic principle of this assay is to compare the MCF-7 cells yield following treatment with tested substances with those obtained after estradiol treatment. In this study, the *L. acida* ethanol extract induced a significant increase of MCF-7 cells proliferation at concentrations of 10, 100, and 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  as compared to DMSO control. The MCF-7 cells proliferation is known as a hallmark of estrogenicity [34], suggesting that *L. acida* have phytoconstituents that mimic estrogenic effects. Indeed, Resende et al. [26] reported that a relative proliferative effect (RPE)  $\geq 80\%$  corresponds to a possible agonistic activity to ER $\alpha$ . *L. acida* induced a RPE  $> 80\%$  at the concentration of 100 and 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Consequently, flavonols detected in *L. acida* ethanol extract might bind ERs and induced cell proliferation. However, this effect could also be an ER-independent effect, due to the fact that MCF-7 cells express ERs, aromatase, and 5  $\alpha$ -reductase enzymes, which permit it to elicit estrogenic response involving both genomic and nongenomic pathways [25]. Although an ER binding assay was not assessed in this study, we can hypothesize that flavonoids reported in *L. acida* could be responsible for the MCF-7 cells proliferation and are potential phytoestrogens. In fact, 4 flavonoids, named as 6,7-(2'',2''-dimethyl chromeno)-8- $\gamma$ , $\gamma$ -dimethyl allyl flavanone, 3',4'-dihydroxy-7,8 (2'',2''-dimethyl chromeno)-6- $\gamma$ , $\gamma$ -dimethyl allyl flavonol, 7-methyltectorigenin, and irisolidone, have been isolated from barks of the acetone extract of *Lannea acida* [18]. Irisolidone and tectorigenin (an analogue of 7-methyltectorigenin resulting from the hydrolyzing by intestinal bacteria) have been reported to exhibit estrogenic effects in E-screen assay, as they have induced MCF-7 cells proliferation at concentrations of 0.1, 1, and 10  $\mu\text{M}$  [35]. Therefore they could at least partly account for the proliferative activity of *L. acida* on MCF-7 cells observed in this study. Moreover, the concomitant administration of *L. acida* extract with estradiol leads to the decrease of the MCF-7 cells

proliferation, suggesting that some of the phytoconstituents of *L. acida* entered in competition with E2V for ERs. The phytoestrogens are well known to bind ERs with  $\sim 1000$  times lower affinity than estradiol [36].

Numerous studies showed that estrogen deficiency is accompanied with a marked atrophy of estrogen target organs such as uterus, vagina, and mammary glands [23, 24, 37, 38]. The same observation was done in this study; ovariectomy significantly reduced vaginal epithelium to one cell layer: the stratum germinativum. The uterine wet weight as well as uterine and vaginal epithelial heights decreased dramatically after ovariectomy. As expected, estradiol induced a significant increase in the uterine wet weight and in uterine and vaginal epithelial heights after a 12-week treatment. The uterotrophic effects of estrogen have been attributed to water imbibition or endometrial cells proliferation [39, 40]. These effects have been reported to be mediated via ER $\alpha$  as demonstrated by the lack of uterine stimulation and mitotic growth responses in  $\alpha$ ERKO mice [41]. *Lannea acida* ethanol extract induced an estrogen-like effect, evidenced by a significant increase in the uterine wet weight and uterine and vaginal epithelial heights at all tested doses (except with the dose of 300 mg/kg in some parameters) in the 3-day uterotrophic test. These results are in line with the *in vitro* results obtained in this study and strengthen our hypothesis that the flavonoids detected in *L. acida* could bind ERs and trigger the genomic mechanism that produces estrogen-like effects. Interestingly, the 12-week treatment of ovariectomized rats with *L. acida* extract did not exhibit estrogenic effect, a part of a slight increase of the uterine epithelial height observed with the dose of 50 mg/kg, indicating that the estrogen-like effects of *L. acida* extract are time-dependent. These types of effects are specific to phytoestrogens. Indeed, flavonoids are well known phytoestrogens with mixed effects [23, 24, 38, 42].

The postmenopausal-rat model of osteoporosis has been used for decade to characterize natural substances. It shares many characteristics of postmenopausal women bone loss

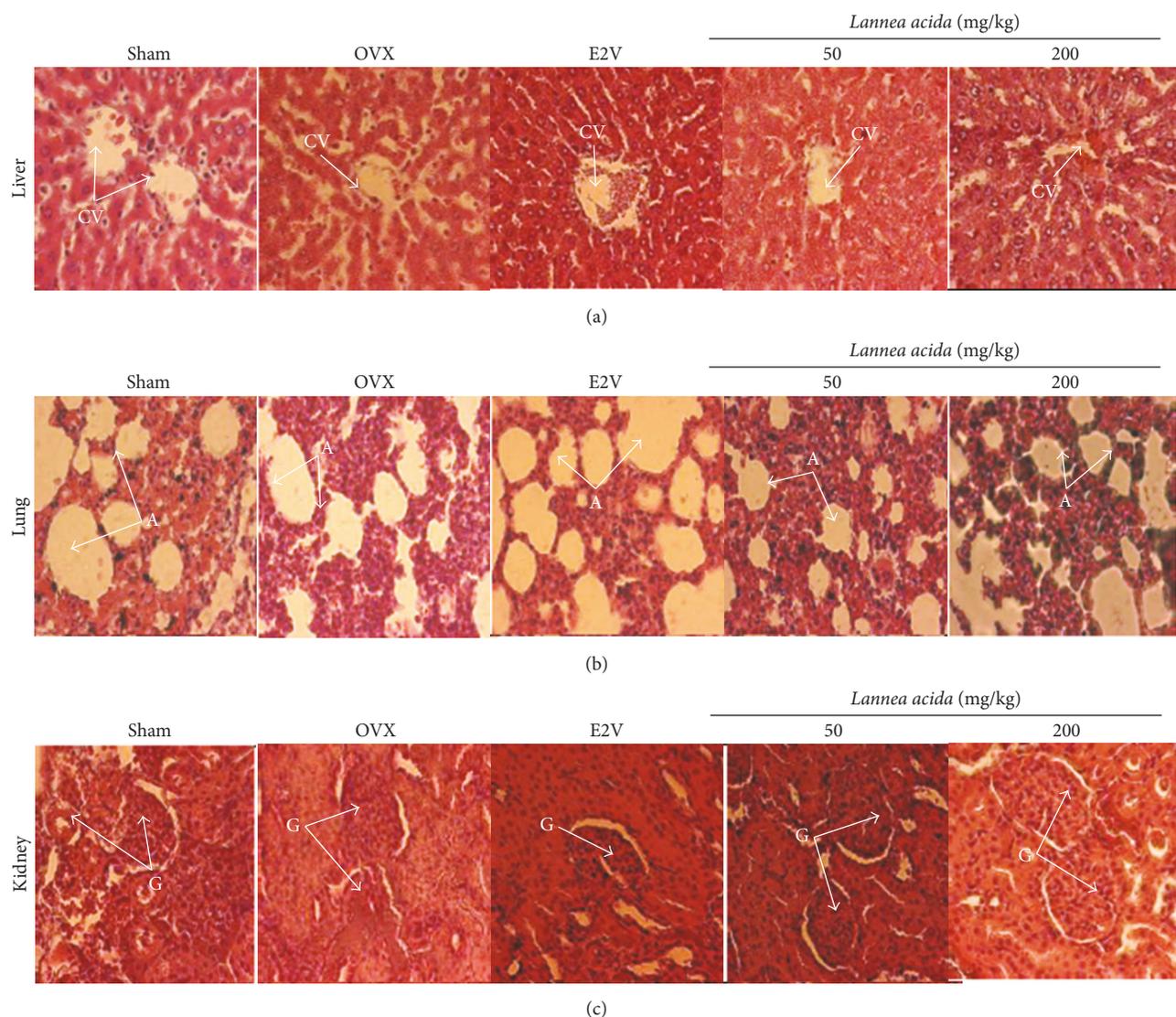


FIGURE 7: Effects of 11 weeks of treatment with ethanol extract of *Lannea acida* (LA) or E2V on liver (a), lung (b), and kidney (c) of sham operated or ovariectomized rats. Sham (sham operated) and OVX (ovariectomized) animals received the vehicle (distilled water). E2V = OVX animals treated with 1 mg/kg of 17 $\beta$ -estradiol valerate; *Lannea acida* = OVX animals treated with ethanol extract of *Lannea acida* at doses of 50 and 200 mg/kg BW. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). CV = central vein, A = alveoli; G = glomeruli.

and therefore it is a suitable model for postmenopausal osteoporosis [43–45]. Following the 12 weeks of administration period, the body weight of ovariectomized rats significantly increased as compared to other groups. This result corroborates previous observations [45, 46] and could be explained by an increase in adipose deposition. E2V (1 mg/kg) and *L. acida* extract at the optimal dose of 200 mg/kg prevented this body weight gain, probably by mechanisms involving ERs [47]. In fact, estrogen is known to reverse ovariectomy-induced body weight gain. Furthermore, ovariectomy induced a significant decrease of tibia and femur (weight and dried) weights as well as tibia and femur densities. Moreover, a significant decrease in inorganic phosphate level in tibia and a significant increase of

serum alkaline phosphatase activity were noted. All these events suggest that ovariectomy enhanced the rate of bone turnover and the experimental osteoporosis was set up in rats. Indeed, the alkaline phosphatase activity is a biomarker of osteoblastic activity associated with bone formation [48]. It is found to increase in osteoporosis and other bone metabolic disorders [41]. Treatment with E2V and *L. acida* extract at the dose of 200 mg/kg increased bone (tibia and femur) wet and dried weights as well as bone densities. In addition, these treatments decreased the serum alkaline phosphatase activity and increase the bone inorganic phosphorus content. The aforesaid results suggest that *L. acida* extract reduced bone turnover. The potential preventive effects of estrogen and estrogen-like substances on bone loss have been attributed

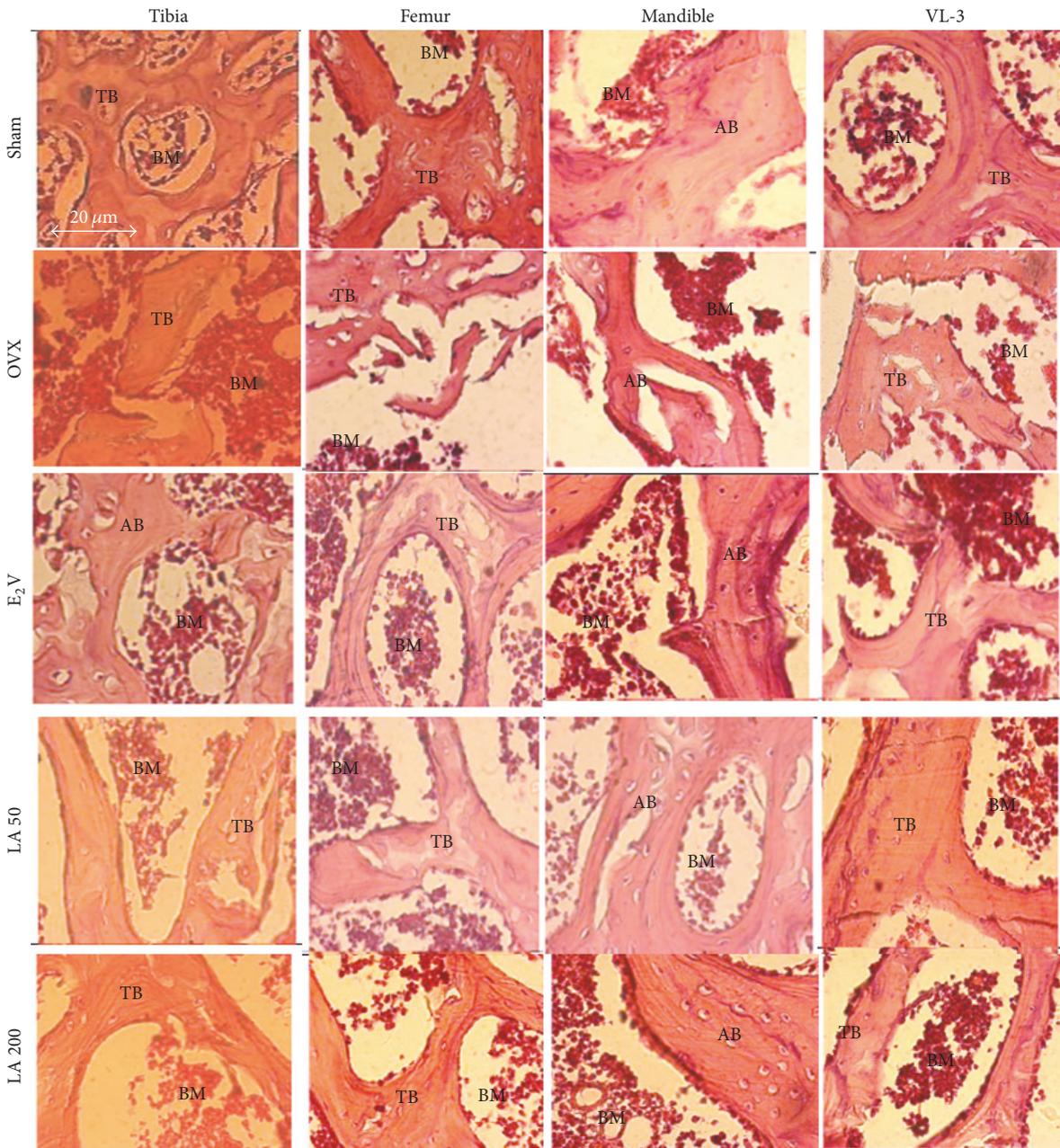


FIGURE 8: Protective effects of *L. acida* ethanol extract on histomorphologic (100x magnification) of tibia, femur, VL-3, and mandible. Sham (sham operated) and OVX (ovariectomized) animals received the vehicle (distilled water). E<sub>2</sub>V = OVX animals treated with 1 mg/kg of estradiol valerate; *Lannea acida* = OVX animals treated with ethanol extract of *Lannea acida* at doses of 50 and 200 mg/kg BW. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). TB = trabecular bone; AB = alveolar bone; and BM = marrow bone.

to their ability to bind ERs on the osteoclast cells and to provoke release of chemical mediators and reduction of the osteoclastic activity [49].

Bone histomorphometry is a technique often used to provide information about bone weight gain or loss in untreated and treated diseases [28, 45, 46, 50]. These studies have showed that ovariectomy resulted in increased bone turnover with resorption exceeding formation. This imbalance is known to lead to progressive loss in bone mass and eventually

osteoporosis [51]. In accordance with this, our results showed that ovariectomy induced microarchitectural alterations of all the studied bones (VL-3, mandible, femur, and tibia). However, treatments with E<sub>2</sub>V and *Lannea acida* extract improved the bone tissue microarchitecture, restoring both cortical and compact bone structure. The same results were observed by Njamen et al. [52] and Zingue et al. [45]. The flavonoids/isoflavonoids of *Lannea acida* could account for this beneficial effect on bone since phytoestrogens have been

reported to play an important role in the bone formation through the activation of the ER $\beta$  localized on osteoblast cells [53].

## 5. Conclusion

The ethanol extract of *Lannea acida* possesses *in vitro* and *in vivo* estrogenic effects, materialized by the proliferation of MCF-7 cells and the increase in uterine wet weight and uterine and vaginal epithelial heights. Results also suggest that long-term (3 months) treatment with *L. acida* extract could prevent estrogen decline-related bone mass loss, microarchitecture alterations, and demineralization. The dose of 200 mg/kg BW/day was the optimal dose. Taken altogether, this finding provides the evidence that *L. acida* is a potential alternative for the prevention of postmenopausal osteoporosis which occurs as a consequence of estrogen decline at menopause. In-depth phytochemical investigations are needed to isolate the active principles of *L. acida* and understand the precise mechanism by which it induced estrogenic effect.

## Abbreviations

E2V:	Estradiol valerate
ER:	Estrogen receptor
ER $\alpha$ :	Estrogen receptor alpha
ER $\beta$ :	Estrogen receptor beta
EtOH:	Ethanol
FBS:	Fetal bovine serum
HEPES:	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid
CNH:	Cameroon National Herbarium
RPMI:	Roswell Park Memorial Institute
SERM:	Selective estrogen receptor modulators
SEM:	Standard error of mean
SRB:	Sulforhodamine-B
OVX:	Bilaterally ovariectomized rats.

## Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

## Acknowledgments

The authors are really grateful to the German Academic Exchange Service (DAAD) and the Alexander von Humboldt Foundation for support. The authors would also kindly thank Professor Tânia Beatriz Creczynski-Pasa (Federal University of Santa Catarina) for the collaboration.

## References

- [1] M.-A. Arevalo, I. Azcoitia, and L. M. Garcia-Segura, "The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 16, no. 1, pp. 17–29, 2015.
- [2] P. Pothiwala, E. M. Evans, and K. M. Chapman-Novakofski, "Ethnic variation in risk for osteoporosis among women: A review of biological and behavioral factors," *Journal of Women's Health*, vol. 15, no. 6, pp. 709–719, 2006.
- [3] S. H. Tella and J. C. Gallagher, "Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis," *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 142, pp. 155–170, 2014.
- [4] S. M. Hazavehei, M. H. Taghdisi, and M. Saidi, "Application of the Health Belief Model for osteoporosis prevention among middle school girl students, Garmsar, Iran.," *Education for Health (Abingdon)*, vol. 20, no. 1, p. 23, 2007.
- [5] P. Pisani, M. D. Renna, F. Conversano et al., "Major osteoporotic fragility fractures: Risk factor updates and societal impact," *World Journal of Orthopedics*, vol. 7, no. 3, pp. 171–181, 2016.
- [6] International Osteoporosis Foundation, "The Middle East & Africa Regional Audit: Epidemiology, costs & burden of osteoporosis in 2011," 2011, <https://www.iofbonehealth.org/middle-east-africa-audit>.
- [7] C. Cooper, G. Campion, and L. J. Melton III, "Hip fractures in the elderly: a world-wide projection," *Osteoporosis International*, vol. 2, no. 6, pp. 285–289, 1992.
- [8] R. M. D. Zebaze and E. Seeman, "Epidemiology of hip and wrist fractures in Cameroon, Africa," *Osteoporosis International*, vol. 14, no. 4, pp. 301–305, 2003.
- [9] G. A. Greendale, B. A. Reboussin, P. Hogan et al., "Symptom relief and side effects of postmenopausal hormones: Results from the postmenopausal estrogen/progestin interventions trial," *Obstetrics & Gynecology*, vol. 92, no. 6, pp. 982–988, 1998.
- [10] K. C. Nichols, L. Schenkel, and H. Benson, "17 $\beta$ -Estradiol For Postmenopausal Estrogen Replacement Therapy," *Obstetrical & Gynecological Survey*, vol. 39, no. 4, pp. 230–245, 1984.
- [11] S. Pozzi, R. Marcheselli, S. Sacchi et al., "Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: A review of 35 cases and an evaluation of its frequency in multiple myeloma patients," *Leukemia & Lymphoma*, vol. 48, no. 1, pp. 56–64, 2007.
- [12] J. E. Rossouw, G. L. Anderson, R. L. Prentice et al., "Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results from the women's health initiative randomized controlled trial," *Journal of the American Medical Association*, vol. 288, no. 3, pp. 321–333, 2002.
- [13] Million Women Study Collaborators, "Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study," *The Lancet*, vol. 362, no. 9382, pp. 419–427, 2003.
- [14] L. S. Gill, *Ethno-Medicine Uses of Plant in Nigeria*, Bieger N: Bee-keeping and Community Forest Management, 276, University of Benin Press, Nigeria, 1992.
- [15] H. Ellenberg, H. E. Weber, R. Düll, V. Wirth, W. Werner, and D. Paulissen, *Pirrang: Ecological Investigation in Forest Island in the Gambia*, vol. 2, pp. 23–456, Gambian Press, 1998.
- [16] M. Arbonnier, "Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest," pp. 396–416, 2009, Editions Quæ RD 10; F- 78026 Versailles Cedex, France; ISBN Quæ 978-2-7592-0313-0; Muséum National d'histoire Naturelle (MNHN); Service des publications scientifiques, 57 Rue Cuvier, F- 75005, Paris, France; ISBN MNHN 978-2-85653-626-1.
- [17] M. K. Ahmed, M. A. Mabrouk, J. A. Anuka et al., "Studies of the effect of methanolic stem bark extract of *Lannea acida* on fertility and testosterone in male wistar rats," *Journal of Medical Sciences*, vol. 7, no. 6–7, 2010.
- [18] H. M. H. Muhaisen, "Chemical constituents from the bark of *Lannea acida* rich (anacardiaceae)," *Scholars Research Library*, vol. 5, no. 5, pp. 88–96, 2013.

- [19] A. Odebiyi and A. E. Sofowora, "Phytochemical screening of Nigerian medical plants part II," *Lloydia*, vol. 41, pp. 234–246, 1978.
- [20] V. L. Singleton and J. A. Rossi, "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents," *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 37, pp. 144–158, 1965.
- [21] J. Zhishen, T. Mengcheng, and W. Jianming, "The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals," *Food Chemistry*, vol. 64, no. 4, pp. 555–559, 1999.
- [22] S. Fazel, M. Hamidreza, G. Rouhollah, and V. Mohammadreza, "Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants," *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 32, pp. 17–20, 2008.
- [23] S. Zingue, T. Michel, C. B. Magne Nde et al., "Estrogen-like and tissue-selective effects of 7-methoxycoumarin from *Ficus umbellata* (Moraceae): an in vitro and in vivo study," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 17, no. 1, 383 pages, 2017.
- [24] S. Zingue, J. Tchoumtchoua, D. M. Ntsa et al., "Estrogenic and cytotoxic potentials of compounds isolated from *Millettia macrophylla* Benth (Fabaceae): Towards a better understanding of its underlying mechanisms," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 16, pp. 421–437, 2016.
- [25] T. Schilirò, I. Gorrasi, A. Longo, S. Coluccia, and G. Gilli, "Endocrine disrupting activity in fruits and vegetables evaluated with the E-screen assay in relation to pesticide residues," *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 127, no. 1-2, pp. 139–146, 2011.
- [26] F. A. Resende, A. P. S. de Oliveira, M. S. de Camargo, W. Vilegas, and E. A. Varanda, "Evaluation of Estrogenic Potential of Flavonoids Using a Recombinant Yeast Strain and MCF7/BUS Cell Proliferation Assay," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 10, Article ID e74881, 2013.
- [27] OECD, "Third meeting of the validation management group for the screening and testing of endocrine disrupters (mammalian effects)," 2007, Joint meeting of the chemicals committee and the working party on chemical, pesticides and biotechnology, <http://www.oecd.org>.
- [28] L. M. F. Lucinda, B. J. Vieira, T. T. Oliveira et al., "Evidences of osteoporosis improvement in Wistar rats treated with Ginkgo biloba extract: A histomorphometric study of mandible and femur," *Fitoterapia*, vol. 81, no. 8, pp. 982–987, 2010.
- [29] Y.-B. Lee, H. J. Lee, K. S. Kim et al., "Evaluation of the preventive effect of isoflavone extract on bone loss in ovariectomized rats," *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, vol. 68, no. 5, pp. 1040–1045, 2004.
- [30] C. Cagnet, "Artéfacts: les difficultés de la technique histologique de la circulation à la coupe," in *Rev Fr Histotechnol*, vol. 19, pp. 71–84, 2006.
- [31] J. F. Fortier and R. Hould, *Histotechnologie: théorie et procédés*, CCDMD edition, 2003.
- [32] A. G. Gonal, G. S. Bardwill, and M. M. David, "Determination of serum proteins by the means of biuret reactions," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 177, pp. 751–766, 1949.
- [33] R. Montgomery, "Determination of glycogen," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 67, no. 2, pp. 378–386, 1957.
- [34] A. M. Soto, T. M. Lin, H. Justicia, R. M. Silvia, and C. Sonnenschein, "An 'in culture' bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics," in *Chemically induced alterations in sexual development: The wildlife/human connection* Princeton, T. Colborn and C. Clement, Eds., pp. 295–309, NJ: Princeton Scientific Publishing, 1992.
- [35] J.-E. Shin, E.-A. Bae, Y. C. Lee, J.-Y. Ma, and D.-H. Kim, "Estrogenic effect of main components kakkalide and tectoridin of puerariae flos and their metabolites," *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 29, no. 6, pp. 1202–1206, 2006.
- [36] P. J. Magee and I. R. Rowland, "Phyto-oestrogens, their mechanism of action: Current evidence for a role in breast and prostate cancer," *British Journal of Nutrition*, vol. 91, no. 4, pp. 513–531, 2004.
- [37] F. R. Westwood, "The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging," *Toxicologic Pathology*, vol. 36, no. 3, pp. 375–384, 2008.
- [38] M. A. Mvondo, D. Njamen, S. T. Fomum, J. Wandji, and G. Vollmer, "A postmenopause-like model of ovariectomized Wistar rats to identify active principles of *Erythrina lysistemon* (Fabaceae)," *Fitoterapia*, vol. 82, no. 7, pp. 939–949, 2011.
- [39] D. F. Archer, "Neoplasia of the female reproductive tract: Effects of hormone therapy," *Endocrine Journal*, vol. 24, no. 3, pp. 259–263, 2004.
- [40] D. Seidlová-Wuttke, T. Becker, V. Christoffel, H. Jarry, and W. Wuttke, "Silymarin is a selective estrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ ) agonist and has estrogenic effects in the metaphysis of the femur but no or antiestrogenic effects in the uterus of ovariectomized (ovx) rats," *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 86, no. 2, pp. 179–188, 2003.
- [41] S. C. Hewitt, B. J. Deroo, K. Hansen et al., "Estrogen Receptor-Dependent Genomic Responses in the Uterus Mirror the Biphasic Physiological Response to Estrogen," *Molecular Endocrinology*, vol. 17, no. 10, pp. 2070–2083, 2003.
- [42] K. D. R. Setchell, "Soy Isoflavones—Benefits and Risks from Nature's Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs)," *Journal of the American College of Nutrition*, vol. 20, pp. 354–362, 2001.
- [43] D. N. Kalu, "The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss," *Bone and Mineral*, vol. 15, no. 3, pp. 175–191, 1991.
- [44] A. N. Shuid, L. L. Ping, N. Muhammad, N. Mohamed, and I. N. Soelaiman, "The effects of *Labisia pumila* var. *alata* on bone markers and bone calcium in a rat model of post-menopausal osteoporosis," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 133, no. 2, pp. 538–542, 2011.
- [45] S. Zingue, D. Njamen, M. A. Mvondo, and C. B. Magne Nde, "Preventive effects of the methanol soluble fraction of *Millettia macrophylla* Benth (Fabaceae) on an osteoporosis-like model of ovariectomized Wistar rats," *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, vol. 11, no. 2, pp. 83–92, 2014.
- [46] S. B. Ateba, D. Njamen, S. Medjakovic et al., "*Eriosema laurentii* de Wild (Leguminosae) methanol extract has estrogenic properties and prevents menopausal symptoms in ovariectomized Wistar rats," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 150, no. 1, pp. 298–307, 2013.
- [47] A. Naaz, M. Zakroczymski, P. Heine et al., "Effect of ovariectomy on adipose tissue of mice in the absence of estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ): A potential role for estrogen receptor beta (ER $\beta$ )," *Hormone and Metabolic Research*, vol. 34, no. 11-12, pp. 758–763, 2002.
- [48] L. J. Robert and C. M. Stavros, *The Cellular and Biomechanical Basis of Bone Remodeling*, R. Marcus, Ed., pp. 22–23, Osteoporosis. Blackwell. Publications, London, 1994.
- [49] V. P. Arcangelo and A. M. Peterson, *Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach*, PA: Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2nd edition, 2005.

- [50] J. Compston, "Bone histomorphometry: the renaissance?" *Bone Key-Osteovision*, vol. 1, no. 5, pp. 9–12, 2004.
- [51] M. Bolognese, J. H. Krege, W. H. Utian et al., "Effects of arzoxifene on bone mineral density and endometrium in postmenopausal women with normal or low bone mass," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 94, no. 7, pp. 2284–2289, 2009.
- [52] D. Njamen, S. Djiogue, S. Zingue, M. A. Mvondo, and B. N. Nkeh-Chungag, "In vivo and in vitro estrogenic activity of extracts from *Erythrina poeppigiana* (Fabaceae)," *Journal of Complementary & Integrative Medicine*, vol. 10, pp. 1–11, 2013.
- [53] G. Silvestrini, P. Ballanti, F. R. Patacchioli et al., "Evaluation of apoptosis and the glucocorticoid receptor in the cartilage growth plate and metaphyseal bone cells of rats after high-dose treatment with corticosterone," *Bone*, vol. 26, no. 1, pp. 33–42, 2000.

# Ethanol Extract of *Lannea Acida* A. Rich (Anacardiaceae) Stem Bark Accelerates Bone Fracture Healing in Ovariectomized Wistar Rat

Oumarou Riepouo Mouchili<sup>1</sup>, Sylvin Benjamin Ateba<sup>2\*</sup>, Edwin Mmutlane<sup>3</sup>, Derek Tantoh Ndinteh<sup>3</sup>, Constant Anatole Pieme<sup>4</sup>, Stéphane Zingue<sup>3,5,6</sup> and Dieudonné Njamen<sup>1,3</sup>



<sup>1</sup>Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Yaoundé 1, Cameroon

<sup>2</sup>Department of Biology of Animal Organisms, Faculty of Science, University of Douala, Cameroon

<sup>3</sup>Department of Chemical Sciences, Faculty of Science, University of Johannesburg, South Africa

<sup>4</sup>Department of Biochemistry and Physiological Sciences, Faculty of Medicine and Biomedical Sciences, University of Yaoundé 1, Cameroon

<sup>5</sup>Department of Life and Earth Sciences, Higher Teachers' Training College, University of Maroua, Cameroon

<sup>6</sup>Department of Medical and Biomedical Engineering, Higher Technical Teachers' Training College, University of Yaoundé 1, Cameroon

\*Corresponding author: Sylvin Benjamin Ateba, Department of Biology of Animal Organisms, Faculty of Science, University of Douala, P.O. Box 24157 Douala, Cameroon

## ARTICLE INFO

Received: 📅 June 27, 2022

Published: 📅 July 20, 2022

**Citation:** Oumarou Riepouo Mouchili, Sylvin Benjamin Ateba, Edwin Mmutlane, Derek Tantoh Ndinteh, Constant Anatole Pieme, et al. Ethanol Extract of *Lannea Acida* A. Rich (Anacardiaceae) Stem Bark Accelerates Bone Fracture Healing in Ovariectomized Wistar Rat. Biomed J Sci & Tech Res 45(2)-2022. BJSTR. MS.ID.007172.

**Keywords:** *Lannea Acida*; Bone Fracture Healing; Postmenopausal Osteoporosis; Drill-Hole; Oxidative Stress

## ABSTRACT

**Background:** Osteoporotic fractures are a leading cause of morbidity and mortality in post-menopausal women. *Lannea acida* (Anacardiaceae) is a plant traditionally used to treat bone related disorders. In our previous study, an ethanolic stem bark extract of *Lannea acida* prevented postmenopausal osteoporosis in ovariectomized Wistar rat model. Based on this preceded results, the present study has been designed to evaluate the capacity of that extract to improve bone-fracture healing in estrogen-deficient Wistar rat model of osteoporosis.

**Material and Methods:** Sham-operated (SHAM) and ovariectomized (OVX) female rats were fractured (30 days post-ovariectomy), divided into 6 groups (n = 5) and then treated by gavage for 60 days. SHAM and OVX controls receiving distilled water, OVX rats treated with estradiol valerate (E2V) at 1 mg/kg BW/day, and three OVX groups respectively treated with *L. acida* at 50, 100 and 200 mg/kg BW/day.

**Results:** Ethanol extract of *L. acida* extract prevented the OVX-induced decrease in femur weights compared to OVX group. It increased calcium and inorganic phosphorus levels and reduced ALP activity in both serum and bone of OVX-fractured animals. Compared to the OVX-fractured animals, it promoted a bone callus formation and union. It increased the trabecular thickness and a quasi-normal trabecular bone network was observed at the fracture site. Moreover, it also improved the fractured bone oxidative stress status.

**Conclusion:** This study demonstrated for the first time that *L. acida* extract promotes bone fracture healing in osteoporotic Wistar rats.

## Introduction

Osteoporosis is a systemic skeletal disease that affects bone quality through a reduction of bone mineral contents and density, and an alteration of the architecture. These events result in increased bone fragility and higher fracture risk [1,2]. In postmenopausal women, endogen estrogen deficiency plays a central role in the pathogenesis of osteoporosis and resulting fractures represent the major cause of morbidity and mortality in that women [3]. On a global scale, the increase in women life expectancy induces a dramatic rise in osteoporotic fracture incidence. Yet in 2013, the annual number of osteoporotic fractures worldwide was estimated to 10 million, with two-thirds in women [4]. This number is expected to increase over the coming years or decades as populations steadily age. Colossal medico-economic consequences are associated with osteoporotic fractures. Williamson, et al. [5] estimated to US\$43669 per patient, with immediate inpatient care costing on average \$13331, the global health and social care cost in the first year following a hip fracture. For this period, fracture incurs healthcare costs of more than \$30,000 in US, of which \$3000 will be paid by the patient [6]. In UK, in addition to the costs of disability (long-term social support for survivors), direct health costs are estimated to £4.3 billion for the 50,000 fragility fractures occurring annually [7]. Apart the heavy economic burden, osteoporotic fractures cause chronic pain, loss of mobility, and loss of independence and death [1].

By contrast to high-income settings, no study has been published on the health costs of fragility fractures in sub-Saharan Africa. The health and socio-economic burden of fractures would likely be much heavier in this low-income setting where there is a lack of health and social systems that facilitate long-term care, a substantial part falling on family and friends. Rather than treat, it is recommended to prevent osteoporotic fractures. In case they occur, comorbidities specific to the patient such osteoporosis strongly interfere with the healing [8,9]. In addition to the mechanical stability, bone fracture healing can be positively modulated by systemic drug therapies [10]. Nowadays, anti-osteoporotic drugs including anti-resorptive and anabolic agents alone or in combination with calcium/vitamin D remain the main treatments [10-12]. However, they display a variable efficacy depending on the type of fracture. For instance, bisphosphonates do not influence the healing after distal radius, hip and vertebral fractures [13]. Anabolic agents accelerate the healing of long bone fractures, while clinical evidence for antiresorptive agents remains unclear [10]. Moreover, safety concerns as well as the poor long-term adherence of these agents substantially contributed to their reduction in prescriptions. Long-term use of bisphosphonates, the most popular antiosteoporotic agents, is associated with increased risk of atypical femur fracture, upper gastrointestinal symptoms and risk of venous thrombosis [14,15]. Nowadays, seeking alternative

treatments has become more and more important. Accordingly, medicinal plants have been suggested as an alternative to promote a fast and efficient (without recurrence) bone repair process with no or minimal adverse side effects [16].

Moreover, given their affordability and accessibility, they may play an important role in reducing family economic pressure. In low-income settings, they hold a very important place in the healthcare systems as up to 80 percent of people rely on them for their primary health care. *Lannea acida* A. Rich (Anacardiaceae) is distributed in Africa and used to treat various ailments including musculoskeletal disorders and gynaecological complains [17,18], to enhance fertility and facilitate parturition [19]. *In vitro*, the aqueous and methanolic extracts of stem bark induced uterotonic effects through oxytocin receptors [19]. Chronic, non-resolving inflammation is detrimental to fracture healing [20]. Upon fracture inflammatory and ischemic conditions can cause excessive oxidative stress resulting in irreversible damage to cells associated with bone repair [21]. This situation is aggravated by conditions of intrinsic oxidative stress such diabetes and postmenopausal osteoporosis [22-23]. *In vivo* studies reported inflammatory, analgesic [24], and antioxydative [25] properties of *L. acida* stem bark extracts. Moreover, our previous study showed that an ethanolic stem bark extract of *L. acida* exhibited estrogenic properties and prevented bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis [26]. All these results suggest that *L. acida* might promote the osteoporotic fracture healing. Therefore, the present study has been designed to evaluate the potential of the ethanolic stem bark extract of the *L. acida* to promote bone fracture healing in drill-hole injury in estrogen-deficient Wistar rat model of osteoporosis.

## Materials and Methods

### Chemicals and Reagents

The antibiotic penicillin (xtapen®) and diclofenac (Dicloecnu®) were obtained from CSPC Zhongnuo pharmaceutical (Shijiazhuang City, China) and ECNU pharmaceutical (Yanzhou City, China), respectively. The 17 $\beta$ -estradiol valerate (Progynova®) were provided by DELPHARM (Lille, France).

### Plant Collection and Authentication

The stem barks of *L. acida* were collected in Moutourwa (Far-North, Cameroon) in July 2014. The plant sample was authenticated at the national Herbarium of Cameroon (HNC-IRA) with voucher number 40942 HNC.

### Animals

Healthy, nulliparous and non-pregnant female Wistar rats (2.5-3 months), from the Animal house of the Department of Animal

Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Yaoundé 1, Cameroon. They were housed in groups of five in plastic cages and kept at room temperature, under natural illumination. They were given soy free diet and water ad libitum. Animals were handled in accordance to the European Union on Animal Care (CEE Council 86/609) guidelines approved by the Institutional National Ethics Committee of the Cameroonian Ministry of Scientific Research and Technology Innovation.

### Plant Extraction

The air-dried and powdered plant material (2kg) was soaked 3 times in 6L of 95% ethanol at room temperature for 48h. After filtering, the combined solution was concentrated under reduced pressure (40°C, 337 mbar) using a rotary evaporator to obtain 272 mg of extract.

### Determination of the Mineral Composition of the Extract

To determine the content of calcium, magnesium, potassium, sodium and phosphorus in the extract, 0.5 g of *L. acida* extract was diluted in 10 mL of supra pure HNO<sub>3</sub> and placed in the MARS 6 microwave digestion system (CEM Matthew, USA) for 30 minutes. Thereafter, demineralized water was added to the tubes up to a total volume of 50 mL. One mL of this digested sample was diluted in 9 mL of 1% HNO<sub>3</sub> in falcon tubes. In reference to calibration curves of standards, the mineral contents of sample were determined using a Spectro Arcos inductively coupled plasma – optical emission spectrometer ICPOES (SPECTRO Analytical Instruments, Germany).

### Fracture Healing Assessment

**Animal Randomization, Drill-Hole Femur Injury and Treatment:** Before the bilateral ovariectomy, vaginal smears of each animal were daily performed for 12 consecutive days to be sure that they are normocyclic. Thereafter, twenty-five of them were ovariectomized (OVX) under anaesthesia (10 mg/kg diazepam and 50 mg/kg ketamine, i.p.), while 5 were sham-operated (SHAM). To assure the situation of estrogen depletion and constant presence in diestrus step, the vaginal smears of the ovariectomized animals were daily checked for five consecutive days from the day 14 after ovariectomy. Thereafter, animals were divided into 6 groups of five animals each (n = 5). Fractures of the proximal femur are the osteoporotic fractures with the highest morbidity and mortality [12]. Yousefzadeh, et al. [27] reported that 30 days is the time needed for inducing osteoporosis in rat femur after bilateral ovariectomy. Accordingly, thirty days after the ovariectomy a femoral drill-hole injury was created in all ovariectomized rats as described by Ngueguim, et al. [28]. Briefly, following a 1-cm long skin and musculature incision, and the exposure of the surface of the femur under anaesthesia (diazepam and ketamine), a 1-mm

diameter hole was created by inserting a drill bit into the anterior portion of the diaphysis. Thereafter, animals were sutured and submitted from the very next day to a 60-day (once daily at 4 - 5 p.m.) oral treatment. The animals were weighed once weekly. Group I (SHAM) and Group II (OVX: ovariectomized rats serving as negative control) received distilled water; Group III (E2V: OVX rats serving as positive control) received 1 mg/kg estradiol valerate; Group IV, V and VI (LA 50, LA 100 and LA 200) were OVX animals treated with *L. acida* extract at the doses of 50, 100 and 200 mg/kg, respectively. At the end, the rats were sacrificed under anaesthesia (10 mg/kg of diazepam and 50 mg/kg of ketamine, i.p.) after an overnight fast and the blood samples collected. The uterus, vagina and femurs were peeled off to remove the surrounded tissues. After weighing uterus and femurs, all these tissues were fixed in 10% formaldehyde.

### Preparation of Bone Homogenate

After washing in NaCl 0.9%, the proximal portion of the left femur was cut and weighed (0.5 g). The tissue was then homogenized in ice-cold medium using a glass Teflon-Potter and 3 mL of deionized water. After centrifuging at 3000 rpm at 5°C for 15 min, the supernatant was collected for estimating the antioxidant activity. Catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) activities as well as the ferric reducing antioxidant power (FRAP) were determined according to the methods of Wilbur, et al. [29], Ellman [30], and Benzie and Strain [31], respectively. Calcium and inorganic phosphorus contents as well as alkaline phosphatase activity were also measured using Biolabo (Maizy, France) reagent kits.

### Blood Analyses

The blood samples collected in EDTA tubes were analysed using a Mindray BC-2800 Auto Haematology Analyser. The samples in dry tubes were centrifuged at 3500 rpm at 5°C for 10 min, and the serum analysed to measure the serum calcium and inorganic phosphorus contents as well as the alkaline phosphatase (ALP) activity using reagent kits from Biolabo (Maizy, France).

### Bone Radiography

The bone callus formation was evaluated as described by Ngueguim, et al. [28]. Briefly, the femur was exposed for 5 milliseconds to X-rays emitted by an Allengers X-ray machine (maximum voltage 125 Kv, main voltage 55 Kv, filtration 0.9 Al/75 (permanent) at a distance of 1 m). An AGFA CR 30-Xm detector (CR-AGFA, Belgium) was used for obtaining and analysing the images.

### Histological Analysis

A Zeiss Axioskop 40 microscope equipped with an AxioCam MR digital camera connected to a computer allowed the analysis of 5 µm

sections of paraffin-embedded uterus and femur using MRGrab1.1 and Axio Vision 3.1 softwares (Carl Zeiss, Hallbergmoos, Germany). The sections were stained with haematoxylin and eosin.

### Statistical Analysis

All results were expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM) and analysis Graphpad Prism 5.03. One-way analysis of variance (ANOVA) and the Dunnett's post hoc test were used.  $p$  value  $< 0.05$  was considered as statistically significant.

## Results

### Mineral Composition of the Extract

Table 1 summarizes the contents of potassium (K), phosphorus (P), magnesium (Mg), calcium (Ca) and sodium (Na) found in *L. acida* extract. Potassium was found to be the most abundant mineral (7387.91  $\pm$  80.19  $\mu$ g/g) followed by calcium (1657.20  $\pm$  52.65  $\mu$ g/g). The abundances of sodium, phosphorus and magnesium were 979.95  $\pm$  4.45, 680.11  $\pm$  3.38 and 343.99  $\pm$  2.05  $\mu$ g/g, respectively.

**Table 1:** Mineral composition of the ethanolic extract of *L. acida*.

Minerals	Mass ( $\mu$ g/g)
Potassium (K)	7387.91 $\pm$ 80.19
Phosphorus (P)	680.11 $\pm$ 3.38
Magnesium (Mg)	343.99 $\pm$ 2.05
Calcium (Ca)	1657.20 $\pm$ 52.65
Sodium (Na)	979.95 $\pm$ 4.45

### Effects of *L. Acida* Ethanol Extract

**Effects on Uterus and Vagina:** Table 2 depicts the effects of the ethanolic extract of *L. acida* on uterus and vagina. A significant ( $p < 0.001$ ) reduction of uterine relative wet weight as well as uterine and vagina epithelial heights was observed 90 days after ovariectomy in OVX animals compared with sham-operated (SHAM). Compared with OVX group, a 60-day treatment with the extract of *L. acida* from day 31 significantly increased ( $p < 0.05$ ) the uterine (at 50 and 100 mg/kg) and vaginal (at 100 and 200 mg/kg) epithelial heights.

**Table 2:** Effects of the ethanolic extract of *L. acida* on body weight, organ relative weights and epithelial height of uterus and vagina.

Items	<i>Lannea acida</i>					
	SHAM	OVX	E2V	50	100	200
<b>Organ relative weight (mg/kg BW)</b>						
Femur wet weight	2795.4 $\pm$ 79.3	2282.1 $\pm$ 96.3 <sup>###</sup>	2644.5 $\pm$ 93.1*	2660.1 $\pm$ 80.1*	2946.5 $\pm$ 95.2 <sup>###</sup>	2127.4 $\pm$ 79.3
Femur dry weight	1794.6 $\pm$ 22.9	1433.2 $\pm$ 64.1 <sup>###</sup>	1730.5 $\pm$ 38.8 <sup>**</sup>	1666.2 $\pm$ 54.7*	1694.2 $\pm$ 75.4 <sup>**</sup>	1445.7 $\pm$ 46.6
Uterine wet weight	1392.7 $\pm$ 97.2	257.9 $\pm$ 18.8 <sup>###</sup>	1482.2 $\pm$ 61.4 <sup>###</sup>	355.6 $\pm$ 11.1	299.1 $\pm$ 4.9	272.6 $\pm$ 36.2
<b>Epithelial height (<math>\mu</math>m)</b>						
Uterine	130.8 $\pm$ 4.2	82.1 $\pm$ 4.2 <sup>###</sup>	131.2 $\pm$ 6.4 <sup>###</sup>	116.8 $\pm$ 6.1 <sup>###</sup>	98.7 $\pm$ 5.5*	91.9 $\pm$ 6.8
Vaginal	116.8 $\pm$ 4.9	87.2 $\pm$ 3.1 <sup>###</sup>	423.3 $\pm$ 3.6 <sup>###</sup>	92.7 $\pm$ 4.31	122.1 $\pm$ 4.59 <sup>###</sup>	102.4 $\pm$ 0.9*

**Note:** SHAM = normal animals receiving distilled water; OVX = Ovariectomized rats receiving distilled water; E2V = ovariectomized rats treated with estradiol valerate (1 mg/kg); *L. acida* = Ovariectomized rats treated with *L. acida* extract at the doses of 50, 100 and 200 mg/kg, respectively. Data are expressed as mean  $\pm$  ESM (n = 5); \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and. \*\*\* $p < 0.001$  as compared with SHAM group. ### $p < 0.001$  and # $p < 0.05$  as compared with OVX group.

**Effects on Femur Weight:** A 90-day of estrogen depletion led to a significant reduction ( $p < 0.01$ ) of the femur weight as compared with SHAM group (Table 2). At 50 and 100 mg/kg of *L. acida* extract, the femur wet and dry weights were significantly higher ( $p < 0.5$ ) than that in OVX group following a 60 days' oral treatment from the day 31.

**Effects on Some Biomarkers of Serum and Bone:** Table 3 shows an increased ( $p < 0.05$ ) alkaline phosphatase (ALP) activity in both serum and bone 90 days after ovariectomy as compared with normal rats. The 60-day treatment with *L. acida* from day 31 after ovariectomy led to a lower ALP activity ( $p < 0.001$ ) in serum (at 50 and 100 mg/kg) and bone (at 100 and 200 mg/kg) as compared with OVX group. Calcium levels in bone and serum were significantly lower ( $p < 0.001$ ) in OVX animals as compared

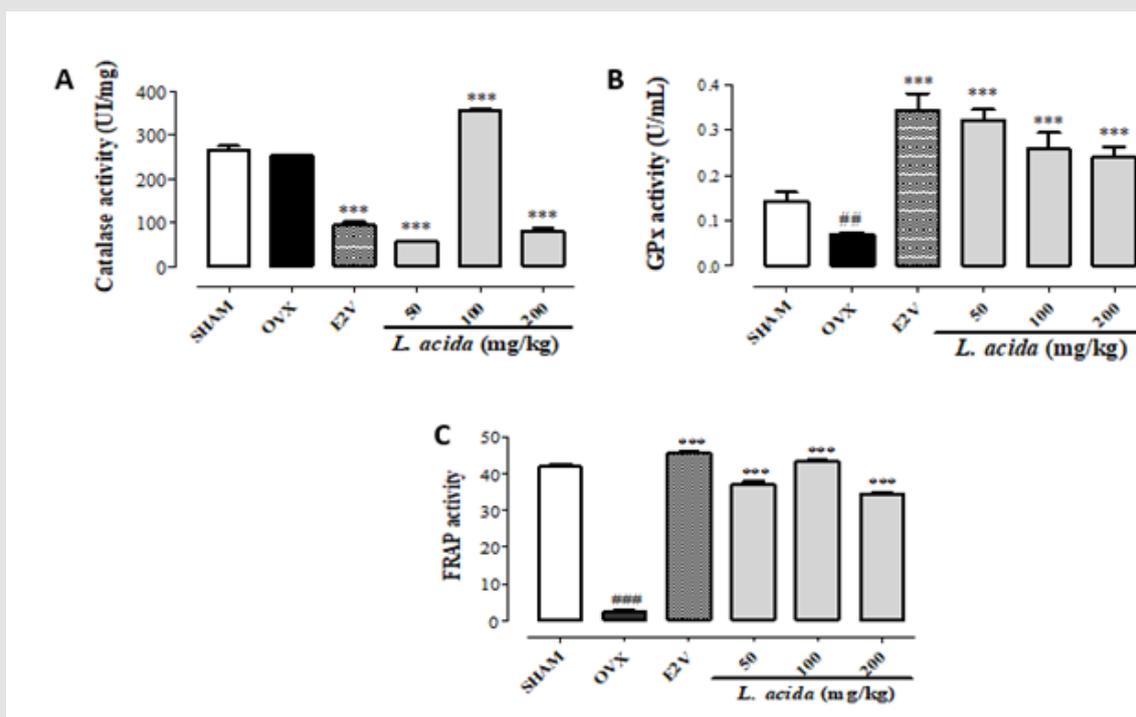
with SHAM group 90 days after ovariectomy. Compared to the OVX group, the serum calcium levels of the *L. acida* extract treated groups significantly increased ( $p < 0.001$ ). The values were even higher than that observed in SHAM group. In bone, a significant increase was observed at the doses of 100 and 200 mg/kg group ( $p < 0.05$ ). On the other hand, E2V-treated rats exhibited a higher ( $p < 0.001$ ) serum level of calcium, while no significant variation was observed in the femur. Regarding inorganic phosphorus, 90 days of endogenous estrogen depletion did not affect the bone and serum levels of inorganic phosphorus as compared with the SHAM group. Treatment with E2V (1 mg/kg) and *L. acida* (100 mg/kg) from the day 31 exhibited a higher level of inorganic phosphorus in serum as compared with OVX group ( $p < 0.01$ ), while only 200 mg/kg of *L. acida* extract increased ( $p < 0.001$ ) this parameter in bone.

**Table 3:** Effects of the ethanol extract of *L. acida* on some biomarkers of bone and serum after 60 days of treatment from day 31.

Items	<i>Lannea acida</i> (mg/kg BW)					
	SHAM	OVX	E2V	50	100	200
<b>Alkaline Phosphatase (UI/L)</b>						
Serum	66.3 ± 2.3	82.7 ± 2.8 <sup>#</sup>	56.8 ± 3.5 <sup>*</sup>	40.6 ± 9.5 <sup>***</sup>	36.2 ± 9.3 <sup>***</sup>	81.6 ± 2.2
Bone	11.7 ± 3.6	126.6 ± 3.8 <sup>###</sup>	58.5 ± 2.1 <sup>***</sup>	114.1 ± 5.1	13.5 ± 0.7 <sup>***</sup>	7.9 ± 0.6 <sup>***</sup>
<b>Calcium (mmol/L)</b>						
Serum	6.2 ± 0.7	1.7 ± 0.3 <sup>###</sup>	6.4 ± 0.4 <sup>***</sup>	7.9 ± 0.5 <sup>***</sup>	6.9 ± 0.5 <sup>***</sup>	7.1 ± 0.7 <sup>***</sup>
Bone	5.2 ± 0.5	2.6 ± 0.5 <sup>###</sup>	3.8 ± 0.2	3.5 ± 0.1	4.6 ± 0.3 <sup>***</sup>	3.9 ± 0.1 <sup>*</sup>
<b>Inorganic phosphorus (mmol/L)</b>						
Serum	0.37 ± 0.06	0.36 ± 0.06	0.45 ± 0.04 <sup>**</sup>	0.29 ± 0.02	0.56 ± 0.1 <sup>**</sup>	0.3 ± 0.1
Bone	0.16 ± 0.00	0.14 ± 0.00	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.00	0.18 ± 0.0	0.3 ± 0.1 <sup>***</sup>

**Note:** SHAM = normal animals receiving distilled water (vehicle); OVX = Ovariectomized rats receiving distilled water; E2V = ovariectomized rats treated with estradiol valerate (1 mg/kg); *L. acida* = Ovariectomized rats treated with *L. acida* extract at the doses of 50, 100 and 200 mg/kg BW, respectively. All animals were fractured. Data are expressed as mean ± ESM (n = 5); \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 and. \*\*\* p < 0.001 as compared to SHAM group. ###p < 0.001 and #p < 0.05 as compared to OVX group.

### Effects on Some Oxidative Stress Parameters in Bone

**Figure 1:**

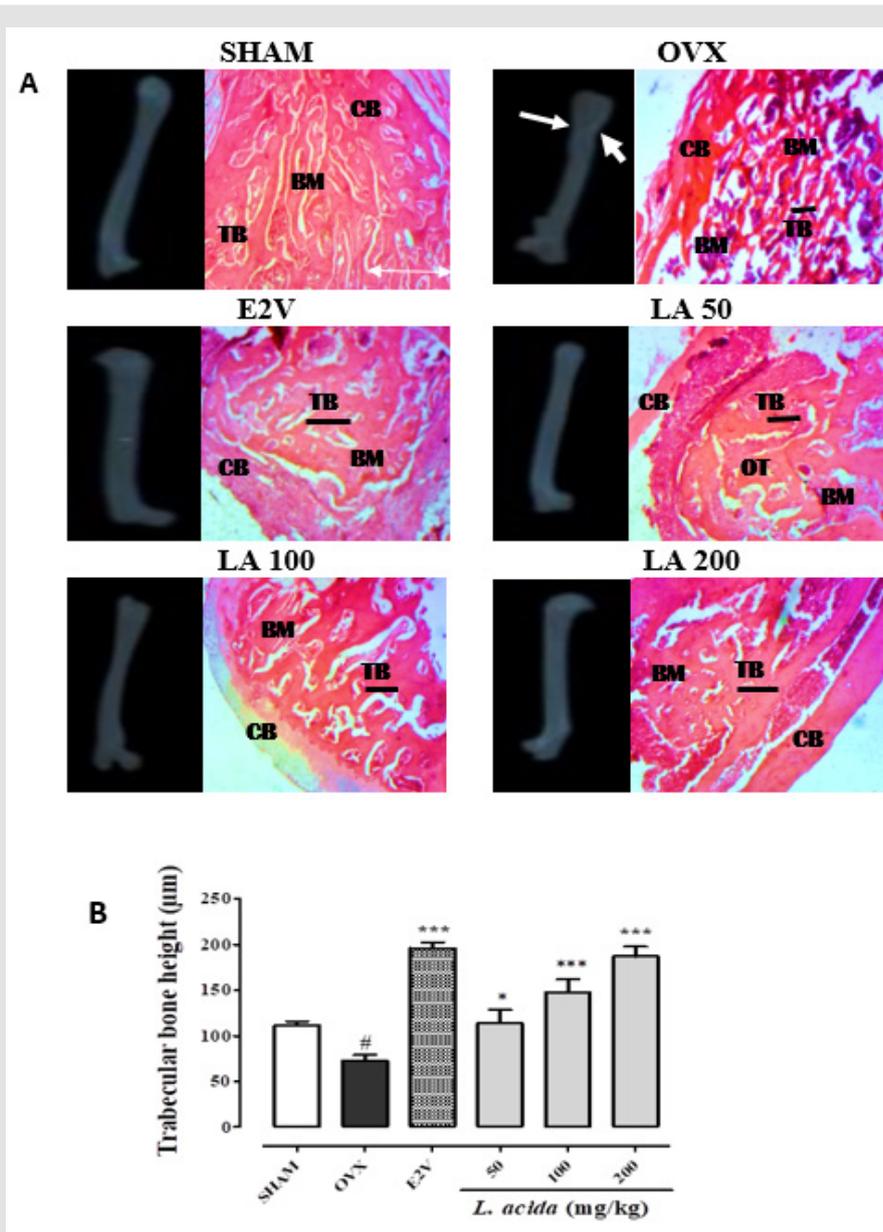
- (A) Effects *L. acida* ethanol extract on the catalase,  
 (B) Glutathione peroxidase and  
 (C) FRAP activities in bone.

GPx = glutathione peroxidase; FRAP = Ferric Reducing Antioxidant Power; SHAM = normal control group receiving the vehicle (distilled Water), OVX = negative control group receiving the vehicle (distilled Water); E2V = OVX rats that received estradiol valerate (1 mg/kg BW); *L. acida* = OVX animals treated with de *L. acida* at the doses of 50, 100 and 200 mg/kg BW, respectively. Data expressed as mean ± SEM (n= 5); \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, and \*\*\*p < 0.001 as compared to OVX group. #p < 0.05, ###p < 0.01, and ###p < 0.001 as compared to SHAM group.

Ninety days after ovariectomy, a non-significant reduction (13.6%) of catalase (CAT) activity was observed in OVX rats as compared with the SHAM animals (Figure 1A). Treatment with E2V and *L. acida* (50 and 200 mg/kg) from the day 31 led to a lower CAT activity than that observed in OVX group ( $p < 0.001$ ). However, the extract at 100 mg/kg significantly ( $p < 0.001$ ) augmented the CAT activity at a value higher than that in the SHAM group. Compared with SHAM group, glutathione peroxidase (GPx) activity and the

Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) considerably diminished ( $p < 0.01$ ) in bone of OVX rats (Figures 1B & 1C, respectively). The oral administration of E2V and *L. acida* for 60 consecutive days at all tested doses significantly ( $p < 0.001$ ) increased GPx activity and FRAP as compared with the OVX group. The values of FRAP and GPx in all groups receiving the extract were close and higher than that of the SHAM group, respectively.

**Effects on Bone Callus Formation**



**Figure 2:** Effects *L. acida* ethanolic extract in the bone radiographies and histology. SHAM = normal control group receiving the vehicle (distilled Water); OVX = negative control group receiving the vehicle (distilled Water); E2V = OVX rats that received estradiol valerate (1 mg/kg BW); TB = trabecular bone; CB = cortical bone; BM = bone marrow; *L. acida* = OVX animals treated with de *L. acida* at the doses of 50, 100 and 200 mg/kg BW, respectively. Data expressed as mean ± SEM (n= 5); \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, and \*\*\*p < 0.001 as compared to OVX group. #p < 0.05, ##p < 0.01, and ###p < 0.001 as compared to SHAM group.

Radiographies of injured femurs showed a partial healing of bones in untreated OVX animals compared to the SHAM group. Ovariectomized and fractured rats that received E2V (1 mg/kg) and *L. acida* at all the doses had total bone healing (Figure 2) characterized by a total callus formation and a complete bone union. Femurs in OVX group showed a deterioration of the microarchitecture as compared with the SHAM group. This was evidenced by the larger resorption lacunas (Figure 2). However, *L. acida* extract at all the tested doses improved the bone microstructure after fracture compared to OVX group. In fact, the histological sections of bones of these animals showed a quasi-normal trabecular bone network. Furthermore, measurement

of the trabecular bone thickness showed a significant ( $p < 0.05$ ) reduction of trabecular bone thickness in OVX animals compared to the SHAM group. E2V and *L. acida* extract at all the tested doses for 60 days significantly ( $p < 0.001$ ) increased the thickness of the trabecular bone as compared with the OVX rats.

### Effects on Some Haematology Parameters

As far as haematological parameters are concerned, no significant variation was found in all parameters between the different groups (Table 4). Exception made for the white blood cell count, which was significantly decreased in the negative control group compared to the normal group.

**Table 4:** Effects of the ethanolic extract of *L. acida* extract on the hematological parameters.

Items	<i>Lannea acida</i> (mg/kg BW)						
	Normal values	SHAM	OVX	E2V	50	100	200
WBC ( $10^3/\mu\text{L}$ )	5-16	6.4 ± 0.6	8.1 ± 0.7	7.6 ± 1.1	5.2 ± 0.7	8.7 ± 1.4	8.1 ± 0.6
Lymphocytes (%)	65-85	70.2 ± 3.1	72.1 ± 3.9	73.9 ± 2.5	83.4 ± 3.4	69.1 ± 4.2	6.5 ± 5.4
Monocytes (%)	0-20	8.8 ± 0.4	5.8 ± 0.3	8.4 ± 0.5	5.4 ± 1.8	7.1 ± 1.1	9.2 ± 1.8
Granulocytes (%)	0-27	21.2 ± 2.9	22.1 ± 3.7	19.8 ± 1.9	17.9 ± 2.5	27.6 ± 4.8	25.7 ± 4.3
RBC ( $10^6/\mu\text{L}$ )	5-10	10.1 ± 1.9	7.1 ± 0.2	6.8 ± 0.3	7.3 ± 0.2	6.9 ± 0.3	6.6 ± 0.2
Hématocrite (%)	32-53	34.5 ± 1.8	39.7 ± 1.2	38.3 ± 1.4	37.5 ± 3.8	37.5 ± 2.1	35.1 ± 2.8
Hemoglobin (g/dL)	12-18	10.6 ± 0.6	12.1 ± 0.5	11.9 ± 0.6	11.4 ± 1.3	11.8 ± 0.8	11.2 ± 1.1
MCV (fL)	52-60	55.8 ± 0.8	56.2 ± 0.8	56.6 ± 1.1	56.6 ± 0.9	54.5 ± 0.7	56.9 ± 1.2
MCH (pg)	17-29	17.1 ± 0.3	16.9 ± 0.4	17.5 ± 0.3	17.1 ± 0.3	17.1 ± 0.4	18.1 ± 1.1
MCHC (g/dL)	32-45	30.6 ± 0.2	30.3 ± 0.3	31.0 ± 0.5	30.3 ± 0.6	31.4 ± 0.4	29.2 ± 3.3
Platelets ( $10^3/\mu\text{L}$ )	200-1100	412.6 ± 12.6	419.7 ± 26.9	422.4 ± 42.2	272.8 ± 9.9	440.2 ± 24.9	289.4 ± 89.4

**Note:** SHAM = normal animals receiving distilled water (vehicle); OVX = Ovariectomized rats receiving distilled water; E2V = ovariectomized rats treated with estradiol valerate (1 mg/kg); WBC = white blood cell count; RBC = red blood cell count; MCV = mean corpuscular volume; MCH = mean corpuscular hemoglobin; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; *L. acida* = Ovariectomized rats treated with *L. acida* extract at the doses of 50, 100 and 200 mg/kg BW, respectively. All animals were fractured. Data are expressed as mean ± ESM (n = 5); \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  as compared to SHAM group. ### $p < 0.001$  and # $p < 0.05$  as compared to OVX group

## Discussion

The bone-fracture healing capacity of the ethanolic stem bark extract of *L. acida* was investigated using a drill-hole femur fracture in postmenopausal Wistar rat model of osteoporosis. Bilateral ovariectomy is a widely accepted model for evaluating postmenopausal complications as well as the effects of substances on these complications. The lack of ovarian estrogen production for 90 days induced a significant reduction in uterine wet weight as well as uterine and vaginal epithelial heights in OVX group compared to SHAM group. This result is in accordance with many reports [26,32,33] and validates the bilateral ovariectomy. The 60-day treatment with *L. acida* extract had no effect on uterine wet weight but significantly increased the uterine and vaginal epithelial heights. This result suggests the presence of estrogen-

like phytoconstituents in the extract and confirm the estrogenic potential of *L. acida* observed in our previous report [26].

Patient-related comorbidities such as osteoporosis contribute to bone fracture-healing complications [8]. By managing them bone healing can be improved. The significant reduction in femur mass and calcium content as well as the increase in bone alkaline phosphatase activity observed in OVX group as compared with SHAM group indicate the osteoporosis status in these animals. The process of consolidation and bone remodelling of a fracture is strictly dependent on bone turnover and the calcium and phosphate metabolism [10]. *L. acida* ethanolic extract significantly increased calcium and inorganic phosphorus levels in bone. Osteoblasts are responsible for the osteoid matrix formation and, through the production of non-collagenous proteins, initiate and

regulate its mineralization. Therefore, the increase of bone calcium and inorganic phosphorus contents following treatment with *L. acida* is an indicator of bone formation. The higher the calcium and phosphorus contents, the greater the bone density and strength. *L. acida* extract also induced a significant increase of serum calcium and inorganic phosphorus levels suggesting an elevated intake of that minerals.

The analysis of this extract showed high amounts potassium, calcium, inorganic phosphorus and magnesium suggesting that the extract provides, at least in part, the minerals (calcium, inorganic phosphorus) necessary for the bone mineralization. Studies indicated that in addition to activate vitamin D, magnesium promotes osteoblast proliferation [34,35], while a high dietary intake of potassium is beneficial to bone health even in people with low dietary calcium intake [36]. Alkaline phosphatase (ALP), a specific biomarker of bone formation secreted by osteoblast during bone maturation [37], increased both in serum and femur of OVX-fractured rats compared to sham-operated animals. *L. acida* extract at the tested doses significantly reduced the ALP activity in bone and serum compared to OVX group. Several studies correlated the reduction of bone and serum ALP activity with the process of fracture healing [28,38,39]. Normal fracture healing is generated by increased osteoblastic activity, that secretes large quantities of ALP involved in the bone formation and mineralization [38].

Following a fracture, there is an acute increase in ALP activity, then it decreases with the formation of bone callus to return to normal when it ceases [38]. The faster bone healing occurs, the faster the ALP activity decreases. In line with this, it appears that compared to the OVX-fractured control animals, there is an acceleration of bone healing in OVX-fractured animals treated with *L. acida* extract. The radiographies of femurs from animals in this study showed a healing of fractures, except for the femur of OVX-fractured animals, where the healing was not complete. According to our results, microarchitectures of bone of OVX-fractured rats were disorganized, with decrease in trabecular bone thickness. E2V and *L. acida* extract treatment reversed this bone disorganization and increased trabecular bone thickness compared to that observed in OVX-fractured control group. According to Potu, et al. [40], osteoporosis is characterized by reduction in trabecular and cortical bone thicknesses. *L. acida* ethanol extract inhibited bone loss and microarchitecture alteration by the same way improved bone fracture healing.

Oxidative stress has been suggested to be a mediator and indicator of osteoporosis [41-44]. It also been involved in the ischemia-reperfusion processes, especially during the callus formation, that occur after a fracture [45,46]. Sandukji, et al. [47] showed that antioxidant treatment improves bone parameters and oxidative stress related markers in patients with long-bone

fractures, and thus might be beneficial in the healing. A decrease in GPx activity and FRAP was observed in OVX-fractured rats compared to SHAM group, while bone catalase (CAT) did not change. This result indicates the occurring of the oxidative stress in femur of OVX-fractured rats. Treatment of these animals with *L. acida* ethanolic extract induced a significant increase in CAT (at 100 mg/kg) and GPx (at all tested doses) activities suggesting an antioxidant activity in bone. On the other hand, the extract at all tested doses significantly increased bone FRAP in OVX-fractured animals. The FRAP measures the total antioxidant capacity of the antioxidants present in the sample and able to reduce ferric ion (Fe<sup>3+</sup>) involved in the generation the most potent hydroxyl radical. Accordingly, our results suggest that the ethanolic extract of *L. acida* increased non-enzymatic antioxidants and reduced lipid peroxides in the bone tissue.

## Conclusion

The aim of this study was to evaluate the capacity of that extract to improve bone-fracture healing in estrogen-deficient Wistar rat model of osteoporosis. The extract reduced the alkaline phosphatase activity, increased calcium and inorganic phosphorus contents and improved the oxidative stress status in bone. In addition, a quasi-normal trabecular bone network at the fracture site accompanied the positive effects of the *L. acida* extract on callus formation and fracture healing. All these results suggest that the ethanol extract of stem bark of *L. acida* improves bone fracture healing in ovariectomized Wistar rat.

## Research Funding

None declared.

## Authors' Contributions

All the authors accepted the responsibility of the manuscript's content and approved the submission.

## Competing Interest

The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Sánchez-Riera L, Wilson N (2017) Fragility fractures and their impact on older people. *Best Practice & Research: Clinical Rheumatology* 31(2): 169-191.
2. Hazavehei SM, Taghdisi MH, Saidi M (2007) Application of the health belief model for osteoporosis prevention among middle school girl students, Garmsar, Iran. *Education for Health (Abingdon)* 20(1): 23.
3. Pisani P, Renna MD, Consersano F, Casciaro E, Di Paolo M, et al. (2016) Major osteoporotic fragility fractures. Risk factor updates and societal impact. *World Journal of Orthopedics* 7(3): 171-181.
4. Hernlund E, Svedbom A, Ivergard M, Compston J, Cooper C, et al. (2013) Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report in collaboration with the international Osteoporosis Foundation (IOF) and the European

- Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). Archives of Osteoporosis 8(1): 136.
5. Williamson S, Landeiro F, McConnell T, Fulford-Smith L, Javaid MK, et al. (2017) Costs of fragility hip fractures globally: a systematic review and meta-regression analysis. *Osteoporosis International* 28(10): 2791-2800.
  6. Williams SA, Chastek B, Sundquist K, Barrera-Sierra S, Leader DJr, et al. (2022) Economic burden of osteoporotic fractures in US managed care enrollees. *The American Journal of Managed Care* 26(5): e142-e149.
  7. Leal J, Gray AM, Prieto-Alhambra D, Arden NK, Cooper C, et al. (2016) Impact of hip fracture on hospital care costs: a population-based study. *Osteoporosis International* 27(2): 549-558.
  8. Haffler-Luntzer M, Hankenson KD, Ignatius A, Pfeifer R, Khader BA, et al. (2019) Review of animal model of comorbidities in fracture-healing research. *Journal of Orthopaedic Research* 37(12): 2491-2498.
  9. Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, Hao Lin J, Maastricht S, et al. (2001) Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone* 28(1): 80-86.
  10. Marongiu G, Dolci A, Verona M, Capone A (2020) The biology and treatment of acute long-bones diaphyseal fractures: overview of the current options for bone healing enhancement. *Bone Reports* 12: 100249.
  11. Degli Esposti L, Girardi A, Saragoni S, Sella S, Andretta M, et al. (2019) Use of antiosteoporotic drugs and calcium/vitamin D in patients with fragility fractures: impact on re-fracture and mortality risk. *Endocrine* 64(2): 367-377.
  12. Khan AZ, Rames RD, Miller AN (2018) Clinical management of osteoporotic fractures. *Current Osteoporosis Reports* 16: 299-311.
  13. Shin YH, Shin WC, Kim JW (2020) Effect of osteoporosis medication on fracture healing: an evidence based review. *Journal of Bone Metabolism* 27(1): 15-26.
  14. Black DM, Eastell R, Vittinghoff E, Li BH, Ryan DS, et al. (2020) Atypical femur fracture risk versus fragility fracture prevention with bisphosphates. *New England Journal of Medicine* 383(8): 743-753.
  15. Grenn J, Czanner G, Reeves G, Watson J, Wise L, et al. (2010) Oral bisphosphates and risk of cancer of oesophagus, stomach and colorectum: case-control analysis within a UK primary cohort. *British Medical Journal* 341: c4444.
  16. Barbalho SM, Araújo AC, Penteado Detregiachi CR, Buchaim DV, Guiguer EL (2019) The potential role of medicinal plants in bone regeneration. *Alternative Therapies in Health and Medicine* 25(4): 32-39.
  17. Arbonnier M (2009) Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest. Coed. In : MNHN-Quae (Edt.), p. 396-416.
  18. Gill LS (1992) Ethnomedicinal uses of plants in Nigeria. University of Benin Press, Benin City, Nigeria.
  19. Ngadjui E, Kouam JY, Fozin GRB, Momo ACT, Deeh PDB, et al. (2021) Uterotrophic effects of aqueous and methanolic extracts of *Lannea acida* in Wistar rats: A *in vitro* study. *Reproductive Sciences* 28(9): 2448-2457.
  20. Bahney CS, Zondervan RL, Allison P, Theologis A, Ashley JW, et al. (2019) Cellular biology of fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research* 37(1): 35-50.
  21. Kubo Y, Wruck CJ, Fragoulis A, Drescher W, Pape HC, et al. (2019) Role of Nrf2 in fracture healing: clinical aspects of oxidative stress. *Calcified Tissue International* 105(4): 341-352.
  22. Dai K, Hao Y (2007) Quality of healing compared between osteoporotic fracture and normal traumatic fracture. In: Quin L, Genant HK, Griffith JF, Leung KS (Eds.), *Advanced bioimaging technologies in assessment of the quality of bone and scaffold materials techniques and applications*. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 531-541.
  23. Hamada Y, Fujii H, Fukagawa M (2009) Role of oxidative stress in diabetic bone disorder. *Bone* 45(Suppl 1): S35-S38.
  24. Owusu G, Ofori-Amoah J (2017) Anti-inflammatory and analgesic effects of an aqueous extract of *Lannea acida* stem bark. *Journal of Pharmaceutical Research International* 16: 1-8.
  25. Sarwar M, Idress HA, Abdollahi MA (2011) Review on the recent advances in pharmacological studies on medicinal plants; animal studies are done but clinical studies need completing. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 6: 867-883.
  26. Riepouo Mouchili O, Zingue S, Bakam BY, Ateba SB, Foyet SH, et al. (2017) *Lannea acida* A. Rich (Anacardiaceae) ethanol extract exhibits estrogenic effects and prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* (2017): 7829059.
  27. Yousefzadeh N, Kashfi K, Jeddi S, Ghasemi A (2020) Ovariectomized rat model of osteoporosis: a practical guide. *EXCLI Journal* 19: 89-107.
  28. Nguenguim Tsofack F, Sakouong Talle SH, Donfack JH, Gounoue Kamkumo R, Dzeufiet Djomeni PD, et al. (2017) Aqueous extract of *Peperomia pellucida* (L.) HBK accelerates fracture healing Wistar rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2017(1): 188.
  29. Wilbur Km, Bernheim F, Shapiro OW (1949) Determination of lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 24: 305-310.
  30. Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82: 70-77.
  31. Benzie IF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power, the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239: 70-76.
  32. Ateba SB, Njamen D, Medjakovic S, Hobiger S, Mbanya JC, et al. (2013) *Eriosema laurentii* De Wild (Leguminosae) methanol extract has estrogenic properties and prevents menopausal symptoms in ovariectomized Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology* 150(1): 298-307.
  33. Zingue S, Njamen D, Mvondo MA, Magne Nde CB (2014) Preventive effects of the methanol soluble fraction of *Milletia macrophylla* Benth (Fabaceae) on an osteoporosis-like model on ovariectomized Wistar rats. *Journal of Complement and Integrative Medicine* 11(2): 83-92.
  34. De Baaij JHF, Hoenderop JGJ, Bindels RJM (2015) Magnesium in man: Implications for health and disease. *Physiological Reviews* 95: 1-46.
  35. Uwitonze AM, Razzaque MS (2018) Role of magnesium in vitamin D activation and function. *Journal of the American Osteopathic Association* 118: 181-189.
  36. Kong SH, Kim JH, Hong AR, Lee JH, Kim SW, et al. (2017) Dietary potassium intake is beneficial to bone health in a low calcium intake population: The Korean National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES) (2008–2011). *Osteoporosis International* 28: 1577-1585.
  37. Kini U, Nandeesh BN (2012) Physiology of bone formation, remodelling, and metabolism. In: Fogelman I, Gnanasegaran G, Van der Wall H (Eds.), *Radionuclide and hybrid bone imaging*. Berlin Springer, p. 29-57.
  38. Komnenou A, Karayannopoulou M, Polizopoulou ZS, Constantinidis TC, Dessiris A (2005) Correlation of serum alkaline phosphatase activity with the healing process of long bone fractures in dogs. *Veterinary Clinical Pathology* 34(1): 35-38.
  39. Sousa C, Abreu H, Viegas C, Azevedo J, Reis R, et al. (2011) Serum total and bone alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase activities for the assessment of bone fracture healing in dogs. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 63: 1007-1111.
  40. Potu BK, Rao MS, Nampurath GK, Chamallamudi MR, Nayak SR, et al. (2010) Anti-osteoporotic activity of the petroleum ether extract of