

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

Centre de Recherche et de Formation
Doctorale en Sciences de la Vie, Santé et
Environnement
Unité de Recherche et de Formation
Doctorale en Sciences de la Vie



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

Post Graduate School for Life Sciences,
Health and Environment
Doctoral Research Unit for Life Sciences

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES

DEPARTMENT OF ANIMAL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE ANIMALE

LABORATORY OF ANIMAL PHYSIOLOGY

Effets des phyto-œstrogènes du duramen de *Pterocarpus soyauxii* Taub. (Fabaceae) sur quelques symptômes de la ménopause chez le rat Wistar

THESE

Présentée et soutenue en vue de l'obtention du Doctorat/PhD en

Biologie des Organismes Animaux

Option : Physiologie Animale

Par

OWONA Pascal Emmanuel

Matricule : **12Q1236**

Master ès-sciences

Option : Physiologie Animale

Devant le jury composé de :

Président : **M. DIMO Theophile**, Professeur, UYI

Rapporteurs : **M. KAMTCHOUING Pierre**, Professeur UYI

M. DZEUFIET DJOMENI Paul Désiré, Professeur UYI

Membres : **M. TELEFO Phelix Bruno**, Professeur UDS

M. NJAMEN Dieudonné, Professeur UYI

M. DJIOGUE Séfirin, Maître de conférences UYI



Année académique 2022-2023

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
UNIVERSITY OF YAOUNDE I



FACULTE DES SCIENCES
FACULTY OF SCIENCE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES
DEPARTMENT OF ANIMAL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

ATTESTATION DE CORRECTION

Nous soussignés, membres du jury de soutenance de la Thèse de Doctorat/Ph.D en Biologie des Organismes Animaux (Option **Physiologie Animale**) de Monsieur **OWONA Pascal Emmanuel**, matricule **12Q1236**, soutenance autorisée par la correspondance N° 2023-120/UWI/VREPDTIC/DAAC/Ad/DEPE/SPD/SPDA/CB-AP de Monsieur le Recteur de l'Université de Yaoundé I en date du 04 Avril 2023, attestons que les corrections exigées au candidat lors de cette évaluation, faite le 28 Avril 2023, ont réellement été effectuées et que le présent document peut être déposé sous sa forme actuelle.

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

Yaoundé, le...**16**...**M.A.I**...**2023**

Président du jury



Chef de Département

Charles Félix Bilong Bilong
Professeur

Examineurs

Sefirin DJIOGUE, PhD
Associate Professor
University of Yaounde 1

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

LISTE DES ENSEIGNANTS

ANNÉE ACADEMIQUE 2021/2022

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION 31 OCTOBRE 2022

ADMINISTRATION

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

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

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*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (39)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1.	BIGOGA DAIGA Jude	Professeur	En poste
2.	BOUDJEKO Thaddée	Professeur	En poste
3.	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
4.	FOKOU Elie	Professeur	En poste
5.	KANSCI Germain	Professeur	En poste
6.	MBACHAM FON Wilfred	Professeur	En poste
7.	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	<i>Chef de Département</i>
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	Chef DAF / FS
13.	DJUIDJE NGOUNOUE Marceline	Maître de Conférences	En poste
14.	EFFA ONOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
15.	EWANE Cécile Annie	Maître de Conférences	En poste
16.	KOTUE TAPTUE Charles	Maître de Conférences	En poste
17.	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Doyen FS / UDs
18.	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
19.	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
20.	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
21.	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
22.	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste

23.	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
24.	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
25.	BEBOY EDJENGUELE Sara Nathalie	Chargé de Cours	En poste
26.	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
27.	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
28.	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
29.	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
30.	KOUOH ELOMBO Ferdinand	Chargé de Cours	En poste
31.	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
32.	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
33.	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
34.	OWONA AYISSI Vincent Brice	Chargé de Cours	En poste
35.	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
36.	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
37.	WILFRED ANGIE Abia	Chargé de Cours	En poste

38.	FOUPOUAPOUOGNIGNI Yacouba	Assistant	En poste
39.	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Chargée de Cours	En poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (51)

1.	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	DAARS/FS
2.	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3.	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4.	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5.	DZEUFIET DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En Poste
6.	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	Vice Doyen/FMSB/UIYI
7.	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
8.	KEKEUNOU Sévilor	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	Inspecteur de service Coord.Progr. /MINSANTE
14.	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	En poste

15.	ALENE Désirée Chantal	Maître de Conférences	Chef Service/ MINESUP
16.	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
17.	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
18.	GOUNOUE KAMKUMO Raceline épse FOTSING	Maître de Conférences	En poste
19.	JATSA BOUKENG Hermine épse MEGAPTCHÉ	Maître de Conférences	En Poste
20.	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Maître de Conférences	En poste
21.	MBENOUN MASSE Paul Serge	Maître de Conférences	En poste
22.	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste

23.	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
24.	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
25.	NGUEMBOCK	Maître de Conférences	En poste
26.	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste

27.	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
28.	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Chargé de Cours	En poste
29.	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
30.	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Chargée de Cours	En poste
31.	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
32.	FEUGANG YOUMSSI François	Chargé de Cours	En poste
33.	GONWOUO NONO Legrand	Chargé de Cours	En poste
34.	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
35.	KOGA MANG DOBARA	Chargé de Cours	En poste
36.	LEME BANOCK Lucie	Chargé de Cours	En poste
37.	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
38.	METCHI DONFACK MIREILLE FLAURE EPSE GHOUMO	Chargé de Cours	En poste
39.	MOUNGANG Luciane Marlyse	Chargée de Cours	En poste
40.	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
41.	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
42.	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	<i>Chef Div. Uté Bamenda</i>
43.	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
44.	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
45.	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
46.	YEDE	Chargé de Cours	En poste
47.	YOUNOUSSA LAME	Chargé de Cours	En poste

48.	AMBADA NDZENGUE GEORGIA ELNA	Assistante	En poste
49.	FOKAM Alvine Christelle Epse KEGNE	Assistante	En poste
50.	MAPON NSANGOU Indou	Assistant	En poste
51.	NWANE Philippe Bienvenu	Assistant	En poste

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (33)

1.	AMBANG Zachée	Professeur	<i>Chef DAARS /UYII</i>
2.	DJOCGOUÉ Pierre François	Professeur	En poste
3.	MBOLO Marie	Professeur	En poste
4.	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
5.	YOUMBI Emmanuel	Professeur	<i>Chef de Département</i>
6.	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

7.	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8.	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9.	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
10.	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	<i>DAAC /UDla</i>
11.	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	<i>CE / MINRESI</i>
12.	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste

13.	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	<i>CT / MINRESI</i>
14.	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
15.	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
16.	ONANA JEAN MICHEL	Maître de Conférences	En poste

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

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (31)

1.	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ.Ngaoundere</i>
3.	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Miss.PR</i>
4.	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
5.	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
6.	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
7.	NENWA Justin	Professeur	En poste
8.	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS Univ.Ngaoundere</i>
9.	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>

10.	ACAYANKA Elie	Maître de Conférences	En poste
11.	EMADACK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
12.	KAMGANG YOUNBI Georges	Maître de Conférences	En poste
13.	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
14.	KENNE DEDZO GUSTAVE	Maître de Conférences	En poste
15.	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
16.	MBEY Jean Aime	Maître de Conférences	En poste
17.	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	En poste
18.	NEBAH Née NDO SIRI Bridget NDOYE	Maître de Conférences	<i>CT/MINPROFF</i>
19.	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
20.	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste

21.	NYAMEN Linda Dyorisse	Maître de Conférences	En poste
22.	PABOUDAM GBAMBIE AWAWOU	Maître de Conférences	En poste
23.	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Maître de Conférences	En poste

24.	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	<i>Chef Service/ ENS Bertoua</i>
25.	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
26.	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
27.	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
28.	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
29.	NJANKWA NJABONG N. Eric	Chargé de Cours	En poste
30.	PATOUOSSA ISSOFA	Chargé de Cours	En poste
31.	SIEWE Jean Mermoz	Chargé de Cours	En Poste

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (38)

1.	DONGO Etienne	Professeur	<i>Vice-Doyen/FSE/UIYI</i>
2.	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	<i>Chef de Département UDS</i>
3.	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
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.	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DPSAA</i>
8.	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste
9.	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
10.	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11.	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12.	KAMTO Eutrophe Le Doux	Maître de Conférences	En poste
13.	KENMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14.	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
15.	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
16.	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
17.	MVOT AKAK CARINE	Maître de Conférences	En poste
18.	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	<i>Chef de Cellule MINRESI</i>
19.	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	<i>C.E.A/ MINESUP</i>
20.	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	<i>DAAC/Uté Bertoua</i>
21.	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
22.	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
23.	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste
24.	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
25.	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
26.	ZONDEGOUMBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste

27.	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
28.	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
29.	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
30.	SIELINOU TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
31.	MESSI Angélique Nicolas	Chargé de Cours	En poste
32.	TCHAMGOUE Joseph	Chargé de Cours	En poste

33.	TSAMO TONTSA Armelle	Chargé de Cours	En poste
34.	TSEMEUGNE Joseph	Chargé de Cours	En poste

35.	MUNVERA MFIFEN Aristide	Assistant	En poste
36.	NONO NONO Éric Carly	Assistant	En poste
37.	OUETE NANTCHOUANG Judith Laure	Assistante	En poste
38.	TSAFFACK Maurice	Assistant	En poste

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

1.	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div.MINESUP</i>
2.	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA.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>Sous-Directeur/MINFOPRA</i>
6.	AMINOUE 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.	MONTHÉ DJIADEU Valéry M.	Chargé de Cours	En poste
15.	OLE OLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	<i>Directeur adjoint ENSET. Ebolowa</i>
16.	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste

17.	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
18.	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
19.	MAKEMBE. S. Oswald	Assistant	En poste
20.	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
21.	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste
22.	NZEKON NZEKO'O ARMEL JACQUES	Assistant	En poste

7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (30)

1.	AYISSI Raoult Domingo	Professeur	Chef de Département
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 & 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.	DJIADU 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.	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
17.	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	<i>Chef Dpt /ENS Uté Bertoua</i>
18.	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
19.	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
20.	OGADOA AMASSAYOGA	Chargée de Cours	En poste
21.	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	<i>En stage</i>
22.	TCHEUTIA Daniel Duviol	Chargé de Cours	En poste
23.	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargé de Cours	En poste

24.	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
25.	FOKAM Jean Marcel	Assistant	En poste
26.	LOUMNGAM KAMGA Victor	Assistant	En poste
27.	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
28.	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
29.	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
30.	TENKEU JEUFACK Yannick Léa	Assistant	En poste

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (22)

1.	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE/FS/UYI</i>
3.	NWAGA Dieudonné M.	Professeur	En poste

4.	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	En poste
5.	BOUGNOM Blaise Pascal	Maître de Conférences	En poste
6.	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
7.	KOITCHOU MABEKU Epse KOUAM Laure Brigitte	Maître de Conférences	En poste
8.	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
9.	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste

10.	BODA Maurice	Chargé de Cours	En position d'absence irrégulière
11.	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
12.	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
13.	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
14.	ESSONO Damien Marie	Chargé de Cours	En poste
15.	LAMYE Glory MOH	Chargé de Cours	En poste
16.	MEYIN A EBONG Solange	Chargée de Cours	En poste
17.	NKOUDOU ZE Nardis	Chargé de Cours	En poste

18.	TAMATCHO KWEYANG Blandine Pulchérie	Chargée de Cours	En poste
19.	TOBOLBAÏ Richard	Chargé de Cours	En poste

20.	MONI NDEDI Esther Del Florence	Assistante	En poste
21.	NKOUÉ TONG ABRAHAM	Assistant	En poste
22.	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	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.	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
6.	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	En poste
7.	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	<i>Chef de Département</i>
8.	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste
9.	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
10.	PEMHA Elkana	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.	BOYOMO Marthe	Maître de Conférences	<i>DA / ENSPY</i>
19.	ENYEGUE A NYAM épse BELINGA	Maître de Conférences	En poste
20.	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
21.	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
22.	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
23.	MBINACK Clément	Maître de Conférences	En poste
24.	MBONO SAMBA Yves Christian U.	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 DerbetiniAppolinaire	Maître de Conférences	En poste
29.	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Directeur/ENS/UYI</i>

30.	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
31.	CHAMANI Roméo	Chargé de Cours	En poste
32.	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
33.	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	<i>Chef Cell. MINADER</i>
34.	MEL'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	En poste

35.	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste
36.	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	<i>Absente depuis Janvier 2022</i>
37.	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Chargé de Cours	En poste
38.	DJIOTANG TCHOTCHOU Lucie Angennes	Chargée de Cours	En poste
39.	OTTOU ABE Martin Thierry	Chargé de Cours	En poste
40.	TEYOU NGOUPOU Ariel	Chargé de Cours	En poste

41.	KAMENI NEMATCHOUA Modeste	Assistant	En poste
42.	LAMARA Maurice	Assistant	En poste
43.	NGA ONGODO Dieudonné	Assistant	En poste
44.	WANDJI NYAMSI William	Assistant	En poste

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

1.	BITOM Dieudonné-Lucien	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2.	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3.	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
4.	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	<i>Chef de Département</i>
5.	NGOS III Simon	Professeur	En poste
6.	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
7.	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste

8.	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
9.	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
10.	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste
11.	FUH Calistus Gentry	Maître de Conférences	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
12.	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
13.	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	<i>Chef de Département /Uté Maroua</i>
14.	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	CT/ MINIMDT
15.	NGO BIDJECK Louise Marie	Maître de Conférences	En poste
16.	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI
17.	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
18.	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
19.	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	<i>Chef service Maintenance & du Matériel/UYII</i>
20.	TCHAKOUNTE J. épouse NUMBEM	Maître de Conférences	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
21.	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
22.	TEMGA Jean Pierre	Maître de Conférences	En poste
23.	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
24.	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

25.	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
26.	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
27.	ELISE SABABA	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	Chargé de Cours	En poste

31.	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
32.	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
33.	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
34.	MINYEM Dieudonné	Chargé de Cours	CD/ Uté Maroua
35.	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
36.	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37.	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
38.	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
39.	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
40.	FEUMBA Roger	Chargé de Cours	En poste
41.	MBANGA NYOBE Jules	Chargé de Cours	En poste

42.	NGO'O ZE ARNAUD	Assistant	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 (00)	14 (10)	15 (05)	02 (01)	39 (16)
BPA	14 (01)	12 (08)	21 (06)	04 (02)	51 (17)
BPV	06 (01)	10(01)	16 (09)	01 (00)	33 (11)
CI	09(01)	14(04)	08 (01)	00 (00)	31 (06)
CO	06 (01)	20 (04)	08 (03)	04 (01)	38(09)
IN	02 (00)	02 (00)	12 (01)	06 (00)	22 (01)
MAT	01 (00)	08 (00)	14 (01)	07 (01)	30 (02)
MIB	03 (01)	06 (02)	10 (03)	03 (02)	22 (08)
PHY	15 (01)	13 (02)	11 (03)	04 (00)	43 (06)
ST	07 (01)	16 (03)	18 (04)	01 (00)	42(08)
Total	71 (07)	115 (34)	133 (36)	32 (07)	351 (84)

Soit un total de

351 (84) dont :

- Professeurs **71 (07)**
- Maîtres de Conférences **115 (34)**
- Chargés de Cours **133 (36)**
- Assistants **32 (07)**

() = Nombre de Femmes

84

DEDICACE

**À ma mère, Mme NDZIE
Micheline
Pour son amour et ses
sacrifices**

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier dans un premier temps **Dieu Tout-Puissant**, par la grâce de qui j'ai eu la force et le courage nécessaires pour avancer pas à pas malgré les difficultés et de mener à bien tous les travaux entrepris jusqu'à la rédaction de cette thèse. Un merci en lettres d'or s'adresse ensuite à tous ceux qui de près ou de loin ont œuvré pour la réussite de ce travail :

Au **Professeur KAMTCHOUING Pierre**, malgré vos multiples occupations, vous avez accepté de me recevoir dans votre équipe de recherche et de guider mes premiers pas dans le monde de la recherche. Je tiens à vous remercier pour la disponibilité, les conseils, l'encadrement et la confiance que vous aviez placée en moi tout au long de ces années de coopération. Votre rigueur scientifique et votre souci pour un travail bien fait m'ont séduit lors de mon travail de recherche ;

Au **Professeur DZEUFLET DJOMENI Paul Désiré**, je tiens à vous remercier pour m'avoir accueilli dans votre équipe de recherche, m'avoir fait confiance. Votre générosité et vos conseils m'ont encouragé tout au long de ce travail. Un grand merci pour l'intérêt que vous aviez accordé à ce travail. J'ai été touché par vos qualités scientifiques et humaines, votre simplicité et votre disponibilité ;

Au **Professeur DIMO Théophile**, merci pour les critiques constructives qui ont servi à mieux rédiger cette thèse ainsi que pour les cages métaboliques mises à notre disposition à travers le projet YABINAPA et pour vos conseils pratiques qui m'ont permis d'ajuster mes travaux ;

Au **Professeur BILANDA Danielle Claude**, je tiens à vous témoigner ma reconnaissance pour votre disponibilité, vos conseils, votre soutien moral et ma foi maternel. J'ai admiré vos qualités scientifiques et humaines au cours de mes travaux ainsi que votre souci à me voir mener à bien et diligemment ce travail ;

Au **Professeur ZINGUE Stéphane** pour les critiques constructives et pour les éclaircissements qui m'ont vraiment édifié à plus d'un titre ;

Au **Docteur MENGUE Yolande Sandrine**, je vous remercie pour m'avoir guidé constamment dans mon travail, m'avoir aidé par votre expérience et vos précieux conseils. Merci pour votre amour du travail bien fait, votre sympathie, votre esprit d'ouverture, votre constante disponibilité et votre assistance multiforme sans faille tout au long de ce travail. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de ma sincère gratitude et mon profond respect ;

Aux **Docteurs NGOUNGOURE Madeleine, MBALLA Francine, KAMENI Mireille et FOUDA Yannick Bekono.** Merci pour votre aide, vous aviez su vous montrer disponible malgré la distance et vos nombreuses occupations. Vos critiques constructives et le temps consacré pour les corrections et suggestions ont été d'un apport incontestable dans l'édifice de cette thèse.

À tous les enseignants du Département de Biologie et de Physiologie Animales et plus précisément de l'option Physiologie Animale pour leur encadrement et les connaissances qu'ils m'ont transmises ;

À **Mr MBOLANG Lohik**, loin d'être un ami, tu es pour moi un grand frère. Ton altruisme envers moi me laissait parfois sans voix. Ton sens d'humilité et de simplicité ont constitué pour moi une école. Merci d'avoir eu cet impact positif dans ma vie.

À tous mes aînés de laboratoire en particulier à **Messieurs et Mesdames FIFEN Rodrigue, TCHEUTCHOUA Yannick, TSAKEM Jaurès, FOKOU Roberto, NGAKO Albertine, MESSI Narcisse, TIENCHEU Yvan, TIENCHEU Jean Philippe, TCHAMBA Gérard et NEKAM Arnaud**, pour leurs conseils et appuis technique dans la réalisation des travaux de cette thèse ;

À tous mes camarades de promotion en l'occurrence **Mesdames et Messieurs FEUDJIO Raïssa, MOUTCHEU Sandra, NNOMO Ines, NDJENGUE Elisabeth, DONGMO Huguette, YUGO Sandy, BIDINGHA Ronald, NJIFENJOU Honoré, MEKONGO Herman et MENPOULIA Vaneck**, pour leurs encouragements multiformes et leurs participations dans la réalisation de certains objectifs de cette thèse ;

À tous les étudiants du Laboratoire de Physiologie Animale et plus spécialement à **Mesdames BIDJA Angèle, NDZIE marie, YONTSI Signing, AMBOMO Florence, KENGNE Ségolène, TATCHOU Lucie, KENNE Jocelyne et Monsieur KAHOU Rivaldo**, vous avez été tous formidables et votre aide combien inestimable a grandement facilité certaines étapes de ce travail ;

Au **révérend Père BELIBI Owona Jean.** Je vous dis infiniment merci. Ces mots sont un euphémisme et ne sauraient à eux seuls témoigner de votre dévouement, votre intérêt, votre soutien moral, spirituel et financier depuis mon entrée à l'université jusqu'à cette soutenance. Vous aviez eu cette vision prophétique quant à ma capacité à pousser le bouchon et braver les épreuves de cette thèse. Au moment où ce but est en voie d'être atteint, je tiens à vous rassurer

de mon engagement et ma détermination dans cette voie que vous avez ouvert dans ma vie et je vous prie de toujours avoir ce regard paternaliste dans les étapes que je suis appelé à braver ;

À mon Père **Mr NKOUTOU Jean Claude** pour son intérêt manifeste, sa contribution matérielle et financière qui ont contribué à la matérialisation de ce travail ;

À ma sœur **Mme NTOLO Madeleine Carole** qui est toujours curieuse et surprise de ce que je fais. Merci pour ton soutien et ta présence. Je remercie également mon frère jumeau **Mr BELINGA Joseph Klaus** et mon frère cadet **Mr BALLA Joseph Yvan** pour leur présence. Merci à ma nièce **NDZIÉ Mbi Yvana** et à ma fille **NDZIE Owona Micheline Emeraude** pour la bonne humeur apportée au sein de la famille.

À « **Nana** », ma grand-mère adorée feu **Mme NTOLO Sophie** épouse **OWONA Pascal**. Bien que tu ne sois plus là, tu as jeté les bases ethnobotaniques sur l'usage de *P. soyauxii*. Aujourd'hui ton œuvre est portée à l'attention du publique à travers moi ton petit fils. Je sais combien tu aurais été contente et fière de moi.

À **Mr ELOUNDOU Koffi**, pour sa disponibilité dans la localisation géographique, l'identification et la récolte de la plante.

À toute ma famille notamment à mes oncles, **Messieurs MVONDO Ntolo Albert, OWONA Zachari, BELINGA OWONA Venant**, à ma tante **Mme BETSENGUE Rosalie** et à mes cousins **Messieurs OWONA Péguy, ESSOMBA Martial, ELOUNDOU Ghislain, ELOUNDOU Gaël, MBARGA Thomas et MANGA Mvondo** et cousines, **Mesdames MENGUE Jolie, METOUGOU Brigitte, NTOLO Mvondo, MELINGUI Mvondo et AKA'A Romaine** pour leurs conseils, appuis financiers et leur soutien moral ;

À tous mes amis, qui comptent énormément pour moi. Merci pour votre soutien, votre aide et vos encouragements. Je remercie particulièrement **Mesdames BOUM Séraphine Désirée, MBENG Christine Mabelle** et **NGO-MBOCK Esther** et **Messieurs le Dr EMBOLO Edzoto Roger, ELOUNDOU Zambo Fredy, ENYEGUE Noah Joël, MONEYEMFECK Ndongo**, pour votre soutien et votre présence.

A tous ceux qui m'ont encouragé d'une manière quelconque et dont le nom n'a pas été suscité, trouvez ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

SOMMAIRE

LISTE DES ENSEIGNANTS	i
DEDICACE	xi
REMERCIEMENTS	xii
SOMMAIRE	xv
LISTE DES FIGURES	xviii
LISTE DES TABLEAUX	xxiii
LISTE DES ABREVIATIONS	xxv
RESUME	xxvii
ABSTRACT	xxx
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE	4
I.1- Généralités sur les œstrogènes	4
I.1.1- Définition et typologie	4
I.1.2- Biosynthèse des œstrogènes	4
I.1.3- Transport des œstrogènes	5
I.1.4- Récepteurs aux œstrogènes	6
I.1.5- Mécanismes d'action des récepteurs aux œstrogènes	8
I.1.6- Effets physiologiques des œstrogènes	11
I.2- Ménopause et œstrogènes.....	17
I.2.1- Quelques données historiques sur la définition du terme ménopause	17
I.2.2- Physiopathologie de la ménopause.....	17
I.2.3- Symptomatologie de la ménopause	19
I.2.4- Induction de la ménopause chez la rate.....	26
I.2.5- Prise en charge des troubles associés à la ménopause.....	28
I.3- Généralités sur les phyto-œstrogènes	29
I.3.1- Définition	29
I.3.2- Classification des phyto-œstrogènes	29
I.3.3- Métabolisme et biodisponibilité des phyto-œstrogènes	30

I.3.4- Mécanismes d'action des phyto-œstrogènes	31
I.3.5- Effets thérapeutiques et perturbateur endocrinien des phyto-œstrogènes	33
I.4.- Generalites sur <i>Pterocarpus soyauxii</i>	39
I.4.1- Caractéristiques morphologiques	39
I.4.2- Taxonomie.....	39
I.4.3- Utilisations ethnopharmacologiques de <i>Pterocarpus soyauxii</i>	40
I.4.4- Travaux scientifiques antérieurs effectués avec <i>Pterocarpus soyauxii</i>	40
I.5- Toxicité.....	41
I.5.1- Généralités.....	41
I.5.2- Toxicité aiguë	42
I.5.3- Toxicité subchronique	42
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	43
II.1- Matériel	43
II.1.1- Matériel animal	43
II.1.2- Matériel végétal	43
II.2-Méthodes	43
II.2.1- Extraction aqueuse du duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i>	43
II.2.2- Détermination de la dose équivalente chez l'humain et calcul des doses expérimentales de l'extrait aqueux du duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i> chez le rat	44
II.2.3- Analyses phytochimiques	44
II.2.4- Evaluation de l'activité œstrogénique de l'extrait aqueux du duramen de <i>P. soyauxii</i>	51
II.2.5- Evaluation des effets de l'extrait aqueux du duramen de <i>P. soyauxii</i> sur quelques troubles ménopausiques.....	54
II.2.6- Evaluation des effets de l'extrait aqueux du duramen de <i>P. soyauxii</i> sur quelques paramètres de la fonction de reproduction chez les rates normales	61
II.2.7- Evaluation du profil toxicologique de l'extrait aqueux du duramen de <i>P. soyauxii</i>	63
II.2.8- Analyses biochimiques	64
II.2.8.1- Préparation des échantillons.....	64
II.2.9- Analyse histologique.....	91
II.2.10- Analyses statistiques des résultats.....	94

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	95
III.1- Résultats.....	95
III.1.1- Analyse phytochimique de l'extrait aqueux du duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i>	95
III.1.2- Composition phytochimique quantitative de l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus soyauxii</i>	97
III.1.3- Activité antioxydante <i>in vitro</i> de l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus soyauxii</i>	97
III.1.4- Effets œstrogéniques de l'extrait aqueux du duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i> dans un test utéro-trophique classique	98
III.1.5- Effets de l'extrait aqueux du duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur quelques symptômes de la ménopause chez les rates ovariectomisées.....	106
III.1.6- Effets de l'extrait aqueux du duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur quelques paramètres de la fonction de reproduction chez les rates normales	149
III.1.7- Toxicité aiguë et subchronique de l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus soyauxii</i>	157
III.2- Discussion.....	166
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	178
RÉFÉRENCES	180
ANNEXES	213
PUBLICATIONS	218

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Formules chimiques développées des œstrogènes naturels.....	4
Figure 2: Biosynthèse des stéroïdes sexuels.	5
Figure 3 : Organisation structurale et fonctionnelle des isotypes α et β du récepteur aux œstrogènes humain	7
Figure 4: Répartition tissulaire de l'expression de RE α et de RE β	8
Figure 5 : Schéma récapitulatif du mécanisme d'action des récepteurs des œstrogènes.	10
Figure 6: Contrôle de la production des œstrogènes au cours du cycle ovarien par l'axe hypothalamo-hypophysaire.....	12
Figure 7: Effet de l'œstradiol sur différents facteurs influençant l'activité des ostéoclastes.	14
Figure 8: Effets des œstrogènes sur quelques organes de l'organisme.	15
Figure 9: Frottis vaginaux de la rate aux différents stades du cycle œstral	17
Figure 10: bouleversements physiologiques lors de la ménopause.....	20
Figure 11: Représentation schématique des principaux mécanismes et interactions de rétroaction par lesquels une carence en œstrogènes entraîne une perte osseuse ..	23
Figure 12: Coupes histologiques de l'utérus, du vagin et de la glande mammaires chez les rates ovariectomisées.	27
Figure 13: Métabolisme des phyto-œstrogènes.	31
Figure 14: Mécanisme d'action génomique des phyto-œstrogènes	33
Figure 15: Schéma résumant les effets thérapeutiques des phyto-œstrogènes sur les différents systèmes de l'organisme.	34
Figure 16: Résumé des effets potentiels des phyto-œstrogènes sur la santé par la modulation du système endocrinien.	36
Figure 17 : Photographie des différentes parties de <i>Pterocarpus soyauxii</i>	39
Figure 18: Protocole d'extraction aqueuse du duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i>	44
Figure 19: Courbe d'étalonnage pour la détermination de la teneur en flavonoïdes.	47
Figure 20: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	48
Figure 21: Courbe d'étalonnage de l'acide tannique.	49
Figure 22: Schéma synoptique du protocole de mise en évidence <i>in vivo</i> de l'activité œstrogénique de l'extrait aqueux du duramen de <i>P. soyauxii</i>	52
Figure 23: Schéma synoptique du protocole expérimental sur les effets de l'extrait aqueux du duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur quelques troubles ménopausiques.	56
Figure 24: Photographies du labyrinthe aquatique prises par Owona Pascal	59

Figure 25: Schéma synoptique du protocole expérimental sur les effets de l'extrait aqueux du duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur la fonction de reproduction des rates.	62
Figure 26: Courbe d'étalonnage de l'oestradiol.....	79
Figure 27: Courbe d'étalonnage de la LH.....	81
Figure 28: Courbe d'étalonnage de la FSH.....	83
Figure 29: Courbe d'étalonnage du GABA.	84
Figure 30: Courbe d'étalonnage de la sérotonine.	87
Figure 31: Courbe d'étalonnage des protéines.....	88
Figure 32: Courbe d'étalonnage des nitrites.	91
Figure 33: Profil chromatographique de l'extrait aqueux du duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i>	96
Figure 34: Effets du traitement de 3 jours des rates ovariectomisées à l'extrait aqueux du duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur la masse relative de l'utérus frais (A) et le taux de protéines totales dans l'utérus (B).....	99
Figure 35: Effets du traitement de 3 jours des rates ovariectomisées à l'extrait aqueux du duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur la structure de l'utérus.....	100
Figure 36: Effets du traitement de 3 jours des rates ovariectomisées à l'extrait aqueux du duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur la taille de l'épithélium utérin.	101
Figure 37: Photographies montrant l'effet d'un traitement au duramen de <i>P. soyauxii</i> de 3 jours sur la cytologie vaginale des rates ovariectomisées.....	102
Figure 38: Effets de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur la structure du vagin des rates ovariectomisées traitées pendant 3 jours.	103
Figure 39: Effets de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur la structure du vagin des rates ovariectomisées traitées pendant 3 jours.	104
Figure 40: Photographies montrant l'effet d'un traitement de 3 jours au duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur la structure de la glande mammaire chez les rates ovariectomisées.....	105
Figure 41: Effets du traitement de 28 jours à l'extrait aqueux du duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur la masse relative de l'utérus frais (A) et le taux de protéines utérines (B) chez les rates 84 jours après ovariectomie.....	106
Figure 42: Effets du traitement de 28 jours à l'extrait aqueux du duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur la structure de l'utérus, 84 jours post-ovariectomie suivis de 28 jours de traitement.....	107

Figure 43 : Effets du traitement de 28 jours à l'extrait aqueux du duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur la taille de l'épithélium utérin, 84 jours post-ovariectomie suivis de 28 jours de traitement.....	108
Figure 44: Photographies montrant l'effet du traitement à l'extrait aqueux du duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i> pendant 28 jours sur la cytologie vaginale des rates, 84 jours post-ovariectomie suivis de 28 jours de traitement.	109
Figure 45: Effets du traitement de 28 jours à l'extrait aqueux du duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur la taille de l'épithélium vaginal, 84 jours post-ovariectomie suivis de 28 jours de traitement.	110
Figure 46: Photographies montrant les effets de <i>Pterocarpus soyauxii</i> pendant 28 jours sur la structure de la glande mammaire, 84 jours post-ovariectomie suivis de 28 jours de traitement.	111
Figure 47: Effets de l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur la masse relative de l'aorte (A) et sur le taux de protéine dans l'aorte (B) chez les rates ovariectomisées traitées pendant 28 jours.	114
Figure 48: Effets de l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur le taux de MDA (A), de GSH (B) et de nitrites dans l'aorte (C) chez les rates ménopausées et traitées pendant 28 jours.	118
Figure 49: Effets du traitement de 28 jours au duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur la structure de l'aorte (A) et le rapport intima/média (B), 84 jours postovariectomie suivi de traitement de 28 jours.....	119
Figure 50: Effets de l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur le temps de latence à mordre la nourriture dans l'environnement aversif et familial au cours du test d'alimentation supprimée par la nouveauté après 28 jours de traitement chez les rates ovariectomisées.	121
Figure 51: Effets de l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur le temps d'immobilité, de nage et d'escalade au cours du test de la nage forcée après un traitement de 28 jours chez les rates ovariectomisées.	122
Figure 52: Effets de l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur le temps passé dans le quadrant cible au cours du test du labyrinthe aquatique de Morris après 28 jours de traitement chez les rates ovariectomisées.	123
Figure 53: Effets de l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur le temps d'exploration de l'objet familier (A), du nouvel objet (B) et l'index de reconnaissance au cours du	

test de reconnaissance du nouvel objet (C) après 28 jours de traitement chez les rates ovariectomisées.....	124
Figure 54: Effets de l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur le taux de protéines cérébrales, 84 jours postovariectomie suivi du traitement de 28 jours.	125
Figure 55: Effets du traitement de 28 jours à l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur le taux de calcium (A) et de magnésium (B) cérébral, 84 jours postovariectomie suivi du traitement de 28 jours.	127
Figure 56: Effets de l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur le taux de GABA-T (A) et de GABA (B) au niveau de l'hippocampe chez les rates ménopausées après un traitement de 28 jours.	128
Figure 57: Effets de l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur le taux sérotonine au niveau de l'hippocampe, 84 jours postovariectomie suivi de 28 jours de traitement. ...	129
Figure 58: Effets de l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur le taux de glutathion réduit (A), de nitrites (B) et de MDA (C) au niveau du cerveau après 28 jours de traitement chez les rates ovariectomisées.....	130
Figure 59: Photographies des régions hippocampiques et du cortex cérébral montrant l'effet de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur la structure du cerveau.....	132
Figure 60: Effet de l'extrait de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur la densité neuronale des régions CA1 et CA3 chez les rates ovariectomisées.	133
Figure 61: Effets du traitement de 28 jours à l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur la masse relative du fémur (A) et du tibia et le taux de protéines fémorales (B) chez les rates ovariectomisées.	134
Figure 62: Effets du traitement de 28 jours a l'extrait aqueux du duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur la densité du fémur chez les rates ovariectomisées.....	135
Figure 63: Effets de l'extrait aqueux du duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur le taux de glutathion réduit (A), de nitrites (B) et de MDA (C) au niveau fémoral après un traitement de 28 jours chez les rates ovariectomisées.....	142
Figure 64: Photographies montrant les effets de <i>Pterocarpus soyauxii</i> suite à un traitement de 28 jours sur la structure du fémur et du tibia chez les rates ovariectomisées.	143
Figure 65: Effets de l'extrait aqueux du duramen de <i>P. soyauxii</i> sur quelques marqueurs du statut oxydant rénale et hépatique chez les rates ovariectomisées.	147
Figure 66: Photographie de la structure du foie et du rein chez les rates ovariectomisées et traitées à l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus soyauxii</i> pendant 28 jours.....	148

Figure 67: Effets de de l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur l'évolution pondérale des rates normales.	149
Figure 68: Effets de de l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur la concentration de protéines sérique (A), utérine et ovarienne (B) chez les normales.	150
Figure 69: Effets de l'extrait aqueux du duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur la concentration sérique (A) et ovarienne (B) en cholestérol chez les normales.....	151
Figure 70: Effets de de l'extrait aqueux du duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur la concentration sérique d'œstradiol chez les normales.....	152
Figure 71: Effets de l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur le taux sérique de LH et de FSH chez les rates normales.	153
Figure 72: Effets de l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur la structure de l'utérus, du vagin et sur la cytologie vaginale chez les rates normales.....	154
Figure 73: Effet de l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur le nombre de follicules ovariens et la structure de l'ovaire chez les rates normales.	156
Figure 74: Effets de l'extrait aqueux du duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur l'évolution pondérale	159
Figure 75: Effets de l'extrait aqueux du duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur la masse relative du foie, du rein, du poumon et de la rate au terme de l'administration en étude de toxicité subaiguë.	160
Figure 76: Effets de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur la structure du rein, du poumon, de la rate et foie et du rein au terme de l'administration en étude de toxicité subaiguë.....	165

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Protocole de dosage du cholestérol total	65
Tableau II: Protocole de dosage des triglycérides	66
Tableau III: Protocole de dosage du HDL-C	67
Tableau IV: Protocole de dosage de la phosphatase alcaline sérique et osseuse	69
Tableau V: Protocole de dosage du calcium	70
Tableau VI: Protocole de dosage du magnésium	71
Tableau VII: Protocole de dosage du phosphore osseux et sérique	72
Tableau VIII: Mode opératoire du dosage de l'ALAT	73
Tableau IX: Mode opératoire du dosage de l'ASAT	74
Tableau X: Protocole de dosage de la bilirubine.	75
Tableau XI: Protocole de dosage de la créatinine	76
Tableau XII: Protocole de dosage de l'acide urique	77
Tableau XIII: Mode opératoire du dosage de l'œstradiol	78
Tableau XIV: Mode opératoire du dosage de la LH	80
Tableau XV: Mode opératoire du dosage de la FSH	82
Tableau XVI: Protocole de dosage de l'acide gamma aminobutyrique	84
Tableau XVII: Protocole de dosage de l'acide gamma aminobutyrique.....	85
Tableau XVIII: Protocole de dosage de la sérotonine	86
Tableau XIX: Protocole de dosage des protéines totales	88
Tableau XX: Protocole de dosage du glutathion réduit.....	89
Tableau XXI: Protocole de dosage du MDA.....	90
Tableau XXII: Protocole de dosage des nitrites	91
Tableau XXIII: Protocole de déparaffinage	93
Tableau XXIV: Etapes de la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine	94
Tableau XXV: Composés bioactifs identifiés dans l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus soyauxii</i>	95
Tableau XXVI: Principaux signaux présentés dans les spectres LC-MS des composés détectés chez <i>Pterocarpus soyauxii</i> et attribution proposée.....	96
Tableau XXVII: Analyse phytochimique quantitative de l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus</i> <i>soyauxii</i>	97
Tableau XXVIII: Concentration inhibitrice 50 de l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus soyauxii</i> contre les radicaux DPPH et ABTS et concentration FRAP	98

Tableau XXIX: Effets de l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur le gain pondéral et sur la masse relative de la graisse abdominale après 28 jours de traitement chez les rates ovariectomisées, 84 jours postovariectomie.	113
Tableau XXX: Effets de l'extrait aqueux du duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur la lipidémie des rates ovariectomisées	116
Tableau XXXI: Effets de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur quelques éléments figurés du sang chez les rates ménopausées	136
Tableau XXXII: Effets de l'extrait aqueux du duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur le taux sérique, urinaire et osseux de calcium, phosphore et de magnésium chez les rates ovariectomisées.....	138
Tableau XXXIII: Effets de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur l'activité de la PAL sérique et osseuse, la créatinine urinaires et quelques index d'ostéolyse chez les rates ovariectomisées	140
Tableau XXXIV: Effets de l'extrait aqueux du duramen de <i>P. soyauxii</i> sur quelques marqueurs biochimiques de la fonction hépatique chez les rates ovariectomisées.....	144
Tableau XXXV: Effets de l'extrait aqueux du duramen de <i>P. soyauxii</i> sur quelques marqueurs biochimiques de la fonction rénale chez les rates ovariectomisées	145
Tableau XXXVI: Effets de l'extrait aqueux du duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur quelques paramètres comportementaux.....	158
Tableau XXXVII: Effets de l'administration de l'extrait aqueux du duramen de <i>P. soyauxii</i> sur quelques paramètres hématologiques au terme de l'administration en étude de toxicité subaiguë.....	161
Tableau XXXVIII: Effets de l'administration de l'extrait aqueux du duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i> sur quelques paramètres sériques de la fonction hépatique et rénale au terme de l'administration en étude de toxicité subaiguë	163

LISTE DES ABREVIATIONS

ABP	: "Androgen binding protein"
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ALAT	: Alanine aminotransférase
AMPc	: Adénine monophosphate cyclique
ASAT	: Aspartate aminotransférase
CMH	: Complexe majeur d'histocompatibilité
DEH	: Dose équivalente humaine
DHEA	: Déhydroépiandrostérone
DHT	: Dihydrotestostérone
DL50	: Dose létale 50
DMO	: Densité minérale osseuse
DNPH	: 2,4-dinitrophénylhydrazine
DNTB	: Acide dinitro-2,2'-dithio-5,5'-dibenzoïque
DPPH	: 1-diphényl-2-picrylhydrazyl
ED	: Eau distillée
EDTA	: Ethylène Diamine Tétracétique
EGF	: "Epidermal Growth Factor"
eNOS	: "Endothelial Nitric Oxide Synthase"
EROs	: Espèces réactives de l'oxygène
ESM	: Erreur Standard sur la Moyenne
FRAP	: "Ferric-Reducing Antioxidant Power"
FSH	: "Follicle Stimulating Hormone"
GABA	: "Gamma Aminobutyric Acid"
GABA-T	: GABA-Transaminase
GMPc	: Guanosine Monophosphate Cyclique
GnRH	: "Gonadotrophin Releasing Hormone"
GSH	: Glutathion réduit
HDL	: "High Density Lipoprotein"
HNC	: Herbier Nationale du Cameroun
IFN-γ	: Interféron Gamma
IGF	: "Insulin-like Growth Factor"
LC-MS	: "Liquid Chromatography-Mass Spectrometry"

LDH	: Lactate déshydrogénase
LDL	: "Low Density Lipoprotein"
LH	: "Luteinizing Hormone"
MAPK	"Mitogen Activated Protein Kinase"
M-CSF	: "Macrophage Stimulating Colony Factor"
MDH	: Malate déshydrogénase
MSRO	: Modulateurs sélectifs des récepteurs d'œstradiol
NADPH+H+	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite
NED	: Naphtyléthylènediamide
NFS	: Numération formule sanguine
NF-κB	: "Nuclear Factor κB"
NO	: "Nitric Oxide"
OCDE	: Organisation de Coopération et de Développement Economique
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
PAL	: Phosphatase alcaline
<i>P. soyauxii</i>	: <i>Pterocarpus soyauxii</i>
PPARγ	: "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor"
RANK-L	: "Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand"
RE	: Récepteurs d'œstrogènes
SHBG	: "Sex Hormon Binding Globulin"
StAR	: "Steroidogenic Acute Regulatory Protein"
TBA	: Acide thiobarbiturique
TCA	: Acide trichloroacétique
THM	: Traitement hormonal de la ménopause
THS	: Traitement hormonal substitutif
TMB	: Tétraméthylbenzidine
TNF-α	: "Tumor Necrosis Factor Alpha"
UHPLC-MS	: "Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry"
VLDL	"Very Low Density Lipoprotein"
WHI	: "Women Health Initiative"
WHO	: "World Health Organisation"

RESUME

L'usage du traitement hormonal de la ménopause (THM) pour réduire les troubles liés à la ménopause est de moins en moins sollicitée à cause de ses limites et effets secondaires laissant place à la recherche des alternatives thérapeutiques. Les phyto-œstrogènes (PEs) ; agonistes des récepteurs œstrogéniques sont de plus en plus utilisés comme traitement alternatif au THM. Leurs activités œstrogénomimétiques sont cependant connues pour perturber la fonction de reproduction des femmes en âge de procréer et qui en sont exposées. L'objectif principal de ce travail était d'évaluer les effets des phyto-œstrogènes du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur quelques symptômes de la ménopause chez le rat. Pour atteindre cet objectif, une série de tests pharmacologiques a été réalisée. Le premier test a consisté à évaluer les effets œstrogéniques de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* chez la rate au cours d'un test utérotrophique classique de 3 jours. Le second test a été réalisé dans le but d'investiguer les effets de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur quelques symptômes ménopausiques chez la rate au cours d'un traitement de 28 jours. Le troisième test a été réalisé dans l'optique d'évaluer les effets de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur quelques paramètres de la fonction de reproduction chez les rates normales. Un quatrième test a été réalisé afin d'établir un profil de toxicité aiguë et subchronique de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii*. Un dernier test pharmacologique a consisté à évaluer le pouvoir antioxydant *in vitro* et la composition phytochimique qualitative et quantitative de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii*. Les résultats ont montré que l'extrait aqueux de *P. soyauxii* aux doses de 100, de 200 et de 300 mg/kg a induit une activité œstrogénique marquée par une augmentation significative de la taille de l'épithélium vaginal, du taux de protéines utérines et de la taille des acinis mammaires lors du test utérotrophique. Dans le modèle ménopausique, *P. soyauxii* aux doses de 200 et de 300 mg/kg a augmenté significativement la taille de l'épithélium vaginal et a entraîné une stratification et une cornification de l'épithélium vaginal. A ces mêmes doses, l'extrait aqueux de *P. soyauxii* a induit une activité antidépressive, anxiolytique et antiamnésique et a prévenu la dégénérescence neuronale. Cet extrait a également induit une activité antiostéoporotique marquée par une réduction sur les coupes histologiques du fémur et du tibia de la densité des lacunes de résorption, une augmentation par rapport aux animaux Ovx recevant de l'eau distillé de la densité osseuse, du taux de protéines osseuses, de glutathion réduit et une normalisation des taux sériques des paramètres du métabolisme osseux (calcium, phosphore et phosphatase alcaline). Sur les facteurs de risques des troubles cardiovasculaires post-

ménopausiques, *P. soyauxii* aux doses de 200 et de 300 mg/kg a réduit le gain pondéral et la masse relative de la graisse abdominale, a corrigé la dyslipidémie, a réduit le rapport intima/média sur les coupes de l'aorte. Chez les rates normales, aux doses de 200 et de 300 mg/kg a réduit la masse relative de l'ovaire et le nombre de follicules totaux ovariens et a modifié la durée des phases du cycle œstral. Les résultats des études toxicologiques ont montré que *P. soyauxii* a une dose létale 50 supérieur à 5000 mg/kg dans la toxicité aigüe et n'a pas entraîné en toxicité subaiguë des altérations histologiques et biochimiques au niveau du foie et du rein aux doses de 200 et de 400 mg/kg. Les analyses phytochimiques qualitatives de l'extrait ont permis de mettre en évidence la présence des composés bioactifs tels que les alcaloïdes, les saponines, les flavonoïdes. L'analyse LC-MS a permis de mettre en évidence la présence des molécules telles que l'acide linoléique, le mono (2-ethylhexyl) phthalate et le 3',5'-dimethoxy-4-stilbenol. L'extrait a aussi présenté une activité antioxydante *in vitro* vis-à-vis du DPPH, de l'ABTS et du FRAP. Les présents résultats justifieraient l'utilisation empirique de *P. soyauxii* pour la prise en charge des troubles ménopausiques mais son usage doit être limité chez les femmes pré-ménopausées nourrissant le désir d'avoir un enfant.

Mots clés : *Pterocarpus soyauxii*, Ménopause, œstrogénique, perturbation endocrinienne, toxicité.

ABSTRACT

The use of hormonal treatment of menopause (HRT) to reduce menopausal disorders is less and less solicited because of its limitations and side effects leaving room for the search of therapeutic alternatives. Phytoestrogens (PEs); estrogen receptor agonists are increasingly used as an alternative treatment to HRT. However, their estrogenic activities are known to disrupt the reproductive function of women of childbearing age who are exposed to them. The main objective of this work was to evaluate the effects of phytoestrogens from *Pterocarpus soyauxii* heartwood on some menopausal symptoms in rats. To achieve this objective, a series of pharmacological tests were performed. The first test consisted in evaluating the estrogenic effects of the aqueous extract of the duramen of *Pterocarpus soyauxii* in the rat during a classical 3-day uterotrophic test. The second test was carried out in order to investigate the effects of the aqueous extract of the duramen of *Pterocarpus soyauxii* on some menopausal symptoms in the rat during a 28 days treatment. The third test was performed to evaluate the effects of the aqueous extract of *Pterocarpus soyauxii* heartwood on some parameters of the reproductive function in normal rats. A fourth test was carried out in order to establish an acute and subchronic toxicity profile of the aqueous extract of *P. soyauxii* heartwood. A last pharmacological test consisted in evaluating the *in vitro* antioxidant power and the qualitative and quantitative phytochemical composition of the aqueous extract of *Pterocarpus soyauxii* heartwood. The results showed that the aqueous extract of *P. soyauxii* at doses of 100, 200 and 300 mg/kg induced estrogenic activity marked by a significant increase in the size of the vaginal epithelium, uterine protein level and mammary acini size in the uterotrophic test. In the menopausal model, *P. soyauxii* at doses of 200 and 300 mg/kg significantly increased the size of the vaginal epithelium and induced stratification and cornification of the vaginal epithelium. At the same doses, aqueous extract of *P. soyauxii* induced antidepressant, anxiolytic and anti-amnesic activity and prevented neuronal degeneration. This extract also induced an anti-osteoporotic activity marked by a reduction on histological sections of femur and tibia of the density of resorption lacunae, an increase compared to Ovx animals receiving distilled water of bone density, bone protein level, reduced glutathione and normalization of serum levels of bone metabolism parameters (calcium, phosphorus and alkaline phosphatase). On risk factors for postmenopausal cardiovascular disorders, *P. soyauxii* at doses of 200 and 300 mg/kg reduced weight gain and relative abdominal fat mass, corrected dyslipidemia, reduced intima/media ratio on aortic sections. In normal rats, at 200 and 300 mg/kg reduced the relative mass of the ovary and the number of total ovarian follicles and altered the duration of estrous

cycle phases. The results of the toxicological studies showed that *P. soyauxii* has a lethal dose 50 higher than 5000 mg/kg in acute toxicity and did not induce in subacute toxicity histological and biochemical alterations at the level of liver and kidney at the doses of 200 and 400 mg/kg. The qualitative phytochemical analyses of the extract allowed to highlight the presence of bioactive compounds such as alkaloids, saponins, flavonoids. The LC-MS analysis revealed the presence of molecules such as linoleic acid, mono (2-ethylhexyl) phthalate and 3',5'-dimethoxy-4-stilbenol. The extract also showed *in vitro* antioxidant activity against DPPH, ABTS and FRAP. The present results would justify the empirical use of *P. soyauxii* for the management of menopausal disorders but its use should be limited in pre-menopausal women with the desire to have a child.

Key words: *Pterocarpus soyauxii*, Menopause, estrogenic, endocrine disruption, toxicity

INTRODUCTION

Les œstrogènes sont des hormones secrétées majoritairement au sein des cellules folliculaires ovariennes (Cui *et al.*, 2013). Leurs actions passent principalement par les récepteurs aux œstrogènes (ERs) de type alpha (ER α) et beta (ER β) mais aussi par les récepteurs membranaires (Heldring *et al.*, 2007 ; Drummond et Peter, 2010). L'ubiquité de l'expression des REs fait des œstrogènes, des hormones capables d'exercer des actions physiologiques au sein de nombreux systèmes parmi lesquels, le système de reproduction féminin, le système osseux, le système nerveux et le système cardiovasculaire (Brandenberger, 1997 ; Drummond et Peter, 2010). L'administration des œstrogènes exogènes inhibe chez la femme en pré-ménopause le complexe hypothalamo-hypophysaire avec pour conséquence une baisse de la production de gonadolibérines, des gonadotrophines et de ce fait une inhibition de la folliculogénèse (Petersen *et al.*, 1995 ; Radovick *et al.*, 2012).

La concentration sérique des œstrogènes diminue progressivement et parallèlement avec la perte de l'activité folliculaire ovarienne (OMS, 1996). Cette déficience œstrogénique est associée à un ensemble de troubles qui constituent le syndrome ménopausique. On y trouve entre autres, les troubles vasomoteurs, la sécheresse vaginale, l'atrophie des organes génitaux (Keating *et al.*, 1999 ; Marta *et al.*, 2014 ; Muhammad *et al.*, 2021), les perturbations neuropsychiques, l'ostéoporose et le développement des facteurs de risque des maladies cardiovasculaires (Muhammad *et al.*, 2021 ; Robin *et al.*, 2021, Mengue *et al.*, 2021). La ménopause correspond en effet à un phénomène naturel défini comme un arrêt permanent des menstruations aux alentours de 50 ans (OMS, 1996). Des enquêtes épidémiologiques aux états unis d'Amérique soutiennent que, environ 75-82% de femmes ménopausées souffrent des bouffées de chaleur et des troubles vasomoteurs, 20-80% des troubles neuropsychiques (Monteleone *et al.*, 2018 ; Mozghan *et al.*, 2020), 12% souffrent du gain pondéral (Sussman *et al.*, 2015), 54% du syndrome génito-urinaire (DiBonaventura *et al.*, 2015), 34% de l'ostéoporose (Choi *et al.*, 2021) et environ 70% en Iran se plaignent d'une augmentation de la pression artérielle et des complications cardiovasculaires (Mozghan *et al.*, 2020). En Afrique sub-saharienne et plus précisément au Cameroun, environ 57% des femmes ménopausées souffrent des bouffées de chaleurs, 66% de perte de la libido, 32% du gain pondéral, 47% des troubles nerveux et 62% souffrent des douleurs articulaires (Mengue *et al.*, 2021). De manière générale, il est établi que, environ 80% des femmes ménopausées ont vu leur qualité de vie se dégrader du fait de la déficience œstrogénique associée à la ménopause (Woods et Mitchell, 2005).

La prise en charge du syndrome ménopausique par la médecine conventionnelle est basée essentiellement sur le Traitement Hormonal de la Ménopause (THM) qui utilise les œstrogènes

de synthèse. Ce THM est associé à un risque accru de développement des cancers œstrogénodépendants et des thromboembolies (British Menopause Society, 2020). Ces raisons constituent des limites à l'usage du THM. La découverte des alternatives thérapeutiques au THM reste donc une urgence médicale. De nombreuses études sont entreprises dans cette optique et explorent les effets œstrogéniques et thérapeutiques des plantes médicinales (Telefo *et al.*, 2002 ; Dzeufiet *et al.*, 2015 ; Oumarou *et al.*, 2017 ; Ngoungouré *et al.*, 2019 ; Djiogue *et al.*, 2020 ; Mengue *et al.*, 2023). Certaines de ces études ont rapporté des effets bénéfiques de ces plantes sur la prise en charge de certains symptômes de la ménopause chez les rates (Zingué *et al.*, 2015 ; Dzeufiet *et al.*, 2015 ; Ngoungouré *et al.*, 2019 ; Djiogue *et al.*, 2020 ; Mengue *et al.*, 2023). Ces propriétés thérapeutiques seraient attribuées à des molécules appelées phyto-œstrogènes (PEs) (Mvondo *et al.*, 2012 ; Djiogue *et al.*, 2014).

Le terme phyto-œstrogène désigne une molécule issue des plantes et possédant une structure chimique proche de celle du 17 β -œstradiol et qui peut induire des effets similaires à ceux des œstrogènes animaux en se fixant sur les REs (Runeton, 2009). Les PEs atténuent les symptômes dues à la déplétion œstrogénique tels que, les bouffées de chaleur, les troubles neuropsychiques, l'ostéoporose et les maladies cardiovasculaires (Howes *et al.*, 2000 ; Al-Anazi *et al.*, 2011 ; Zingué *et al.*, 2017). Au-delà de leurs effets thérapeutiques, les PEs ont un caractère perturbateur endocrinien qui impacte négativement la physiologie de l'appareil reproducteur chez les femmes non ménopausées (Jefferson *et al.*, 2007). En effet, lorsqu'ils sont ingérés par des animaux, les PEs peuvent agir comme modulateurs sélectifs des REs et comme perturbateurs endocriniens de manière agoniste ou antagoniste selon la dose ingérée (Adams, 1995 ; Di Gioia et Petropoulos, 2019) ; interférant ainsi avec la synthèse, la sécrétion, le transport et le métabolisme des hormones de reproduction au cours du développement embryonnaire et à l'âge adulte (Cederroth et Zimmermann, 2012 ; Shanle et Xu, 2011). Cette activité perturbatrice endocrinienne est susceptible d'entraîner une infertilité chez de nombreuses espèces (Hanan *et al.*, 2021).

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), 80 % de la population dans les pays à faibles revenus utilise la phytothérapie pour leurs soins de santé primaires (WHO, 2019). Certaines plantes de cette pharmacopée sont utilisées pour traiter les troubles ménopausiques du fait de leurs activités œstrogéniques (Mvondo *et al.*, 2012 ; Zingue *et al.*, 2014 ; Dzeufiet *et al.*, 2015, Ngoungouré *et al.*, 2017 ; Djiogue *et al.*, 2020; Mengue *et al.*, 2023). Elles sont en même temps utilisées pour traiter d'autres maladies variées chez les femmes sans une cause œstrogénopénique (Ezeja *et al.*, 2014 ; Zingue *et al.*, 2015 ; Mezui *et al.*, 2015 ; Oumarou *et*

al., 2017). Malgré cette importante utilisation, peu de travaux scientifiques sont entrepris pour vérifier l'efficacité des plantes aux propriétés œstrogéniques suspectées dans le traitement des troubles ménopausiques et leur caractère perturbateur endocriniens sur le système reproducteur des femelles en pré-ménopause. De même, l'utilisation des plantes comme médicament qui est une pratique ancienne (Balick et Paul, 1996) ; l'une des urgences de la phytothérapie est d'évaluer le profil toxicologique des plantes afin d'établir les limites de sécurité (Yemele *et al.*, 2016 ; Stanley *et al.*, 2020; Essama *et al.*, 2020).

Pterocarpus soyauxii qui a fait l'objet de cette étude est une plante de la famille des Fabacées dont le duramen est utilisé pour le traitement de l'aménorrhée primaire et secondaire ; deux symptômes dont l'une des hypothèses physiopathologiques est associée à l'hypo-œstrogénie (Viswanathan et Eugster, 2011) et des troubles ménopausiques (Mengue *et al.*, 2023). *Pterocarpus soyauxii* est également employée pour la prise en charge du diabète sucré, de l'hypertension artérielle, du paludisme et des ulcères gastroduodénaux (Saslis-Lagoudakis *et al.*, 2011). Les travaux de Bezuidenhoudt *et al.* (1987) ont montré que le duramen de *Pterocarpus soyauxii* contient la prunétine, le ptérostilbène et le dalbergin. Ces molécules ont présenté des propriétés œstrogéniques dans les travaux de Pan *et al.* (2014) et ceux de Piegholdt *et al.* (2016). Toutefois, aucune étude n'a été réalisée pour vérifier l'œstrogénicité et les propriétés thérapeutiques du duramen de *P. soyauxii* sur le syndrome ménopausique ainsi que son impact sur la fonction de reproduction des femelles normales et son profil toxicologique. Au regard des usages ethnopharmacologiques du duramen de *P. soyauxii* et sa composition phytochimique, on se pose la question de savoir si le duramen de *P. soyauxii* serait indiqué pour la prise en charge des troubles liés à la ménopause.

OBJECTIFS

L'objectif principal de ce travail était d'évaluer les effets des phyto-œstrogènes du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur quelques symptômes de la ménopause chez la rate. De manière spécifique, le travail a consisté à évaluer :

1. les effets œstrogéniques de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* chez la rate au cours d'un test utéro-trophique classique;
2. les effets de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur quelques symptômes ménopausiques chez la rate ;
3. les effets de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur quelques paramètres de la fonction de reproduction chez les rates normales ;
4. le profil toxicologique en étude aiguë et subaiguë de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* ;

**CHAPITRE I :
REVUE DE LA
LITTERATURE**

I.1- Généralités sur les œstrogènes

I.1.1- Définition et typologie

Les œstrogènes sont des hormones sexuelles lipophiles synthétisées principalement au niveau des gonades, mais également, dans une moindre mesure au niveau des tissus ou organes périphériques. Basée sur un noyau œstrane, leur structure chimique est constituée de quatre cycles hydrocarbonés, pour un total de 18 atomes de carbone (Asenzi *et al.*, 2006). Différentes modifications, comme des substitutions de groupements méthyle ou hydroxyle différencient les molécules de cette famille. Quatre formes d'œstrogènes endogènes ont été identifiées (Figure 1) :

- l'œstrone (E_1),
- le 17β -œstradiol (E_2), œstrogène endogène le plus puissant,
- l'œstriol (E_3), « produit de dégradation » se retrouvant essentiellement chez la femme enceinte et
- l'œstétrol (E_4).

Ce dernier synthétisé à partir d'œstradiol et d'œstrone au niveau du foie du fœtus a également été retrouvé dans le plasma de femmes enceintes (Engel, 1957 ; Diczfalusy et Mancuso, 1965).

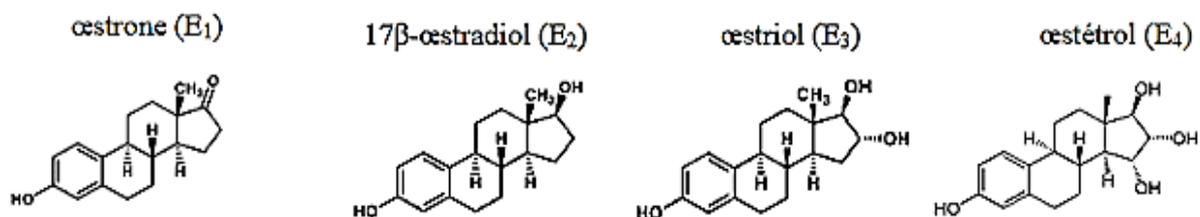


Figure 1: Formules chimiques développées des œstrogènes naturels (Engel, 1957 ; Diczfalusy et Mancuso, 1965).

I.1.2- Biosynthèse des œstrogènes

Chez la femme, la synthèse des œstrogènes s'effectue à partir du cholestérol, pendant la phase folliculaire (Figure 2). La dégradation de la chaîne latérale du cholestérol, molécule à 27 atomes de carbone, ainsi que de multiples réactions d'oxydoréduction et d'hydrolyse conduisent à la formation d'androgènes (19C), précurseurs des œstrogènes (18C), par les cellules de la thèque interne. Le complexe aromatasase, assurant la conversion des androgènes en œstrogènes, est constitué du cytochrome P450 et de la NADPH-cytochrome P450 réductase,

sous-unités très conservées chez les vertébrés, suggérant leur importance biologique (Conley et Hinshelwood, 2001). Chez l'humain, le gène *cyp19* codant pour le cytochrome P450 est sous la dépendance de promoteurs tissu-spécifiques et est épissé de façon différentielle selon le tissu considéré. La protéine formée ne change pas, mais ce mécanisme permet une régulation distincte de l'aromatase selon le site d'expression (Meinhardt et Mullis, 2002). Une 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (17 β -HSD) assure l'interconversion réversible œstrone/œstradiol, alors qu'une 16- α -hydroxylase (exprimée dans le foie et le placenta) permet la formation de l'œstriol à partir de l'œstrone ou de l'œstradiol. Il existe également une synthèse d'œstrogènes au niveau des glandes corticosurrénales, qui possèdent aussi l'activité aromatase

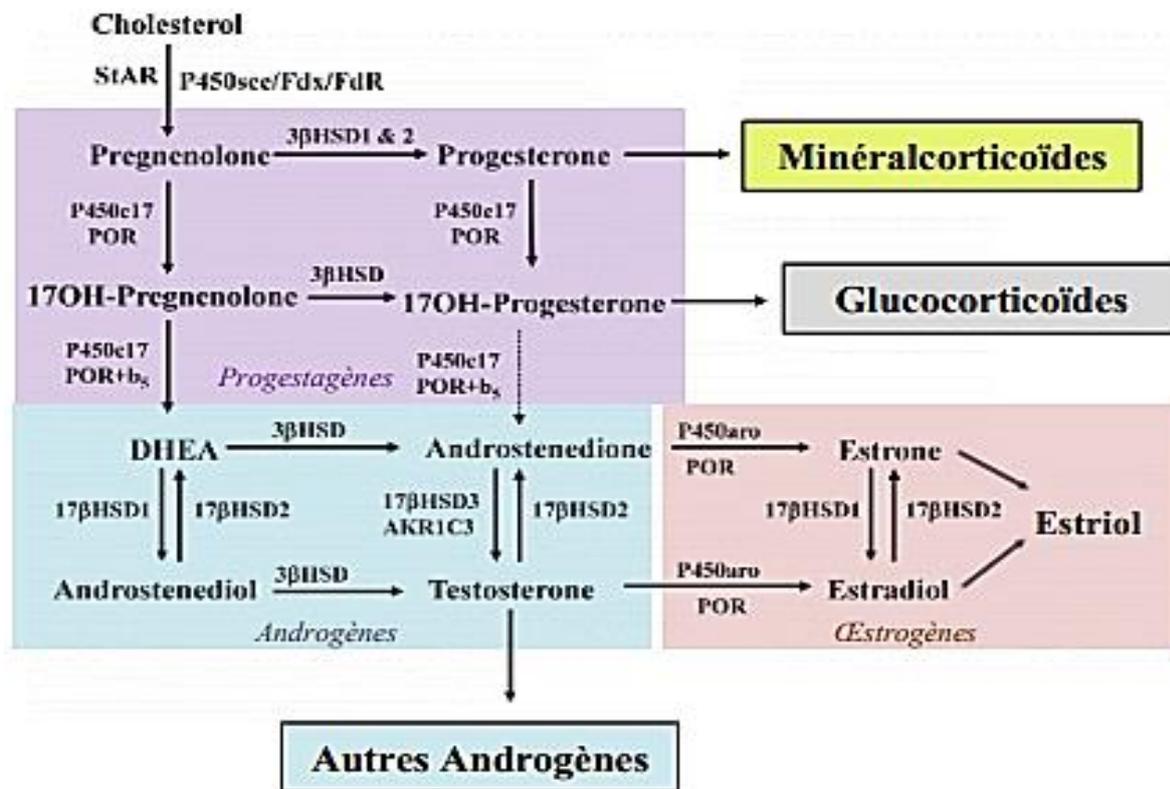


Figure 2: Biosynthèse des stéroïdes sexuels (Miller et Auchus, 2011).

17 β -HSD = 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase, 3 β -HSD = 3-hydroxystéroïde déshydrogénase, P450SCC = "Cholesterol side-chain cleavage enzyme".

I.1.3- Transport des œstrogènes

Les œstrogènes sont de nature non protéique. Ils doivent être transportés par des transporteurs de nature protéique pour pouvoir diffuser jusqu'aux récepteurs situés au niveau du noyau. Le transporteur empêche la dégradation de l'hormone et est aussi une forme de réserve de l'hormone (Hammond, 2016). Chez la femme, les œstrogènes sont transportés dans le sang, liés à des protéines de transport : une faible concentration seulement de l'œstrogène

(E2) circulant est sous forme libre (Mendel, 1992), le reste étant soit lié de façon non spécifique et avec peu d'affinité à l'albumine (Hammond, 2016) ; soit de façon spécifique et avec une forte affinité à la globuline liant les stéroïdes sexuels (SHBG : *Sex Hormon binding globulin*) (Grishkovskaya *et al.*, 2000).

I.1.4- Récepteurs aux œstrogènes

Le récepteur aux œstrogènes (REs) est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires dont la fonction, médiée par l'œstradiol, est l'activation de la transcription de gènes impliqués notamment dans la croissance, la différenciation cellulaire et les fonctions reproductrices. Il existe trois formes de récepteurs aux œstrogènes : RE α , RE β et ER γ . Les isotypes RE α et RE β sont retrouvés chez toutes les espèces alors que l'isotype ER γ n'a été identifié que chez certaines espèces de poissons (Hawkins *et al.*, 2000 ; Ma *et al.*, 2000 ; Menuet *et al.*, 2002).

I.1.4.1- Structure des récepteurs aux œstrogènes

Les REs présentent six domaines structuraux notés de A à F de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale (Krust *et al.*, 1986) (Figure 3). Le domaine A/B est le domaine présentant la plus grande variabilité entre les espèces, aussi bien en taille qu'en homologie de séquences. Cette région présente une fonction de trans-activation qui active l'expression de gènes cibles en l'absence d'hormone (AF-1), des sites de phosphorylation et de sumoylation (Hall et McDonnell, 1999). La région AF-2 quant à elle possède une fonction de trans-activation dépendante de la présence de l'hormone (AF-2) (Hall et McDonnell, 1999). Le domaine C se caractérise par la présence d'une séquence particulière permettant la fixation spécifique à des séquences d'ADN nommées *Estrogen Responsive Element* (ERE). Cette région est aussi impliquée dans la dimérisation du récepteur (Ruff *et al.*, 2000). Le domaine D est le siège de modifications post-traductionnelles (Wang *et al.*, 2002). Le domaine E est un domaine possédant de multiples fonctions. Il présente également une interface de dimérisation, une fonction de trans-activation dépendante de la présence de l'hormone (AF-2) ainsi que des sites de fixation de coactivateurs et de HSP90 (Nilsson *et al.*, 2001).

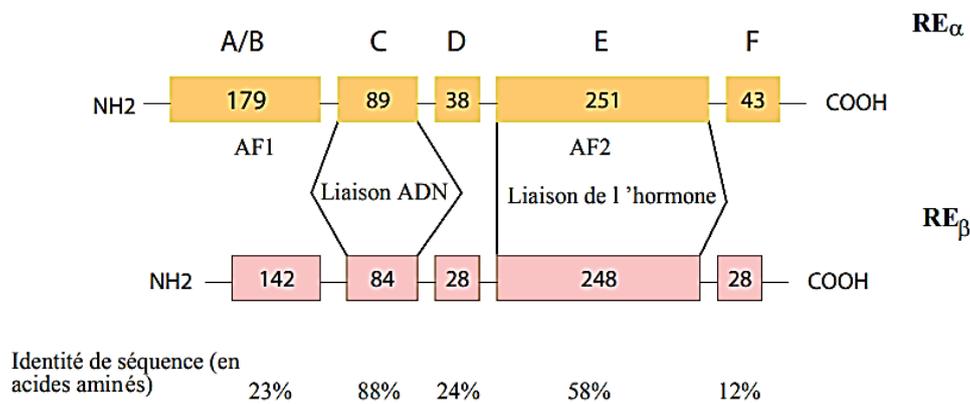


Figure 3 : Organisation structurale et fonctionnelle des isotypes α et β du récepteur aux œstrogènes humain (Metivier *et al.*, 2002).

AF-1 = "Activation Function-1"; **AF-2** = "Activation Function-2".

I.1.4.2- Distribution des récepteurs aux œstrogènes

Une fois synthétisées, les œstrogènes fonctionnent comme des hormones systémiques. Elles sont libérées dans la circulation sanguine pour atteindre leurs tissus cibles exprimant les récepteurs des œstrogènes (RE). Les récepteurs des œstrogènes alpha ($RE\alpha$) et beta ($RE\beta$) sont exprimés en quantité variable au niveau des glandes mammaires, des os, de l'utérus, des poumons, des testicules, de la prostate, de l'épididyme et des organes des systèmes nerveux et cardiaque (Couse *et al.*, 1999; Nilsson *et al.*, 2001). Les ovaires, le foie, les reins et l'hypophyse, contiennent que les $RE\alpha$ et ou les $RE\beta$ (Couse *et al.*, 1999). Au niveau de la glande mammaire, les $RE\alpha$ sont plutôt exprimés au niveau des cellules épithéliales luminales, tandis que les $RE\beta$, moins localisés, se retrouvent dans les cellules épithéliales et stromales (Krege *et al.*, 1998) (Figure 4).

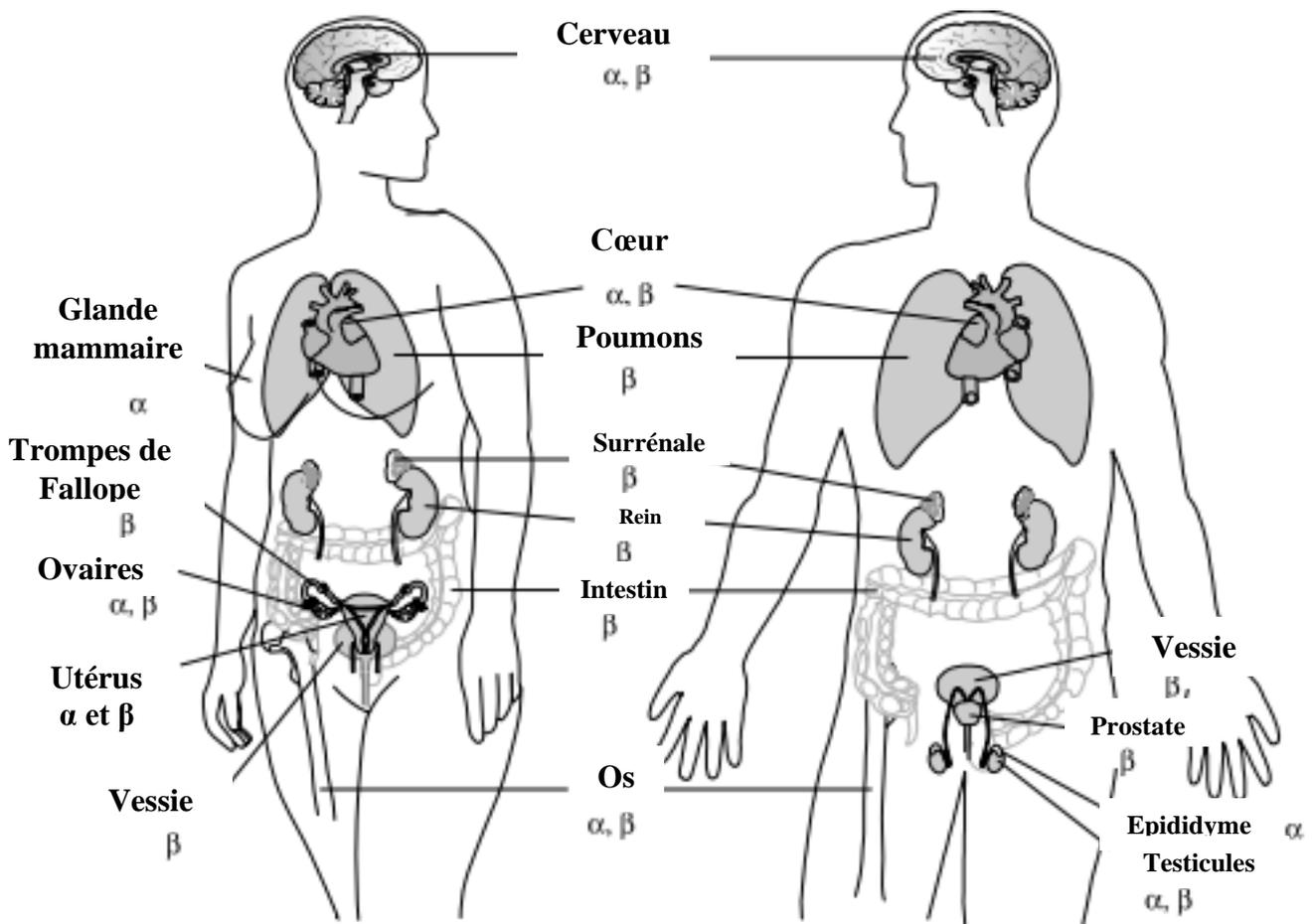


Figure 4: Répartition tissulaire de l'expression de RE α et de RE β (Drummond et Peter, 2010).

RE α = Récepteur aux œstrogènes de type alpha, RE β = Récepteur aux œstrogènes de type beta.

I.1.5- Mécanismes d'action des récepteurs aux œstrogènes

Les récepteurs aux œstrogènes régulent l'expression de nombreux transcrits à la fois positivement et négativement. Ils contrôlent ainsi différents processus cellulaires tels que la prolifération et l'apoptose (Frasor *et al.*, 2003). Il existe 3 voies de signalisation liées à l'activation des récepteurs aux œstrogènes et qui régulent in fine la transcription des gènes cible (Cui *et al.*, 2013).

- La voie génomique dépendante des œstrogènes qui permet l'activation du domaine AF-2 (Figure 5) ;
- La voie non génomique à effet rapide induite via la liaison des œstrogènes aux REs membranaires activant ainsi les voies de signalisation en aval (Figure 5) et
- La voie indépendante du ligand, c'est-à-dire indépendante des œstrogènes où l'activité transcriptionnelle d'RE α est induite suite à l'activation des voies de signalisation.

I.1.5.1- Voie génomique dépendante des œstrogènes

En l'absence de ligand, les récepteurs aux œstrogènes α et β sont associés à un complexe multiprotéique constitué par des protéines chaperonnes (HSP70 (*heat shock proteins* 70), HSP90) elles-mêmes associées à des co-chaperonnes (HSP40, P23) et à des immunophilines (cyclophiline 40) (Pratt *et al.*, 2004; Tecalco-Cruz *et al.*, 2017). Ce complexe chaperon participe à la navette nucléocytoplasmique des ER et apparaît indispensable à la localisation majoritairement nucléaire d'ER α observée en l'absence de ligand (Tecalco-Cruz *et al.*, 2017). Ce complexe multiprotéique permet aux REs d'acquérir une conformation optimale nécessaire à la liaison de leur ligand permettant ainsi leur activité transcriptionnelle (Fliss *et al.*, 2000 ; Tecalco-Cruz *et al.*, 2017).

I.1.5.1- Voies kinasiques liées aux REs membranaires et dépendante de l'œstradiol

Dans la cellule, en plus des effets génomiques observés à long terme, l'activation de la signalisation œstrogénique induit des effets en quelques secondes ou quelques minutes (Russell *et al.*, 2000 ; Szego and Davis, 1967). Ces effets rapides, qualifiés de « non génomiques » sont induits par l'activation des ER exprimés à la membrane (Klinge, 2015) et du récepteur GPER/GPR30 (*G-protein coupled estrogen receptor/G-protein coupled receptor* 30) (Thomas *et al.*, 2005).

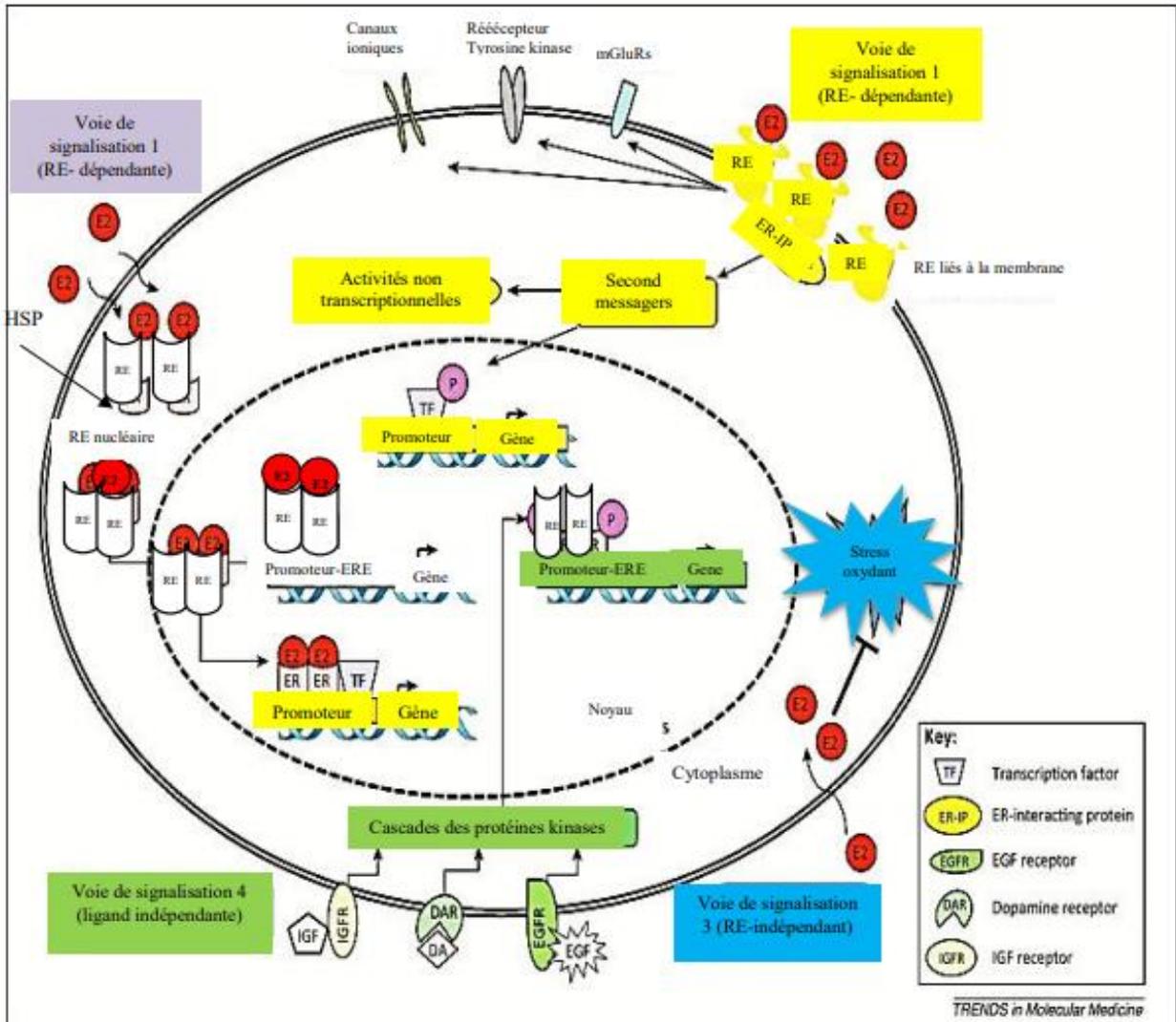


Figure 5 : Schéma récapitulatif du mécanisme d'action des récepteurs des œstrogènes (Laurentino *et al.*, 2012).

mGluRs = récepteurs métabotropiques du glutamate ; **E2** = œstradiol ; **RE** = récepteur des œstrogènes ; **TF** = Facteur de transcription ; **EGF (-R)** = (récepteur du) facteur de croissance endothélial ; **IGF (-R)** = (récepteur du) facteur de croissance de l'insuline ; **DA (R-)** = (récepteur de la) dopamine ; **ER-IP** = Protéine interactive du récepteur aux œstrogène ; **HSP** = Protéine de choc thermique.

I.1.5.3- Voie non génomique de la signalisation par les œstrogènes

De nombreuses observations montrent que les œstrogènes exercent des effets très rapides ne pouvant être expliqués par l'activation de la transcription et la synthèse de protéines. Ces effets non transcriptionnels incluent :

- la mobilisation du calcium intracellulaire ;

- la stimulation des adénylates cyclases et l'activation des voies de signalisation des MAPK kinases (Migliaccio *et al.*, 1996 ; Improta-Brears *et al.*, 1999).

Les effets non transcriptionnels des œstrogènes ont été attribués à une fraction de récepteur des œstrogènes localisée au niveau de la membrane plasmique (Li *et al.*, 2003). Cette localisation membranaire a été attribuée à une palmitoylation de la cystéine 447 (Li *et al.*, 2003, Acconcia *et al.*, 2004). Le mécanisme des effets non transcriptionnels des œstrogènes est mis en évidence dans le système cardiovasculaire. Les œstrogènes permettent la vasodilatation en l'espace de quelques secondes (Gilligan *et al.*, 1994) et ce, en induisant la synthèse de l'oxyde nitrique (NO) au niveau des cellules endothéliales par l'acide nitrique synthétase (eNOS) (Lantin-Hermoso *et al.*, 1997).

I.1.6- Effets physiologiques des œstrogènes

I.1.6.1- Œstrogènes, développement du tractus génital féminin et de la glande mammaire

Les œstrogènes jouent un rôle prépondérant dans le système reproducteur féminin. Bien qu'ils soient cruciaux pour la détermination des caractères sexuels féminins, ils ne semblent pas indispensables à la différenciation du tractus reproducteur (Lubahn *et al.*, 1993 ; Krege *et al.*, 1998). En effet, les souris ERKO ne répondant pas aux œstrogènes présentent un utérus hypoplasique malgré un développement normal. De même, leurs ovaires semblent normaux jusqu'à la puberté, puis deviennent hémorragiques et anovulaires (Lubahn *et al.*, 1993 ; Curtis et Korach, 2000). Par contre, les souris ArKO (dont le gène des aromatasases a été inactivé), n'exprimant pas les aromatasases et ne produisant ainsi aucun œstrogène sont plus sévèrement touchées : leurs organes génitaux externes et leur utérus sont sous-développés. Néanmoins, la sévérité du phénotype serait non seulement dû à l'absence d'œstrogènes mais aussi à des niveaux plus élevés d'androgènes (Fisher *et al.*, 1998).

De façon similaire, les œstrogènes ne semblent pas influencer le développement fœtal des glandes mammaires, mais seulement celui se produisant après la puberté (au cours de la gestation et de la lactation) (Daniel *et al.*, 1987 ; Silberstein *et al.*, 1994 ; Fisher *et al.*, 1998). En effet, les glandes mammaires des mammifères restent dans un état relativement indifférencié jusqu'à la production cyclique d'œstrogènes et de progestérones par les ovaires. En absence de fonction ovarienne, le développement de la glande mammaire ne se fait pas. Néanmoins, dans ce cas, une thérapie œstrogénique de remplacement peut permettre son induction (Laron *et al.*, 1989). A chaque cycle ovarien, les canaux galactophores de la glande mammaire se développent pour régresser par la suite. La glande mammaire ne devient fonctionnelle qu'au cours de gestation et de la lactation. A ce moment, les œstrogènes et la

prolactine stimulent la croissance et la différenciation des épithéliums des canaux galactophores et alvéoles mammaires. A la fin de la lactation, la glande mammaire involue, par l'apoptose massive des cellules, pour retrouver une simple structure ductale.

I.1.6.2- Œstrogènes, complexe hypothalamo-hypophysaire et le cycle ovarien

Chez la femme, les œstrogènes influencent les sécrétions des hormones hypophysaires FSH (Hormone Folliculo Stimulante) et LH (Hormone Lutéinisante), qui elles-mêmes contrôlent les sécrétions de stéroïdes, la gamétogenèse et l'ovulation (Nilsson *et al.*, 2001). De par cette régulation, les œstrogènes exercent une boucle de rétrocontrôle, tantôt positive, tantôt négative, sur leur propre production. A la fin de la phase folliculaire, ils stimulent la libération de LH et FSH par l'hypophyse, sous contrôle de la GnRH (gonadolibérine ou *Gonadotropin Releasing Hormone*) libérée par l'hypothalamus. Les œstrogènes vont alors agir sur la maturation du follicule. A l'inverse, lors de la phase lutéale, après l'ovulation, ils vont exercer une boucle de rétrocontrôle négative et inhiber la libération des hormones hypophysaires (avec la progestéro

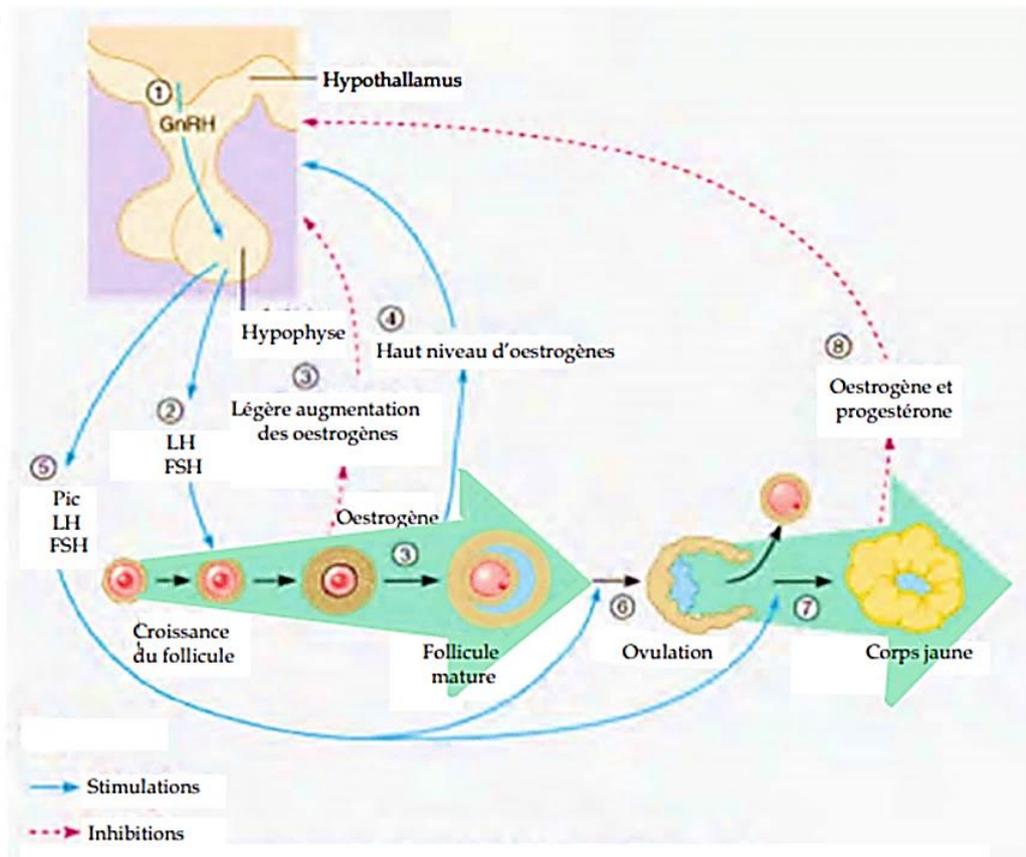


Figure 6: Contrôle de la production des œstrogènes au cours du cycle ovarien par l'axe hypothalamo-hypophysaire (Dupont, 2011).

I.1.6.3- Œstrogènes et système osseux

Les œstrogènes et les androgènes influencent à la fois le développement et le maintien du tissu osseux (Turner, 1990 ; Turner *et al.*, 1999). Ce dernier est toujours dans un état d'équilibre dynamique par un constant remodelage. L'homéostasie osseuse repose sur la synthèse de la matrice osseuse par les ostéoblastes, tandis que les ostéoclastes la résorbent. Concrètement, les œstrogènes induisent l'apoptose des ostéoclastes (Kameda *et al.*, 1997), tandis qu'ils ont l'effet inverse, anti-apoptotique, sur les ostéoblastes (Tomkinson *et al.*, 1998 ; Kousteni *et al.*, 2001). Les œstrogènes sont particulièrement importants chez les femmes pour maintenir leur densité osseuse. Ceci est mis en évidence par le développement d'ostéoporose chez les femmes à la ménopause ou suite à une ovariectomie (Turner, 1994 ; Turner *et al.*, 1999). En effet, lors de la ménopause, de nombreuses femmes risquent d'être atteintes d'ostéoporose et de voir leur densité osseuse diminuée, leurs os se fragilisent. L'ostéoporose résulte de la rupture de l'équilibre entre synthèse et résorption par les ostéoblastes et ostéoclastes et peut être prévenue par l'administration d'œstrogènes exogènes. La culture d'ostéoblastes de souris a permis de montrer que l'effet anti-apoptotique de l'œstradiol pouvait être induit par l'activation rapide de la voie Src/ERK (Kousteni *et al.*, 2001). De l'œstradiol est capable d'inhiber RANK-L (*Receptor Activator of NF-κB-Ligand*) et d'augmenter la production d'OPG (osteoprotegerin), deux cytokines fortement impliquées dans le remodelage osseux (Figure 7).

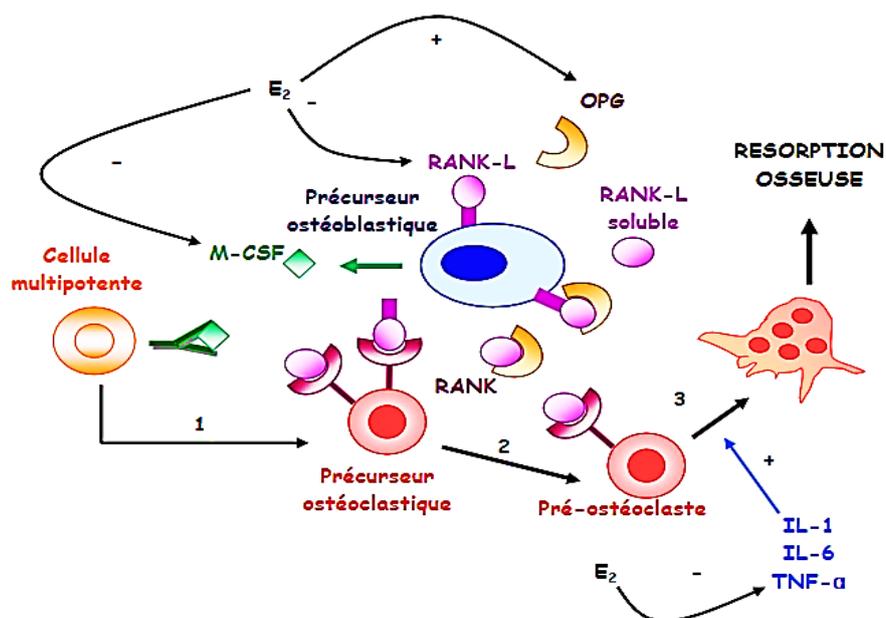


Figure 7: Effet de l'œstradiol sur différents facteurs influençant l'activité des ostéoclastes (Hofbauer *et al.*, 2000).

1 = La cellule multipotente est stimulée par M-CSF, qui lié à son récepteur, fait proliférer la cellule, qui devient un précurseur ostéoclastique, **2** = La liaison de RANK-L à son récepteur induit la différenciation de la cellule, qui devient alors un ostéoclaste en pré-fusion. L'OPG peut bloquer cet effet en neutralisant RANK-L et **3** = RANK-L, ainsi que les cytokines IL-1, IL-6 ou le TNF- α , stimulent la fusion des cellules. Les ostéoclastes sont alors activés et prêts à résorber l'os. **IL** = Interleukine, **E₂** = Oestradiol, **TNF- α** = "Tumor Necrosis Factor alpha", **M-CSF** = "Macrophage Colony-Stimulating Factor".

I.1.6.4- Œstrogènes et système nerveux

La vaste distribution des sites de fixation des œstrogènes au niveau du système nerveux central (cortex, hypothalamus, amygdale, etc.) met en valeur leur implication dans de nombreux processus nerveux (Couse *et al.*, 1999 ; Nilsson *et al.*, 2001 ; Singh *et al.*, 2006). Ils seraient, par exemple, impliqués dans les processus mnésiques et la différenciation du système nerveux entre les sexes (Couse *et al.*, 1999 ; Nilsson *et al.*, 2001). Les œstrogènes auraient également des fonctions neuroprotectrices face à des pathologies telles qu'Alzheimer et de Parkinson (Li *et al.*, 2005). Des études sur des cellules en culture ou des modèles animaux mettent en avant l'impact des œstrogènes sur la synaptogénèse, la protection contre l'apoptose et l'inflammation (Garcia-Segura *et al.*, 2001 ; Currie *et al.*, 2004).

I.1.6.5- Œstrogènes et système cardiovasculaire

L'augmentation des maladies cardio-vasculaires de façon concomitante avec la chute du taux d'œstrogènes circulant à la ménopause laisse entrevoir une implication possible de ces derniers comme agents protecteurs dans les maladies cardio-vasculaires (Guzzo, 2000).

Cependant le rôle protecteur des œstrogènes contre ces pathologies ne fait pas l'unanimité. Certaines études tendent à démontrer que les femmes ménopausées à haut risque de maladies cardiovasculaires qui bénéficient d'un THM ont des dommages réduits suite aux attaques cardiovasculaires par rapport à celles non traitées (Node *et al.*, 1997 ; Douglas *et al.*, 1998). Par contre, d'autres études indiquent que les femmes ménopausées ne présentent aucun bénéfice cardiovasculaire en réponse à des traitements avec œstrogènes et progestines. Le rôle vasodilatateur des œstrogènes est néanmoins clairement démontré (Kuiper *et al.*, 1998) ; ils régulent les molécules telles que le NO (oxyde nitrique) ou l'endothéline-1, et le récepteur de l'angiotensine II (Nilsson *et al.*, 2001). Les œstrogènes jouent également un rôle protecteur contre l'hypercholestérolémie en augmentant le rapport HDL/LDL, effet contrecarré par les anti-œstrogènes (Kuiper *et al.*, 1998 ; Nilsson *et al.*, 2001). La figure 8 récapitule les effets des œstrogènes chez la femme.

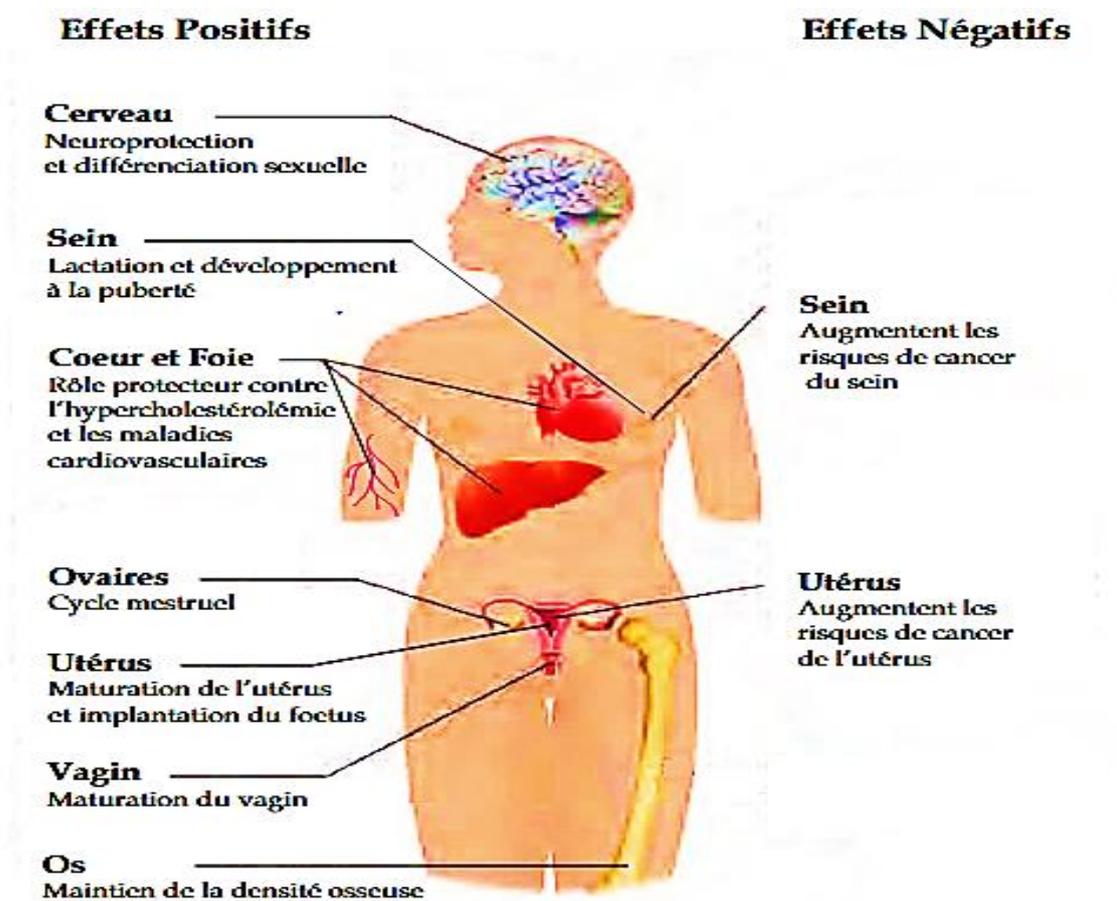


Figure 8: Effets des œstrogènes sur quelques organes de l'organisme (Dupont, 2011).

I.1.6.6- Cycle œstral chez la rate et œstrogènes

Le cycle œstral correspond à l'activité cyclique des ovaires caractérisée par des changements morphologiques et physiologiques dans l'utérus. Ce dernier est divisé en quatre parties : le diestrus (phase lutéale), le proestrus (phase folliculaire), l'œstrus (ovulation) et le métestrus (Levasseur *et al.* 2001) (Figure 9).

Le proestrus correspond à la phase de maturation folliculaire. Durant cette phase, le taux d'œstrogènes sécrétées par les ovaires est élevé. Cette période peut durer plus de 60 heures et ce n'est qu'à la fin de celle-ci que peut se produire l'accouplement. À la fin de cette phase, le niveau d'œstrogène augmente suivi par un pic de LH juste avant le début de l'œstrus (Levasseur *et al.*, 2001). Les œstrogènes sécrétées entraînent la décharge ovulente (Levasseur *et al.*, 2001). L'œstrus est la période du cycle œstral où se produit l'ovulation et a une durée de 10 à 20 heures (Levasseur *et al.*, 2001). Quant à la période du métestrus, sa durée approximative est de 8 heures. Lors du métestrus, il y a production de progestérone, organisation fonctionnelle du corps jaune et l'endomètre s'épaissit. La dernière phase du cycle œstral chez la rate est le diestrus. Le diestrus correspond à la phase lutéale, laquelle se déroule sur une période de 6 heures environ. Durant cette phase, le niveau de progestérone est bas et le niveau d'oestradiol remonte progressivement jusqu'au début du proestrus. Les corps jaunes ne sont pas fonctionnels et régressent lentement (Levasseur *et al.*, 2001). Les variations d'hormones au cours du cycle œstral entraînent des changements au niveau de l'épithélium vaginal. La muqueuse vaginale se renouvelle à chaque cycle. Chaque stade possède des caractéristiques épithéliales qui lui sont propres et par conséquent, il est possible de déterminer le stade exact de la femelle en procédant à des frottis vaginaux (Figure 9). Par exemple, on reconnaît l'œstrus à la forte présence de mort cellulaire épithéliale et le diestrus à la présence de plusieurs cellules de petites tailles (Levasseur *et al.*, 2001).

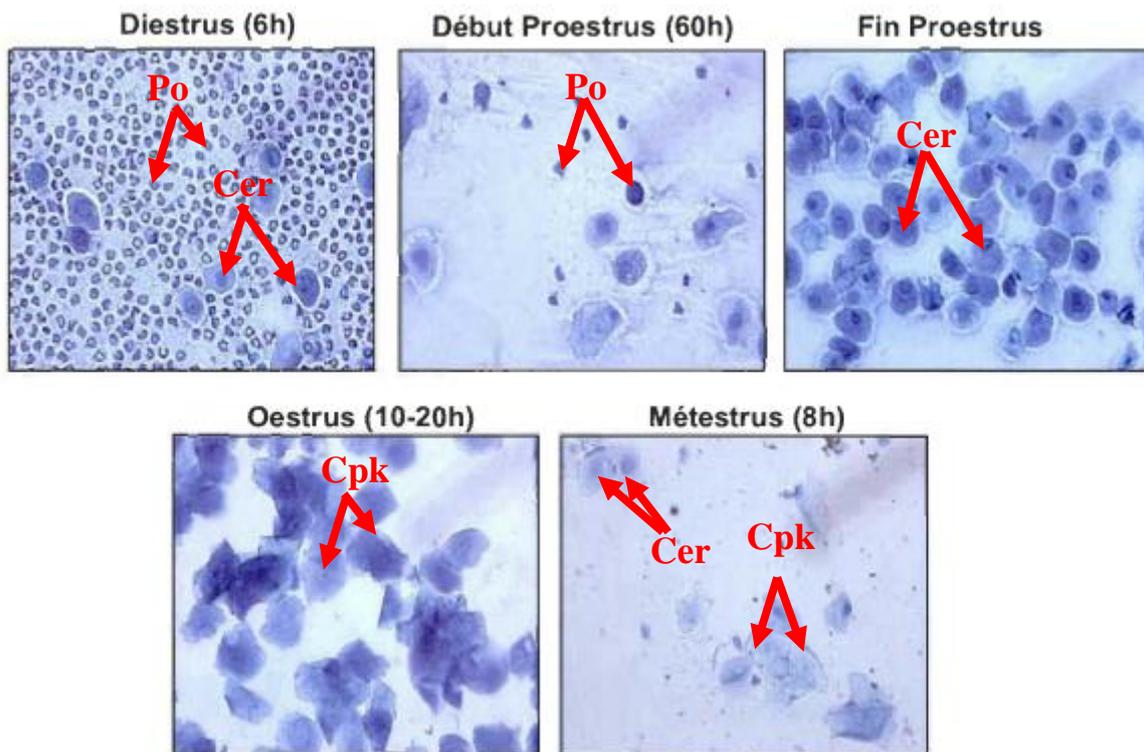


Figure 9: Frottis vaginaux de la rate aux différents stades du cycle œstral (Levasseur *et al.*, 2001).

Proestrus ; Cer = cellules épithéliales rondes, **œstrus ; Cpk** = cellules plates kératinisées, **Métrus ; Cer** = cellules épithéliales rondes, **diestrus ; Po** = polynucléaires.

I.2- Ménopause et œstrogènes

I.2.1- Quelques données historiques sur la définition du terme ménopause

La première définition de la ménopause se trouve dans le TALMUD où il est considéré qu'une femme est vieille quand, à l'approche de l'âge critique, elle ne voit pas son flux cataménial pendant trois époques consécutives (Berdah, 2010). Le terme de ménopause existe depuis moins de 2 siècles (Gindre, 2009) et étymologiquement, il est construit à partir des mots grecs "menos" signifiant menstrues et "pauis" signifiant arrêt, ce néologisme remplace l'expression « cessation des menstrues » des textes médicaux des 17^e et 18^e siècles. Une autre appellation de la ménopause est dérivée du latin "climatericum" et du grec "klimakter" qui signifient le climatère en français.

I.2.2- Physiopathologie de la ménopause

La ménopause est présentée en 4 phases dans le référentiel médical, à savoir la pré-ménopause, la péri-ménopause, ménopause et la postménopause (Ambikairajah *et al.*, 2022).

I.2.2.1- Pré-ménopause

La période qui précède l'arrêt des menstruations est la pré-ménopause, avec son cortège de modifications endocrinologiques et biologiques (Soules *et al.*, 2001). À la pré-ménopause, se produit le vieillissement ovarien et un déséquilibre dans la production des hormones ovariennes, entraînant des irrégularités menstruelles (Soules *et al.*, 2001). Les règles surviennent précocement ou avec retard, peuvent être écourtées ou durer plus longtemps, être abondantes ou plus légères, ou tout simplement disparaître pendant plusieurs mois et réapparaître du jour au lendemain (Delamater et Santoro, 2018). Ces phénomènes annonciateurs de la ménopause peuvent durer de quelques mois à quelques années avant l'arrêt définitif des règles (Rozenbaum, 1990).

I.2.2.2- Péri-ménopause

La péri-ménopause, distincte du concept de pré-ménopause. La péri- ménopause englobe les temps d'irrégularités menstruelles précédant la cessation définitive de la menstruation et l'année qui suit l'arrêt du cycle menstruel (Harlow et Paramsothy, 2011).

I.2.2.3- Ménopause

La ménopause est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme la cessation permanente des menstruations résultant de la perte de l'activité folliculaire ovarienne (OMS, 1996). Elle est donc une étape physiologique du vieillissement normal de la femme (Courbiere et Carcopino, 2010). La ménopause est acquise après 12 mois d'aménorrhée consécutive. Elle s'installe moyenne vers l'âge de 51 ans (Mengue *et al.*, 2021). Elle se manifeste physiologiquement par une déplétion en œstrogènes résultant d'une disparition du patrimoine folliculaire (Sherwin, 2001). Cette carence en œstrogènes est associée à un ensemble de troubles à court terme (l'atrophie de l'appareil génital et les troubles neuropsychiques) (Dalal et Agarwal, 2015). Il existe deux types de ménopauses :

- La ménopause naturelle marquée par la chute drastique des follicules ovariens au tour de 51 ans chez la femme (Sherwin, 2001) ;

- La ménopause iatrogène qui s'installe soit par une approche chirurgicale par ovariectomie ou soit par une approche chimiothérapeutique (Purohit *et al.*, 2019).

I.2.2.4- Post-ménopause

La post-ménopause est la période qui succède à la perte de la fonction menstruelle (Dalal *et al.*, 2015). Toutes les femmes en phase de ménopause confirmée sont donc en post-ménopause (OMS, 1996). La ménopause survenant autour de cinquante ans, les femmes passent parfois une bonne partie de leur vie en post-ménopause. Elle se manifeste par un développement des troubles à long terme (l'ostéoporose, les maladies cardiovasculaires et les troubles neurologiques)

I.2.3- Symptomatologie de la ménopause

À partir de la cinquième décennie de vie, on assiste à une diminution de la concentration plasmatique d'œstrogènes, ce qui conduit au syndrome climactérique, qui correspond à la période de transition progressive de la phase reproductive à la phase non reproductive (Potter *et al.*, 2018). Cette baisse du taux d'œstrogènes plasmatiques s'accompagne de modifications inconfortables de l'organisme (Figure 10) telles que les bouffées de chaleur, l'atrophie des organes œstrogénodépendants, la faible lubrification vaginale à l'origine de la dyspareunie, la baisse de la libido, l'altération du profil lipidique, l'ostéoporose, les complications cardiovasculaires et les troubles de l'humeur et neurologiques (Cramer *et al.*, 2012, Monteleone *et al.*, 2018).

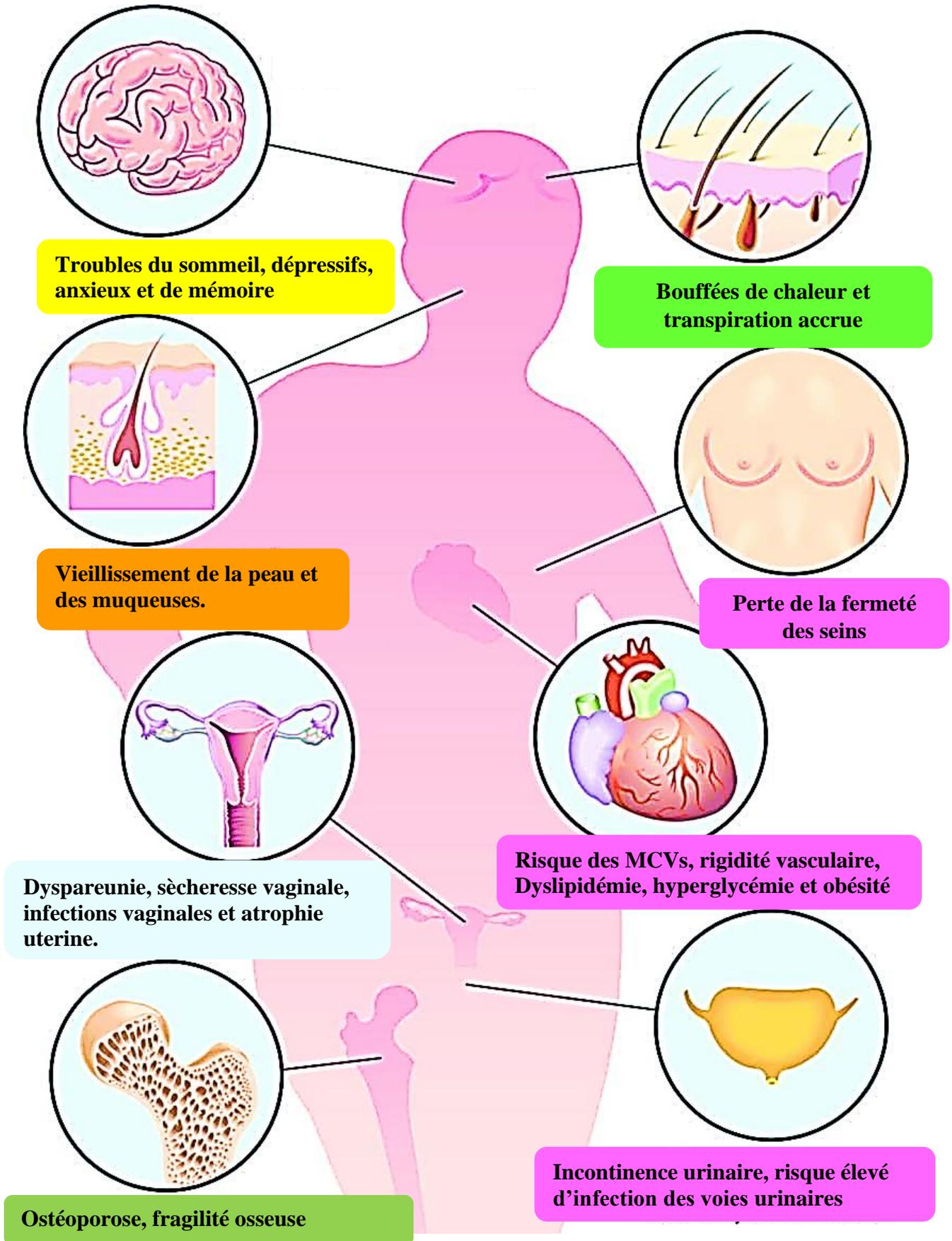


Figure 10: Bouleversements physiologiques lors de la ménopause (Massacrier, 2015).

MCVs = Maladies cardiovasculaires.

I.2.3.1- Ménopause et bouffées de chaleur

Les bouffées de chaleur constituent le symptôme le plus représentatif de la ménopause, à tel point qu'elles en sont dans le langage courant quasiment le synonyme (Mozhgan *et al.*, 2020). En effet, l'organisme maintient sa température constante en modifiant l'afflux de sang au niveau de la peau. Les œstrogènes interviennent dans ce mécanisme de régulation (Charkoudian et Stachenfeld, 2016). La privation œstrogénique, par modification du métabolisme des amines cérébrales (norépinéphrine surtout), est donc responsable de l'instabilité vasomotrice.

La bouffée de chaleur représente donc en fait la réaction des centres vasomoteurs centraux à la disparition des œstrogènes auxquels ils étaient depuis longtemps conditionnés. Les bouffées de chaleur sont d'intensité variable. Au maximum, elles se traduisent par une sensation soudaine de chaleur intense, brutale et transitoire au niveau du cou, du visage et de la poitrine. Elles sont accompagnées de rougeurs de la face et du tronc et de sueurs profuses (Courbiere et Carcopino, 2010). L'épisode peut durer de 2 à 5 min, et peut se terminer par des tremblements et des frissons (Bansal et Aggarwal, 2019).

I.2.3.2- Ménopause et syndrome génito-urinaire

Le syndrome génito-urinaire de la ménopause (SGM), auparavant appelé atrophie vulvovaginale, vaginite atrophique ou atrophie uro-génitale, est une affection vulvovaginale, sexuelle et du tractus urinaire inférieur chronique et progressive, caractérisée par un ensemble de symptômes secondaires à un état clinique d'hypoœstrogénisme après le début de la ménopause. En 2014, la société internationale pour l'étude de la santé sexuelle des femmes et la société nord-américaine de la ménopause ont convenu que le SGM est un terme plus englobant et plus précis pour décrire l'ensemble des séquelles génitales, urologiques et sexuelles externes causées par l'hypoœstrogénisme pendant la ménopause (Portman et Gass, 2014). Le syndrome ou ses caractéristiques se manifestent d'une manière ou d'une autre chez environ 15 % des femmes préménopausées (Palacios, 2009) et 40 à 54 % des femmes postménopausées (DiBonaventura *et al.*, 2015).

Sur le plan physiopathologique, la postménopause est associée à une diminution du nombre de récepteurs d'œstrogènes au niveau du tractus uro-génital. Dans le tissu vulvovaginal, le récepteur d'œstrogène- α est principalement présent chez les femmes préménopausées et postménopausées, tandis que les récepteurs β ne semblent s'exprimer que chez les femmes

préménopausées (Chen *et al.*, 1999). La carence en œstrogène entraîne donc une perte de collagène dermique dans le tissu conjonctif dense du vagin, de la vessie et de l'urètre, puis la paroi vaginale devient plus mince et moins élastique.

En conséquence, le vagin devient plus court et plus étroit, ce qui peut entraîner une dyspareunie. La vessie et l'urètre deviennent également atrophiques, ce qui entraîne une incontinence et une forte fréquence urinaire (*North American Menopause Society*, 2007). Une étude a indiqué que 20 % des femmes ménopausées souffraient d'incontinence par impériosité, tandis qu'environ 50 % souffraient d'incontinence urinaire à l'effort (Robinson et Cardozo, 2003).

I.2.3.3- Ménopause et ostéoporose

L'ostéoporose ménopausique est un problème de santé publique mondial majeur. Des études épidémiologiques montrent que près de 34% des femmes ménopausées présentent des troubles ostéoporotiques (Choi *et al.*, 2021). L'ostéoporose postménopausique est une maladie chronique et progressive caractérisée par une faible masse osseuse, une détérioration microarchitecturale de l'os et une diminution de la solidité de l'os qui entraînent une fragilité accrue des os et, par conséquent, une augmentation du risque de fracture (Karen et Bart., 2006). C'est une maladie silencieuse dans la plupart des cas, sans symptômes jusqu'à l'apparition des fractures (Maeda et Lazaretti-Castro, 2014).

D'un point de vue physiopathologique, la perte osseuse induite par la carence en œstrogènes est due à une interaction complexe d'hormones et de cytokines qui convergent pour perturber le processus de remodelage osseux (Neale et Roberto, 2006). La ménopause entraîne une augmentation globale de la production d'IL-7 dans les organes cibles tels que les os, le thymus et la rate (Neale et Roberto, 2006). Cela conduit à une première vague d'activation des cellules T. Les cellules T activées libèrent l'IFN- γ (Interféron- γ), qui augmente la présentation de l'antigène par les cellules dendritiques et les macrophages en régulant à la hausse l'expression du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe II par le biais du facteur de transcription CIITA. La carence en œstrogènes amplifie également l'activation des lymphocytes T et l'ostéoclastogenèse en régulant à la baisse les voies antioxydantes, ce qui entraîne une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (EROs). L'augmentation des EROs qui en résulte stimule la présentation d'antigènes et la production de *Tumor Necrosis Factor* (TNF) par les ostéoclastes matures. L'effet combiné de l'IFN- γ et des ERO améliore nettement la présentation de l'antigène, en amplifiant l'activation des cellules T et en favorisant

la libération des facteurs qui induisent l'ostéoclastogénèse (RANKL et TNF). La carence en œstrogène provoque ainsi des formes précoces et tardives d'ostéoporose chez les femmes ménopausées (Riggs *et al.*, 1998). Elle est donc associée à une forte augmentation de la résorption osseuse causée par une augmentation du nombre d'ostéoclastes (OC) (due à une formation accrue d'OC et à une apoptose réduite des OC) et par une activité accrue des OC

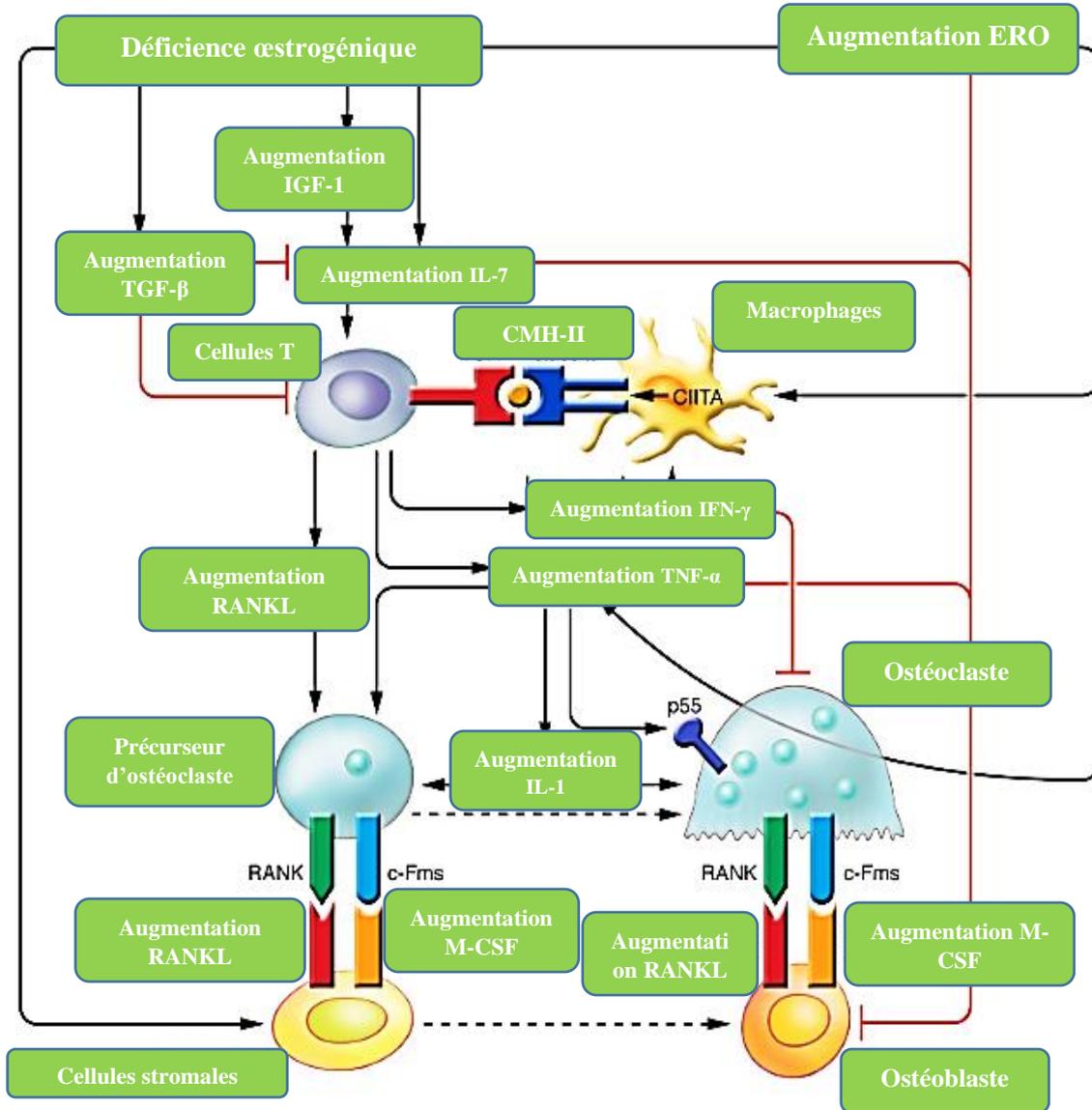


Figure 11: Représentation schématique des principaux mécanismes et interactions de rétroaction par lesquels une carence en œstrogènes entraîne une perte osseuse (Neale et Roberto, 2006).

I.2.3.4- Ménopause et facteurs de risque des maladies cardiovasculaires

Chez la femme ménopausée, la carence œstrogénique a un impact direct sur les facteurs de risques des maladies cardiovasculaires. L'œstrogénopénie ménopausique entraîne une augmentation dramatique de LDL-cholestérol, de cholestérol total et des triglycérides alors que le HDL-cholestérol se trouve diminué et une dysfonction endothéliale (Ngo-Sock, 2014). À la ménopause, sous l'influence de la chute d'hormones œstrogènes les graisses s'accumulent anormalement dans le tissu adipeux, la masse maigre diminue ainsi que la dépense énergétique au repos. On observe également une diminution de l'oxydation des lipides (Poehlman *et al.*, 1995, Lovejoy *et al.*, 2008). Ces changements peuvent parfois s'accompagner d'une prise de poids se traduisant par une augmentation de l'indice de masse corporel (Bhurosy et Jeewon, 2013). La carence en œstrogènes après la ménopause entraîne l'activation du système rénine-angiotensine, l'augmentation du taux d'endothéline qui est un puissant vasoconstricteur et l'altération de la vasodilatation médiée par l'oxyde nitrique. Le stress oxydatif, qui est augmenté par l'endothéline et l'angiotensine II, peut également contribuer aux processus athérosclérotiques (Abramson et Melvin, 2014). Ainsi, peu après la ménopause, les femmes présentent des augmentations de la pression artérielle, ainsi qu'une maladie vasculaire subclinique, qui peut être observée sous la forme d'une augmentation de la pression carotidienne et fémorale. On y observe aussi une augmentation de l'épaisseur de l'intima des artères carotides et fémorales, du score calcique des artères coronaires et de la rigidité artérielle, ainsi qu'une altération de la dilatation (Stamatelopoulos *et al.*, 2012). Les conséquences cliniques des maladies cardiovasculaires surviennent généralement plus tard chez les femmes que chez les hommes et la cardiopathie ischémique se manifeste généralement 10 ans plus tard chez les femmes (Lobo *et al.*, 2014). Le risque d'accident vasculaire cérébral double au cours de la première décennie après la ménopause et finit par dépasser celui des hommes à un l'âge mûr (Lobo *et al.*, 2014). Ces événements vasculaires ont toutefois tendance à avoir un pronostic plus sévère chez les femmes (Lobo *et al.*, 2014). La ménopause précoce et l'insuffisance ovarienne primaire ont été systématiquement associées à un risque accru de maladies coronariennes, d'accidents coronariens, d'accident vasculaire cérébral et de mortalité (Wellons *et al.*, 2012).

I.2.3.5- Ménopause, troubles neuropsychiques et neurologiques

Les troubles neuropsychiques liés à la ménopause sont le résultat d'un dérèglement hormonal. L'enquête sur les « premiers signes » montre que 60% des femmes souffrent de

troubles du sommeil de type d'insomnie. Les troubles du comportement peuvent être de plusieurs types :

- L'asthénie est rapportée dans 60% des cas.
- L'anxiété (60%), motivant dans un tiers des cas la prescription d'anxiolytiques.
- L'irritabilité (60%), encore appelée nervosité.
- La dépression, la tristesse (25%), justifiant 10% de prescription d'antidépresseurs.

Concernant les troubles neurologiques, la carence en œstrogènes liée à la ménopause pourrait jouer un rôle dans la dégradation des fonctions cognitives, portant notamment sur les capacités de mémorisation, les performances (Amantea *et al.*, 2005, Ngoungouré *et al.*, 2019). En effet les œstrogènes stimulent les neurotransmetteurs du cerveau qui sont responsables de la mémoire et de la langue. Le rôle de la carence œstrogénique est suggéré par différents arguments épidémiologiques et expérimentaux. Cette carence pourrait également représenter un des facteurs impliqués dans la survenue de la maladie d'Alzheimer (Amantea *et al.*, 2005).

I.2.3.6- Ménopause et troubles hépatiques

Les troubles hépatiques chez les femmes ménopausées ont été mis en évidence grâce à plusieurs études cliniques, en utilisant des techniques comme l'échographie, la résonance magnétique nucléaire ainsi que l'histologie à partir de biopsies du foie (Parkosadze *et al.*, 2012). Il a en effet été mis en évidence un excès de triglycérides (stéatose) dans le foie chez la plupart des femmes ménopausées. De même, avec les modèles animaux de la ménopause, en utilisant des techniques biochimiques, plusieurs études effectuées ont rapporté une stéatose hépatique et une inflammation du foie chez des rates ovariectomisées comparativement aux rates qui ont subi une simulation chirurgicale (Pighon *et al.*, 2010 ; Pighon *et al.*, 2011).

I.2.3.7- Ménopause et stress oxydant

Le stress oxydant correspond à une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques malgré la présence d'un système de défense antioxydant. Le stress oxydant contribuerait aux effets pathologiques de la ménopause (Doshi et Agarwal, 2013). En effet, l'augmentation de la masse corporelle telle qu'observée à la ménopause accroît la production des radicaux libres. Ceux-ci peuvent induire une peroxydation des lipides et une oxydation des protéines. Ce stress oxydant accentue l'oxydation des lipides et les produits de dégradation formés sont impliqués dans l'athérosclérose et d'autres maladies

nerveuses (Rukhsana et Allan, 2010). Les travaux de Abdul *et al.* (2010) ont montré une réduction très significative des niveaux de glutathion dans le groupe des femmes ménopausées, ce qui pourrait être dû à l'augmentation de sa propriété de piégeage des radicaux libres et à sa consommation accrue pour contrer le stress oxydatif et inhiber la peroxydation des lipides membranaires, ce qui indique que l'augmentation d'un stress oxydant accru et un système de défense antioxydant réduit chez les femmes ménopausées. Ce stress oxydant précipiterait l'installation des troubles postménopausiques suscités.

Ces troubles divers associés à la ménopause font l'objet d'un ensemble de méthodes qui tentent tant bien que mal à améliorer le quotidien des femmes ménopausées.

I.2.4- Induction de la ménopause chez la rate

La ménopause peut être induite par une ovariectomie bilatérale chez les rates (Dzeufiet *et al.*, 2015, Ngougoure *et al.*, 2019, Oumarou *et al.*, 2015, Djiogue *et al.*, 2020). Cette approche chirurgicale est connue pour mimer la ménopause humaine du point de vue symptomatique (Shuster *et al.*, 2010). Ce modèle présente un inconvénient qui est la chute brutale du taux d'œstrogènes, ce qui est contraire à la ménopause naturelle où il existe une phase de pré-ménopause et de péri-ménopause ; deux phases marquées par une régression progressive du taux d'œstrogènes et une irrégularité des cycles œstraux (Burger *et al.*, 2007, Nejat *et al.*, 2010, Shuster *et al.*, 2010). Outre l'approche chirurgicale, la ménopause peut être induite chimiquement en accélérant le vieillissement ou la déficience ovarienne (Springer *et al.*, 1996, Hu *et al.*, 2001). Cette méthode consiste en l'utilisation des toxines ovariennes comme le diepoxide 4-vinylcyclohexene et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Brinton *et al.*, 2012). La ménopause chimio-induite mime mieux la ménopause humaine car elle présente une phase de transition marquée par une irrégularité du cycle œstral (Zakaria *et al.*, 2019). Le mécanisme par lequel ces toxines accélèrent la perte ovarienne n'est pas claire. On note cependant à la suite de leur administration chez les rates, une atrophie des follicules primordiaux et primaires (Springer *et al.*, 1996, Hu *et al.*, 2001). Peu importe l'approche employée pour installer la ménopause chez les rates, plusieurs systèmes sont négativement impactés.

I.2.4.1- Tractus génital, glande mammaire et ménopause chez la rate

La ménopause induite chez les rates entraîne des altérations biochimiques, histologiques et anthropométriques sur le tractus génital et la glande mammaire. L'ovariectomie (Ovx) entraîne une atrophie du vagin et de l'utérus (Njamen *et al.*, 2008 ;

Dzeufiet *et al.*, 2015 ; Zingue *et al.*, 2017). Cette atrophie se caractérise par une réduction de la masse relative de l'utérus et des protéines utérines (Oumarou *et al.*, 2017), une réduction de la taille de l'épithélium vaginal et utérin (Njamen *et al.*, 2008 ; Dzeufiet *et al.*, 2015, Zingue *et al.*, 2017), une régression du diamètre des acinis mammaires avec suppressions des sécrétions colorables par l'éosine (Oumarou *et al.*, 2017 ; Zingue *et al.*, 2017). On note par ailleurs au niveau du vagin, une suppression de la stratification et de la cornification de l'épithélium vaginal (Figure 12).

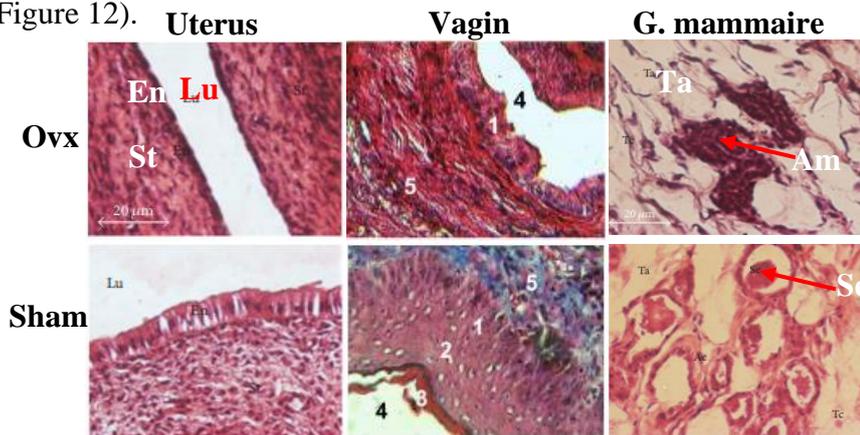


Figure 12: Coupes histologiques de l'utérus, du vagin et de la glande mammaires chez les rates ovariectomisées (Dzeufiet *et al.*, 2015, Oumarou *et al.*, 2017).

En = Endomètre, **St** = Stroma, **Lu** = Lumière utérine, **1** = *stratum germinativum*, **2** = *stratum granulosum*, **3** = *stratum corneum*, **4** = lumen, **5** = chorion ; **Am** = Acini mammaire ; **Ta** = tissu adipeux ; **Se** = Sécrétion éosinophile.

I.2.4.2- Profil lipidique, masse corporelle, aorte et ménopause chez la rate

L'ovariectomie entraîne chez les rates, une dyslipidémie marquée par une élévation du taux de cholestérol total (CT), de LDL-Cholestérol et de triglycérides, une diminution du taux de HDL-Cholesterol et une augmentation de l'index athérogénique (Dzeufiet *et al.*, 2015 ; Ngoungoure *et al.*, 2017). Le modèle de ménopause induit par l'ovariectomie entraîne également une augmentation de la masse corporelle, de la graisse abdominale et de la masse relative de l'aorte (Dzeufiet *et al.*, 2015 ; Ngoungoure *et al.*, 2017). En outre, on observe fréquemment chez les rates ovariectomisées, un stress oxydant au niveau de l'aorte qui est souvent caractérisé par une hausse du taux de malondialdéhyde (MDA) et une diminution du taux de glutathion réduit (GSH) (Dzeufiet *et al.*, 2015 ; Ngoungoure *et al.*, 2017). D'autres systèmes à l'instar du système nerveux et osseux subissent également des dysfonctionnements au cours de la ménopause chez les rates (Oumarou *et al.*, 2017 ; Ngoungoure *et al.*, 2019).

I.2.5- Prise en charge des troubles associés à la ménopause

I.2.5.1- Traitement Hormonal de la Ménopause

Aujourd'hui, on ne parle plus de Traitement Hormonal Substitutif (THS) mais de Traitement Hormonal de la Ménopause (THM). En effet, le terme THS fait référence au traitement œstroprogestatif chez les femmes jeunes ayant été ménopausées très précocement, tandis que le terme THM est réservé aux femmes ménopausées à l'âge normal (Drapier-Faure, 2009). L'objectif d'un THM est de pallier au déficit hormonal survenant pendant la ménopause par administration d'hormones (œstrogène +/- progestatif). Le THM permet de corriger la symptomatologie fonctionnelle du climatère (bouffées de chaleur, sécheresse vaginale, troubles de l'humeur et du sommeil entre autres) et de prévenir les conséquences à moyen et long terme de la carence œstrogénique (ostéoporose, maladies cardiovasculaires, et la dégradation des fonctions cognitives) (Chen *et al.*, 2006). Les risques du THM sont entre autres : les cancers hormonodépendants (sein, endomètre) et non hormonodépendants (col utérin et ovaire), les risques cardiovasculaires (augmentation du risque de thrombose veineuse et artérielle (Kurman *et al.*, 1985, Hulley *et al.*, 1998).

I.2.5.2- Modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes et les anti-œstrogènes

Les Modulateurs Sélectifs des Récepteurs aux Œstrogènes (MSRO) et les anti-œstrogènes sont des ligands des récepteurs aux œstrogènes présentant une activité mixte ; agoniste des œstrogènes sur certains tissus (systèmes osseux et cardiovasculaire) et antagoniste sur d'autres tissus (utérus et glande mammaire) (Katzenellenbogen et Katzenellenbogen, 2000). La première classe de MSRO est la famille des triphényléthylènes dont la molécule de référence est le tamoxifène. La seconde classe est la famille des benzothiophènes dont la molécule la plus connue est le raloxifène. La troisième famille est celle des dérivés des benzopyrans et regroupe l'EM-652 et l'EM800. Le tamoxifène diminue de façon significative le risque de cancer du sein chez les femmes pré et ménopausées et le nombre d'infarctus du myocarde (Goldstein *et al.*, 2000). Cependant, le tamoxifène est controversé puisqu'il augmente considérablement le risque de cancer de l'endomètre et est à l'origine de nombreux effets secondaires, tels que les bouffées de chaleur. Le raloxifène présente les mêmes propriétés que le tamoxifène sans augmenter les risques d'endométriose (Goldstein *et al.*, 2000). Il est utilisé comme traitement contre l'ostéoporose mais est associé à l'augmentation du risque thromboembolique veineux (Kanis *et al.*, 2005). Il existe plusieurs classes d'anti-œstrogènes. Premièrement on a l'ICI 182,780 et l'ICI 164,384 qui sont des composés stéroïdiens décrits comme étant des antagonistes « purs » du récepteur aux œstrogènes ou SERD "Selective

Estrogen Receptor Down-regulator". Ensuite il y a les anti-œstrogènes non stéroïdiens dont le MER-25 et le clomifène.

Compte tenu des risques et effets secondaires associés au THM, aux anti-œstrogènes et aux MSRO, la phytothérapie s'avère être une alternative thérapeutique dans la prise en charge des symptômes ménopausiques. De nombreuses plantes médicinales auraient des vertus sur la symptomatologie de la ménopause (Dzeufiet *et al.*, 2015, Ngoungouré *et al.*, 2017, Oumarou *et al.*, 2017). Seulement, la répartition géographique de ces plantes n'est pas uniforme, soulevant ainsi l'urgence de poursuivre des recherches de nouvelles plantes potentiellement thérapeutiques contre les troubles ménopausiques au sein de la fore camerounaise. Les plantes employées dans la prise en charge des maladies liées à l'hypo-œstrogénie sont réputées pour être riches en phyto-œstrogènes (PEs) ; qui seraient les molécules bioactives responsables des effets thérapeutiques de ces plantes.

I.3- Généralités sur les phyto-œstrogènes

I.3.1- Définition

Le terme phyto-œstrogène (PEs) désigne un ensemble de molécules issues de plantes et possédant une structure chimique proche de celle du 17 β -œstradiol et qui peuvent donc induire *in vivo* des effets similaires à ceux des œstrogènes animaux en se fixant sur les récepteurs des œstrogènes (Runeton, 2009). Ce terme n'indique pas une classe chimique particulière mais elle englobe tous les composés d'origine végétale avec une certaine forme œstrogénique observée.

I.3.2- Classification des phyto-œstrogènes

Les coumestanes, les lignanes ou entérolignanes, les flavonoïdes les alcaloïdes et les stilbènes représentent les différentes classes de PEs.

I.3.2.1- Coumestanes

Les principaux coumestanes présentant une activité œstrogénique sont le coumestrol et le 4'méthoxycoumestrol. Le coumestrol est le composé le plus œstrogénique de la famille.

Dans les plantes, les coumestanes apparaissent lors d'une attaque fongique ou bactérienne, ce qui leur confère le rôle de phytoalexine (Le Bars et Le Bars, 1987). Ils sont trouvés majoritairement dans les germes de trèfle et de soja, les légumes et la luzerne (Cornwell *et al.*, 2004).

I.3.2.2- Lignanes

Les lignanes sont caractérisés par une structure C6-C3-C3-C6. Le matairesinol et le sécoisolaricirésinol sont les lignanes les plus étudiés. Ces deux molécules ne possèdent pas d'activité œstrogénique, mais peuvent être converties par la flore intestinale en entérodiol et entérolactone, appelés entérolignanes, qui eux possèdent une activité œstrogénique (Setchell *et al.*, 1981).

I.3.2.3- Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent la principale classe de PEs (Choi *et al.*, 2008). Ils sont capables de se lier aux récepteurs avec une affinité supérieure aux autres PEs (D'Arrigo *et al.*, 2021). Cette classe regroupe plus de 5000 molécules de grande variabilité structurale (Nijveldt *et al.*, 2001). La structure de base des flavonoïdes est une structure diphenylpropane C6-C3-C6, formant deux cycles aromatiques (A et B) liés par trois carbones formant un hétérocycle C.

I.3.2.4- Stilbènes

Ils sont constitués de deux noyaux aromatiques liés par un groupe éthylénique. Le principal stilbène connu est une phytoalexine, le resvératrol. Il existe en fait deux isomères de cette molécule, mais seule la forme trans est douée d'activité œstrogénique (Cornwell *et al.*, 2004). Les stilbènes sont peu répandus et principalement retrouvés dans les baies de raisin, donc dans le jus de raisin et le vin (Gehm *et al.*, 2004).

I.3.2.5- Alcaloïdes

De nouveaux PEs appartenant à la classe des alcaloïdes, à savoir l' α -érythroïde, la β -érythroïde, et leurs dérivés 8-oxo- α -érythroïde et 8-oxo- β -érythroïde, ont été isolés et caractérisés structurellement à partir de l'extrait méthanolique de l'écorce de la tige de *Erythrina poeppigiana* et ont présenté une œstrogénicité par leur liaison avec une grande affinité avec les récepteurs d'œstrogènes (Djiogue *et al.*, 2014).

I.3.3- Métabolisme et biodisponibilité des phyto-œstrogènes

Les PEs sont donc intégrés sous forme glycosylée et seront déglycosylés pour être absorbés dans l'organisme et passeront dans le foie où ils subiront des étapes de détoxification par les enzymes de phase II. Par un cycle entérohépatique similaire à celui des œstrogènes, ils pourront revenir dans le côlon. Ils seront éliminés par les urines et les fèces, où ils se trouvent majoritairement sous forme de glucuronides (Gerber et Berta-Vanrullen, 2006). L'ensemble

des PE circule majoritairement sous forme conjuguée dans le sang, soit sous forme libre, soit lié à des protéines plasmatiques comme la *Sex Hormone Binding Globulin* (SHBG) ou l'albumine jusqu'aux tissus cibles (Shelnutt *et al.*, 2002). Chez l'Homme, les formes excrétées sont pratiquement toutes des formes glucuronidées (Shelnutt *et al.*, 2002).

Les concentrations des PE dans les fluides biologiques augmentent proportionnellement avec les apports alimentaires, démontrant que l'absorption est dose dépendante (Karr *et al.*, 1997 ; Lampe *et al.*, 1999). Toutefois, l'absorption ne semble pas être un phénomène linéaire, car au-delà d'une certaine dose ingérée, les systèmes entérocytaire ou hépatique semblent saturés (Figure 13).

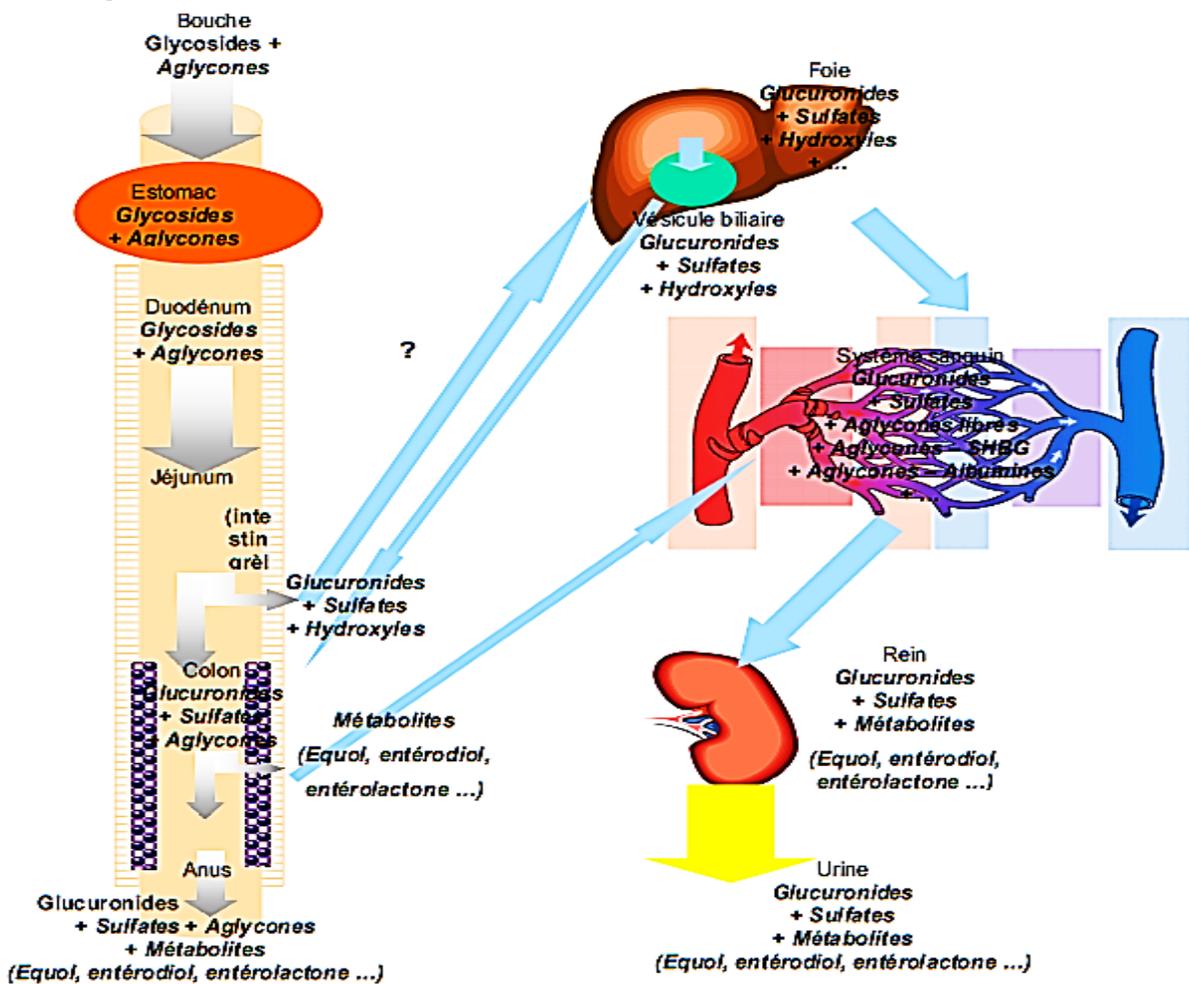


Figure 13: Métabolisme des phyto-œstrogènes (Afssap, 2005).

I.3.4- Mécanismes d'action des phyto-œstrogènes

Les PE exercent leurs effets par de multiples mécanismes : ils interagissent avec RE α et RE β , induisant ainsi de faibles actions œstrogéniques ou antiœstrogéniques (Kuiper *et al.*, 1998 ; Mitchell *et al.*, 2001). Les principaux éléments structuraux qui permettent aux PE de se lier

avec une grande affinité aux récepteurs d'œstrogènes et de présenter des effets similaires à ceux de l'œstradiol sont les suivants :

- le noyau phénolique indispensable à la liaison au récepteur d'œstrogènes ;
- le noyau d'isoflavones imitant un noyau d'œstrogènes au niveau du site de liaison au récepteur ; un faible poids moléculaire similaire à celui des œstrogènes (PM=272) ;
- la distance entre deux groupes hydroxyles dans le noyau d'isoflavones est similaire à celle de l'œstradiol et
- un schéma d'hydroxylation optimal (Yildiz, 2005).

Les PEs ont une affinité plus faible pour les récepteurs d'œstrogènes que pour l'œstradiol et la plupart d'entre eux présentent une affinité plus élevée pour RE β que pour RE α (Whitten et Naftolin, 1998 ; Turner *et al.*, 2007) d'environ 30 fois. D'autres PEs, tels que le resvératrol, se lient à RE β et RE α avec une affinité comparable, mais avec une activité 7000 fois inférieure à celle de l'œstradiol (Bowers *et al.*, 2000). En comparaison, l'œstradiol recrute les corégulateurs des deux types de récepteurs de manière non sélective (An *et al.*, 2001). Le complexe ligand-récepteur généré est capable d'induire une activité transcriptionnelle (Kuiper *et al.*, 1998) (Figure 10). Cependant, la concentration requise pour que les isoflavones induisent une activité transcriptionnelle est 104 fois supérieure à celle de l'œstradiol. Cette activité transcriptionnelle plus faible des PEs est compensée par leur biodisponibilité plus élevée, puisque la fraction en circulation libre est supérieure à 50 %, contre 4,5 % pour l'œstradiol. De plus, les niveaux de circulation des phytoœstrogènes sont supérieurs d'un ordre de grandeur à ceux de l'œstradiol (ng/ml contre pg/ml). Cette plus grande accessibilité aux RE explique pourquoi, en présence d'œstrogènes endogènes, les isoflavones se comportent comme des antagonistes des œstrogènes, alors qu'en l'absence d'œstrogènes, elles se comportent comme de faibles agonistes (Navarro, 2005) (Figure 14).

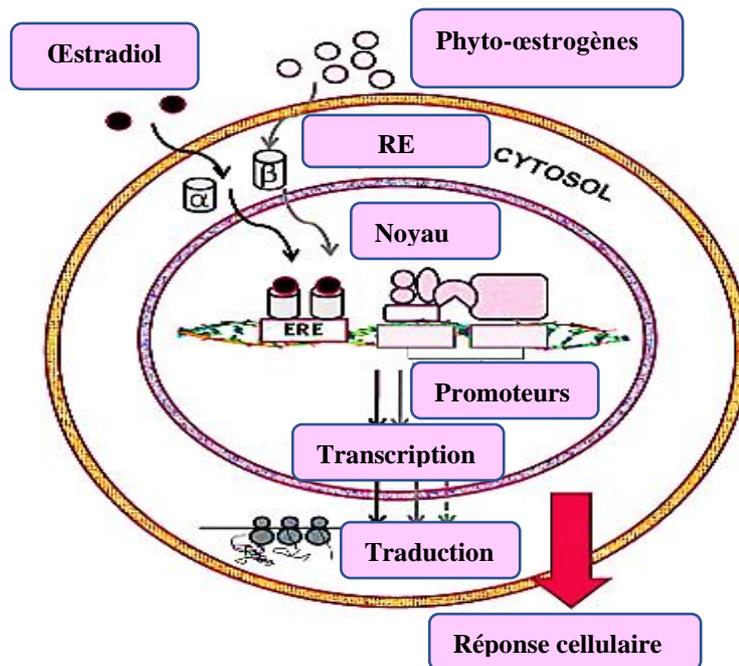


Figure 14: Mécanisme d'action génomique des phyto-œstrogènes (Retana-Márquez *et al.*, 2012).

RE = Récepteur aux œstrogènes, **ERE** = Elément de réponse aux œstrogènes.

I.3.5- Effets thérapeutiques et perturbateur endocrinien des phyto-œstrogènes

Compte tenu de la répartition ubiquitaire des REs au sein de différents organes, les PEs par leur liaison à ceux-ci présentent donc un large champ d'activité responsables des d'effets physiologiques et ou thérapeutiques tant dans les cas de cancer de la prostate chez l'homme ou chez des femmes en ménopause tel que présenté par la figure 15.

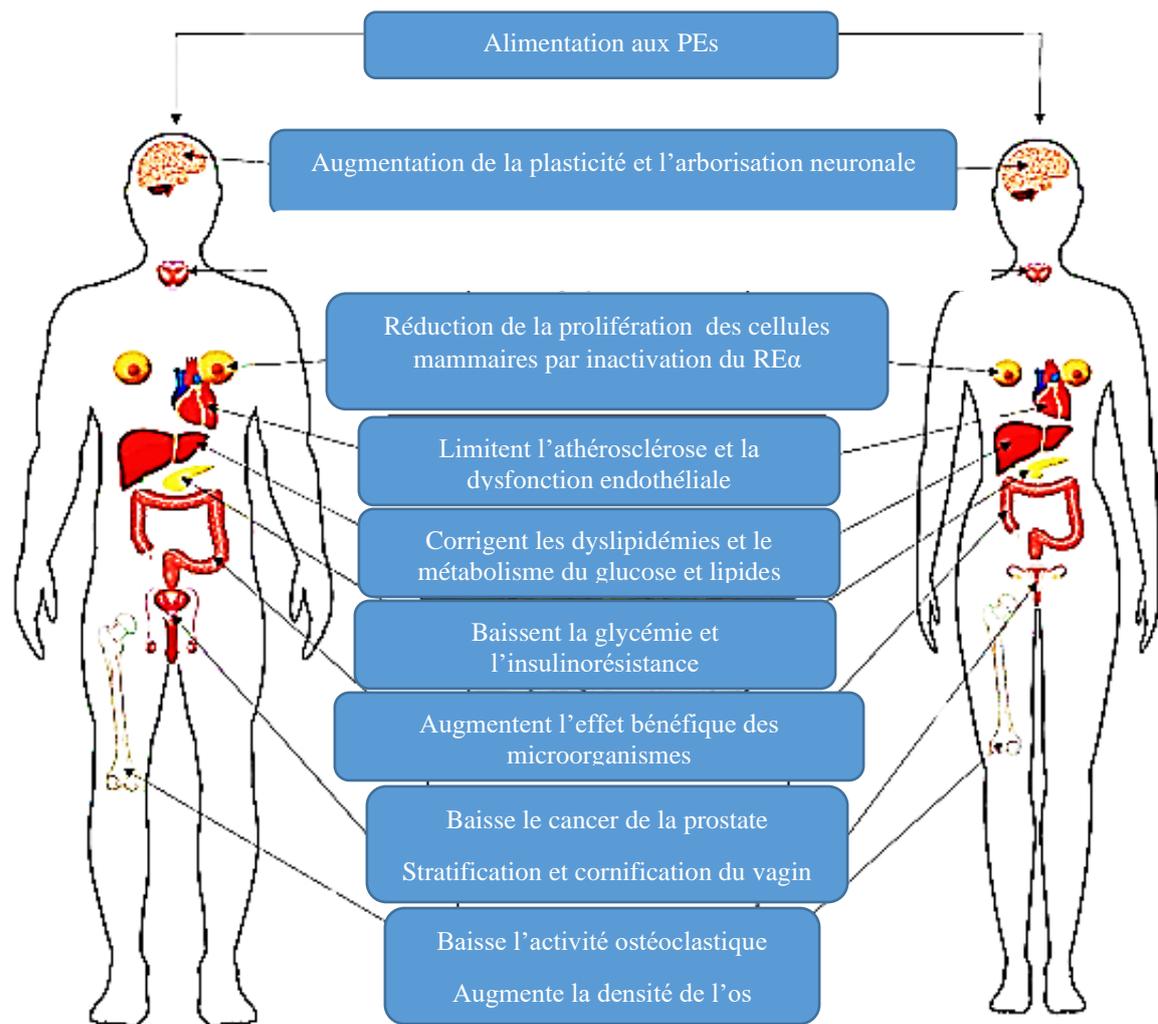


Figure 15: Schéma résumant les effets thérapeutiques des phyto-œstrogènes sur les différents systèmes de l'organisme (Petrine et Brianco-Borges, 2020).

I.3.5.1- Phyto-œstrogènes et fonctions cérébrales

Plusieurs études scientifiques ont été menées depuis des années pour élucider l'action des PEs au niveau cérébral (File *et al.*, 2001 ; Kritz-Silverstein *et al.*, 2003 ; Ngoungouré *et al.*, 2019 ; Djiogue *et al.*, 2020). Certains de ces travaux ont rapporté qu'une exposition alimentaire aux PEs comme les isoflavones serait associé à une amélioration des mémoires à court et à long terme (File *et al.*, 2001). De même, il y aurait une amélioration des mémoires verbale et logique chez les femmes ménopausées consommant des PEs de manière chronique (Kritz-Silverstein *et al.*, 2003). Les études comportementales chez le rat ont montré des effets bénéfiques des PE sur les performances mnésiques et sur l'apprentissage (Lund et Lephart, 2001). *In vitro*, les PEs présentent très peu d'effets protecteurs contre la formation de plaques β -amyloïdes (Zhao *et al.*, 2002 ; Bang *et al.*, 2004). Cependant, d'autres travaux indiquent que

les PEs, comme la génistéine et la daïdzéine, sont capables d'induire une activation transcriptionnelle des récepteurs aux œstrogènes similaire à celle de l'œstradiol naturel dans une lign e neuronale (Schreihofner, 2005).

Toutefois, les observations sur l'impact des PEs sur les fonctions cognitives restent à confirmer (Fournier *et al.*, 2007) car de nombreuses autres études sont entreprises par la communauté scientifique dans cet objectif sur des modèles humains ou murins.

I.3.5.2- Phyto-œstrogènes et hormones sexuelles féminines

L'activité œstrogénique des PEs est due à leur similarité structurelle avec le 17- -œstradiol, la principale hormone sexuelle féminine (Rietjens *et al.*, 2017). En plus d'interagir avec les RE, les PEs peuvent affecter la sécrétion de l'hormone de libération de la gonadotrophine (GnRH) (Nicholls *et al.*, 2005). Les PEs pourraient perturber le système endocrinien en interférant avec l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique qui contrôle la sécrétion d'œstrogènes. L'hypothalamus lib re de la GnRH et stimule l'hypophyse à produire l'hormone folliculostimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH), des gonadostimulines qui favorisent la sécrétion d'œstrogènes, de progestérone et de testostérone par les ovaires ou les testicules. De faibles niveaux d'œstrogènes sont un signal pour l'hypothalamus de libérer la GnRH, alors que des niveaux élevés fournissent un rétrocontrôle négatif (Jefferson, 2010). Par conséquent, la présence de composés exogènes structurellement similaires à l'œstradiol peut interférer avec ce système. Des études ont montré que certains PEs comme les isoflavones pouvaient diminuer la concentration sanguine de LH et de FSH ainsi que de GnRH (Cassidy *et al.*, 1995 ; Duncan *et al.*, 1999). Les PEs diminuent par ailleurs l'activité de l'aromatase et augmentent la concentration de la *Sex Hormone Binding Globulin* (SHBG) ; ce qui avec la diminution des taux de FSH et de LH susmentionnée contribue à diminuer la concentration chez la femme des œstrogènes et de la progestérone (Cassidy *et al.*, 1995 ; Duncan *et al.*, 1999) (Figure 16).

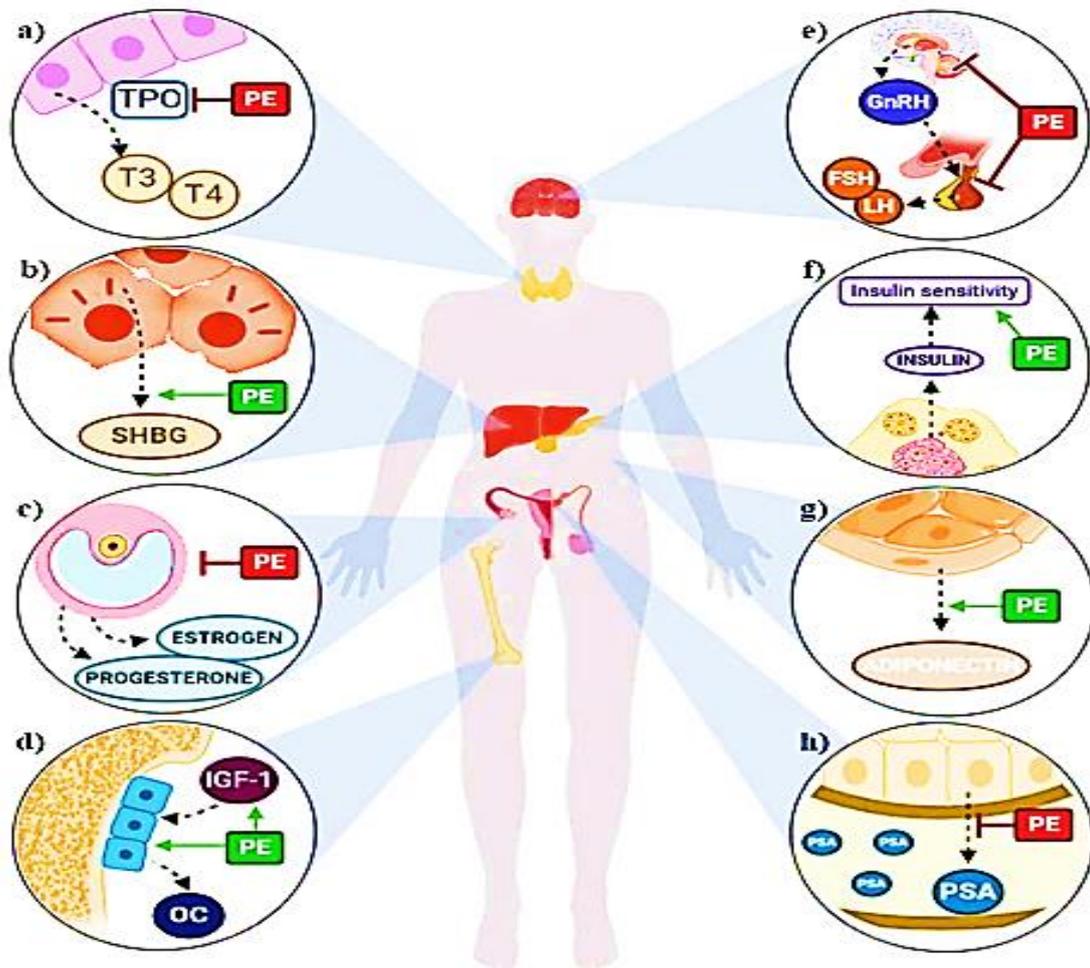


Figure 16: Résumé des effets potentiels des phyto-œstrogènes sur la santé par la modulation du système endocrinien (Domínguez-López *et al.*, 2020).

a = Thyroïdes, **b** = Foie, **c** = Ovaire, **d** = Os, **e** = Axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique, **f** = Pancréas, **g** = Tissu adipeux, **h** = Prostate, **FSH** = Hormone folliculo-stimulante ; **GnRH** = Hormone de libération de la gonadotrophine ; **IGF-1** = Facteur de croissance de l'insuline 1 ; **LH** = Hormone lutéinisante ; **OC** = Ostéocalcine ; **PE** = Phytoœstrogènes ; **PSA** = antigène spécifique de la prostate ; **SHBG** = "Sex Hormone Binding Globulin"; **T3** = Triiodothyronine ; **T4** = Thyroxine ; **TPO** = "Thyroid peroxydase".

I.3.5.3- Phyto-œstrogènes et fonction cardio-vasculaire

Certains PEs comme les isoflavones et les lignanes semblent diminuer le LDL cholestérol et le cholestérol total (Howes *et al.*, 2000). Chez l'Homme, il existe un lien entre la concentration sérique en entérolactone et la diminution du risque cardio-vasculaire (Vanharanta *et al.*, 2003). De même, une consommation régulière de resvératrol limite les risques de maladies cardio-vasculaires. Les mécanismes cellulaires par lesquels les PEs pourraient avoir un effet sur le système cardio-vasculaire sont encore flous. Cependant, certains PEs à l'instar de la génistéine activent la eNOS rapidement via une série de phosphorylations et une augmentation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), et ces effets ne sont pas

inhibés par des antagonistes spécifiques des voies de signalisation classiques des œstrogènes (Liu *et al.*, 2004). Cette augmentation de l'expression de la eNOS (*Endothelial nitric oxide synthase*) expliquerait la forte réputation des PEs dans le traitement de l'hypertension. En outre, les ptérostilbène sont des PEs connus pour avoir des effets antiadipogénique et hypotriglycéridémiant en inhibant la prolifération et la différenciation des cellules 3T3-L1 en adipocytes, l'accumulation des acides gras et l'expression de la Diacylglycerol O-acyltransferase 1 (DGAT1) qui est une enzyme responsable de la synthèse des triglycérides (Seo *et al.*, 2017). Ils réduisent par ailleurs l'expression du *Peroxisome proliferator activated receptors γ* (PPAR γ) (Seo *et al.*, 2017) qui est incriminé dans les processus d'installation de l'insulinorésistance et des dyslipidémies (Barry et Gerald, 2010).

I.3.5.4- Phyto-œstrogènes et fonction osseuse

Chez les femmes ménopausées, l'influence des PEs sur la densité minérale osseuse a fait l'objet de nombreuses études, dont la plupart démontrent un effet bénéfique (Al-Anazi *et al.*, 2011). Ainsi, une première étude a montré que les femmes consommant le plus d'isoflavones avaient une densité minérale osseuse lombaire plus importante que les autres groupes, notamment celui des femmes préménopausées (Mei *et al.*, 2001). Cependant, d'autres études ne montrent pas d'effet des PE sur l'os (Dalais *et al.*, 2003). Chez l'animal et *in vitro*, il y a une action positive des PEs sur la minéralisation osseuse, la différenciation ostéoblastique et l'inhibition de l'activité ostéoclastique (Rassi *et al.*, 2002). Il a été prouvé que certains PEs stimulaient l'activité de la phosphatase alcaline des ostéoblastes en culture (Vergne *et al.*, 2008).

I.3.5.5- Phyto-œstrogènes et le système immunitaire

Les PEs affectent le système immunitaire par sa capacité à inhiber les voies de signalisation intracellulaires associées au NF-kappa B et les réponses immunitaires. La génistéine peut supprimer des réponses immunitaires spécifiques et la prolifération des lymphocytes (Jefferson et Williams, 2011). Les PEs suppriment la réponse immunitaire *in vivo* et *in vitro*. Les PEs peuvent supprimer des réponses immunitaires spécifiques et réprimer la prolifération des lymphocytes. De plus, la génistéine peut inhiber une réponse inflammatoire allergique. Certains PEs peuvent augmenter la production de cytokines par les lymphocytes T et renforcer les réponses cytotoxiques par l'intermédiaire de tueurs naturels et de lymphocytes T cytotoxiques (Chiang et Pan, 2013).

I.3.5.5- Phyto-œstrogènes et perturbation de la fonction de reproduction féminine

Les PEs ont des effets différents sur le processus de reproduction. La génistéine peut stimuler la sécrétion de la progestérone dans les ovaires, la production d'œstradiol et la production d'AMPc, la maturation des ovocytes et le développement des zygotes au stade préimplantatoire. Les PEs peuvent inhiber la prolifération des follicules ovariens et affecter négativement la libération d'hormones stéroïdes par les cellules ovariennes. Les isoflavones peuvent modifier le développement sexuel des animaux, notamment en modifiant la puberté, en perturbant le cycle œstral et la fonction ovarienne. Plusieurs études suggèrent que les isoflavones contenues dans le lait maternel ont un effet négatif sur le développement reproductif des fœtus à naître, bien que les effets secondaires des PEs sur la santé reproductive n'aient pas été largement rapportés et vulgarisés (Jefferson et Williams, 2011 ; Cederroth et Zimmermann, 2012).

Au laboratoire de Physiologie Animale de l'Université de Yaoundé 1, plusieurs plantes ont montré de potentiels effets œstrogéniques sur le tractus génital des rates ainsi que sur certains troubles ménopausiques, à savoir, *Erythrina lysistemon* (Mvondo *et al.*, 2012), *Gouania longipetala* (Dzeufiet *et al.*, 2015), *Anthocleista schweinfurthii* (Ngoungouré *et al.*, 2017) et *Mammea africana* (Mengue *et al.*, 2023). Nombreuses de ces plantes sont également utilisées dans le traitement d'autres affections indépendamment du sexe comme le diabète avec *Gouania longipetala* (Ezeja *et al.*, 2014) et de l'ulcère gastrique avec *Anthocleista schweinfurthii* (Mezui *et al.*, 2015) sans une cause œstrogénopénique ; ce qui probablement aurait un impact sur la fonction de reproduction femelle au regard de la possibilité de ces plantes par leur activité œstrogénique à inhiber l'axe hypothalamo-hypophysaire. D'autres plantes comme *Pterocarpus soyauxii* dont les effets œstrogéniques n'ont pas encore été prouvés sont également utilisées pour traiter les troubles ménopausiques (Mengue *et al.*, 2023) et contre le diabète et l'hypertension chez les femmes non ménopausées.

I.4.- Generalites sur *Pterocarpus soyauxii*

I.4.1- Caractéristiques morphologiques

Connu comme Padouk d'Afrique, *P. soyauxii* est vernaculairement connu sous les noms de *Kisese*, *Mbel*, *Mukula* ou *N'gula* et *Tacula* respectivement au Congo Brazzaville, au Cameroun, en RDC et en Angola. *Pterocarpus soyauxii* est un arbre à feuilles persistantes ; il peut atteindre 30 à 50 mètres de hauteur. Son fût droit et cylindrique peut atteindre 1,4 mètre

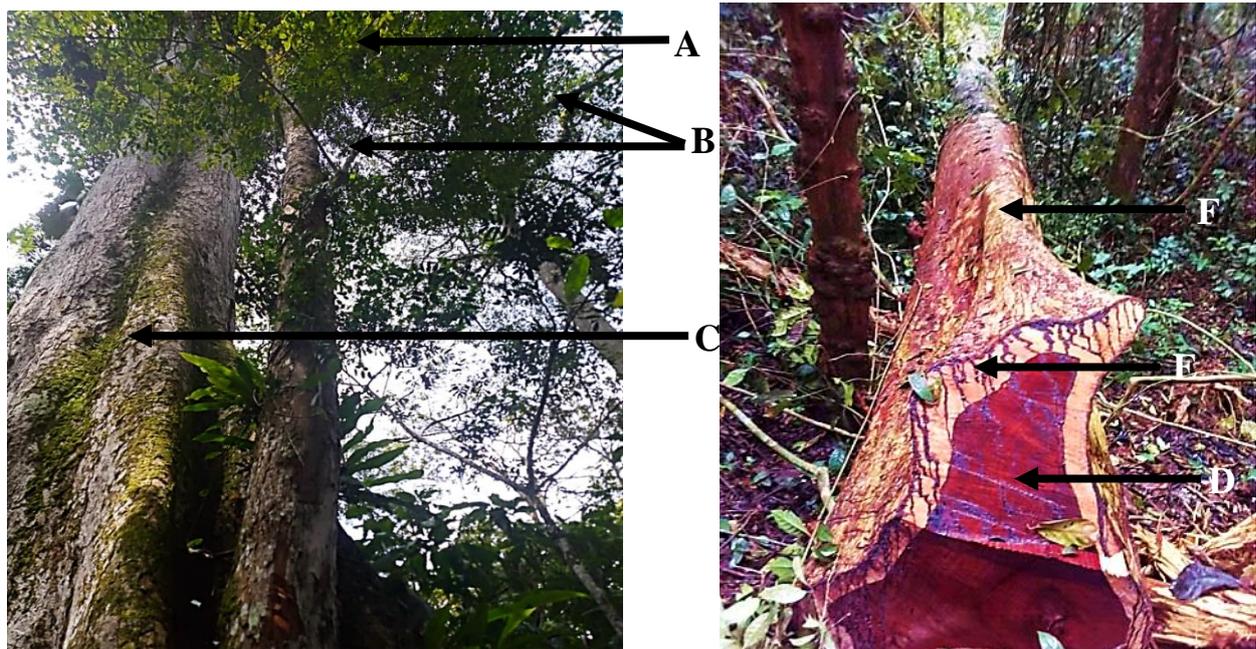


Figure 17 : Photographie des différentes parties de *Pterocarpus soyauxii* (Prise par Owona Pascal à Ngomedzap, Septembre 2018).

A = Feuilles, **B** = Branches, **C** = Tronc, **D** = Duramen, **E** = Aubier, **F** = Ecorce.

I.4.2- Taxonomie

La taxonomie de *Pterocarpus soyauxii* est celle de White en 1986, tenant compte de la classification de l'APG IV de 2016 (« *Angiosperms Phylogeny Group* »).

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

I.4.3- Utilisations ethnopharmacologiques de *Pterocarpus soyauxii*

Au Nigéria et au Cameroun, *Pterocarpus soyauxii* est utilisé pour la prise en charge du rhumatisme, de la fièvre, du diabète, des dermatoses, des parasitoses gastro-intestinales et de l'hypertension (Ebi et Ofoefule, 2000, Tchamadeu *et al.*, 2011). Les feuilles sont utilisées pour leurs propriétés antibactériennes au Nigéria et pour leur valeur nutritionnelle en vitamine C (Ngumah *et al.*, 2016, Saha *et al.*, 2013). L'écorce est utilisée pour traiter la dysenterie et contre les maux de dents, la gonorrhée, les menstruations excessives, la dysménorrhée, l'hémorragie utérine, la dysenterie, les hémorroïdes et la hernie ombilicale (Betti, 2004 ; Mpondo *et al.*, 2017 ; Moronkola *et al.*, 2019). La pulpe obtenue par grattage de la surface intérieure de l'écorce est appliquée comme pansement humide contre les inflammations, les hernies naissantes et la jaunisse (Betti et Lejoly, 2009). Le duramen de *Pterocarpus soyauxii* est utilisé comme d'autres espèces du genre pour son activité antiplasmodiale et pour le traitement des troubles génitaux-urinaires (Saslis-Lagoudakis *et al.*, 2011). Le bois en poudre, cuit avec une tranche de chaux, est utilisé comme pansement sur les blessures. La plante est par ailleurs réputée au Gabon pour ses propriétés antidiurétiques (Saha *et al.*, 2013). Des décoctions ou des bains de vapeur des feuilles et de l'écorce sont pris contre les affections broncho-pulmonaires et la macération du duramen est utilisée à Ngomedzap (Centre, Cameroun) pour traiter les aménorrhées primaires et secondaires et les troubles ménopausiques (Mengue *et al.*, 2023).

I.4.4- Travaux scientifiques antérieurs effectués avec *Pterocarpus soyauxii*

P. soyauxii est étudié depuis de nombreuses années dans des études pharmacologiques et nombreuses d'entre elles lui ont rapporté des propriétés thérapeutiques et une forte richesse en de nombreuses molécules bioactives. Dans les travaux de Barend *et al.* (1987), deux ptéocarpanes (le 8-hydroxy-3,9-diméthoxy- et le 3,8-dihydroxy-9-méthoxy-ptéocarpan) et un

analogue du santal ainsi que des isoflavanes, isoflavones et trans-pterostilbène ont été isolés de l'extrait duramen de *P. soyauxii*. Egwurugwu *et al.* (2009) et Obaji *et al.* (2010) ont mis en lumière un effet hématopoïétique et dose dépendant de l'extrait brut des feuilles de *P. soyauxii* chez les rats Wistar. Les travaux de Tchamadeu *et al.* (2011) ont montré que l'extrait aqueux de l'écorce de la tige de *Pterocarpus soyauxii* Taub avait une très faible toxicité en cas d'administration orale aiguë à forte dose et aucune toxicité en cas d'administration orale subchronique à faible dose. Il a par ailleurs été démontré que les feuilles de *P. soyauxii* supplémentées aux aliments normalisaient les altérations hématologiques associées au diabète sucré (Jamiyu *et al.*, 2012). Su *et al.* (2013) ont montré que l'extrait éthanolique du duramen de *Pterocarpus soyauxii* et 6 de ses composés isolés présentaient une forte cytotoxicité contre les cellules humaines de cancer du poumon (A549), de cancer du pancréas (Panc-28) et de carcinome du colon (HCT-116). Les extraits du duramen de *P. soyauxii* ont montré dans les travaux de Saha *et al.* (2013) des activités antioxydantes avec l'homoptérocarpine et la ptérocarpine comme principaux composés. Su *et al.* (2014) dans une autre étude a permis d'isoler dans l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* trois benzofuranes et un nouvel isoflavane aux noms respectifs de Pteroyanins G, H, I et J. Jamiyu *et al.* (2016) ont rapporté des propriétés antiamnésiques et hypoglycémiantes d'une supplémentation alimentaire en feuilles de *Pterocarpus soyauxii* chez des rats. Tchamadeu *et al.* (2017) ont rapporté des propriétés antidiabétiques de l'extrait aqueux et au dichlorométhane/méthanol des écorces de *P. soyauxii*. Les travaux effectués par Okezie *et al.* (2018) ont mis en évidence dans l'extrait des feuilles de *P. soyauxii* des micronutriments (calcium, magnésium, phosphore, le potassium et le zinc) des vitamines (A, B, C et E), des glycosides et des alcaloïdes. Ojah et Moronkola. (2020) ont rapporté dans leurs travaux un effet inhibiteur de l'alpha-amylase et de l'alpha-glucosidase des fractions à l'hexane, à l'éthyl-acétate et au méthanol des feuilles de *P. soyauxii*.

I.5- Toxicité

I.5.1- Généralités

La toxicité englobe l'ensemble des effets néfastes d'une substance dite toxique sur un organisme vivant (Lapointe, 2004). En d'autres termes, il s'agit du caractère des substances toxiques qui, au contact ou après pénétration dans un organisme vivant introduite à dose unique relativement élevée ou à des petites doses longtemps répétées, ont la propriété de causer un dysfonctionnement à l'échelle moléculaire, cellulaire ou organique (Viau et Tardif, 2003 ; Etame *et al.*, 2017). Les études toxicologiques sont d'une grande importance dans l'étude pharmacologique des médicaments car elles permettent l'évaluation du risque toxique des

médicaments utilisés en médecine moderne ou traditionnelle en vue du développement des substances plus sûres et d'une meilleure prescription clinique (Serrano, 1990). De telles études sont réalisées chez plusieurs espèces d'animaux avec des doses largement au-dessus de la dose thérapeutique (Rang *et al.*, 2003). On distingue cliniquement trois formes essentielles de toxicité : la toxicité aiguë, la toxicité subchronique et la toxicité à long terme ou chronique. Dans la présente étude, seules les 2 premières toxicités ont été évaluées.

I.5.2- Toxicité aiguë

On parle de toxicité aiguë si des effets défavorables apparaissent après administration par voie orale d'une dose unique de substance ou de plusieurs doses données sur une période de 24 heures (OCDE, 2001). Pour cela, la durée d'observation des lots d'animaux expérimentaux traités chacun avec une dose de l'extrait doit être suffisante pour noter la mortalité et les éventuelles modifications comportementales (OMS, 2000). Ces études peuvent donner une indication des effets probables d'un surdosage aigu chez l'homme et peuvent être utiles pour la conception des études de toxicité par administration répétée (Serrano, 1990). Les substances chimiques peuvent ainsi être classées en différentes catégories. Des valeurs de dose létale 50 (DL50) supérieures à 5000 mg/kg sans symptômes d'intoxication aiguë, ni de morts correspondent à des substances faiblement ou pratiquement non toxiques. La dose létale 50 étant la dose en administration unique qui tue la moitié de la population étudiée (OMS, 1992).

I.5.3- Toxicité subchronique

Certains effets néfastes peuvent prendre plusieurs semaines avant d'être diagnostiqués et éventuellement se révéler réversibles ou irréversibles. L'évaluation de la toxicité aiguë ne permet pas de prédire ce type de toxicité d'une substance. Des études destinées à évaluer la toxicité subchronique doivent donc être effectuées. Celles-ci durent un à 3 mois et supposent l'administration de plus d'une dose à des intervalles variant selon la méthode employée (Lapointe, 2004).

CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1- Matériel

II.1.1- Matériel animal

Les animaux utilisés dans le présent travail étaient des rates de souche *Wistar* âgées de 8 à 10 semaines et pesant entre 130-150 g. Ils ont été élevés à l'animalerie du laboratoire de Physiologie Animale de l'Université de Yaoundé I. Ces animaux étaient logés dans des cages en plastique à raison de 5 animaux par cage, maintenus à température ambiante sous un cycle diurne/nocturne naturel et avaient un accès libre à l'eau de robinet et à la nourriture. Pour un sac de 50 kg d'aliment, la composition alimentaire était de 60% de maïs, 20% de poisson, 10% de blé, 6% d'arachides, 3% de farine d'os et 1% de complexe vitaminique.

II.1.2- Matériel végétal

Le duramen de *Pterocarpus soyauxii* Taub (*Fabaceae*) ont été récoltées à Ngomedzap (Centre, Cameroun) en septembre 2018. La plante a été authentifiée à l'Herbier National du Cameroun en comparaison à l'échantillon de Thomas O.W8175 du spécimen de la collection d'herbier N° 56984HNC.

II-2-Méthodes

II.2.1- Extraction aqueuse du duramen de *Pterocarpus soyauxii*

Le duramen a été découpé en petits morceaux puis séché à l'ombre pendant 42 jours. Les morceaux secs ont été pilés dans un mortier puis le broyat a été tamisé pour obtenir une poudre fine. Soixante-dix grammes de cette poudre ont été macérés pendant 48 h dans 2 L d'eau distillée selon les recommandations du tradithérapeute. Le macérât obtenu a été filtré à l'aide du papier Whatman N° 3 et le filtrat obtenu a été séché à l'étuve à 45 °C. Ce protocole a permis d'obtenir 5,6 g d'extrait brut, soit un rendement de 8 % (Figure 18).

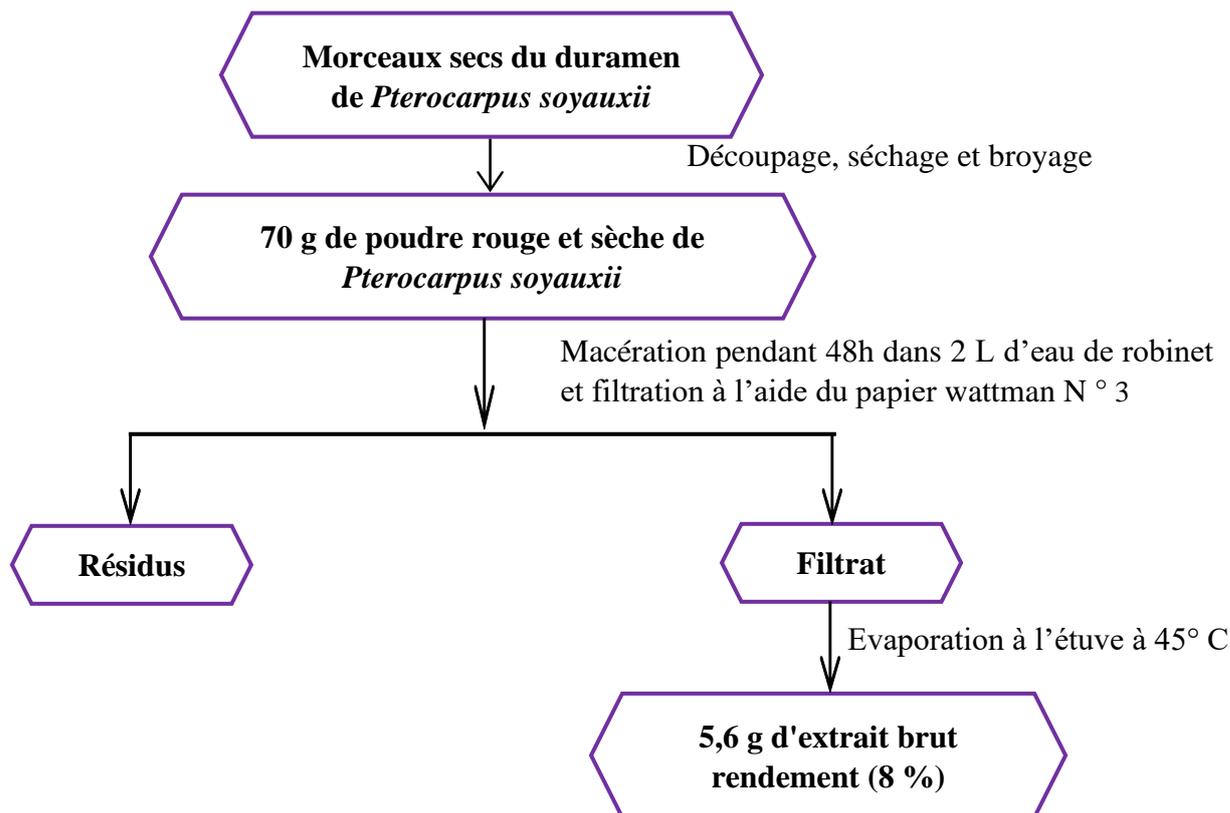


Figure 18: Protocole d'extraction aqueuse du duramen de *Pterocarpus soyauxii*.

II.2.2- Détermination de la dose équivalente chez l'humain et calcul des doses expérimentales de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* chez le rat

Les recommandations du tradithérapeute ont permis d'obtenir à partir de 400 mL de macérât, 1,12 g d'extrait brut après séchage. Cette masse d'extrait a été divisée par 70 kg puis multipliée par 1000 pour obtenir une dose équivalente humaine (DEH) égale à 16 mg/kg. La dose utilisée chez le rat a été déterminée en multipliant la DEH par 6,2 selon la méthode décrite par Nair et Jacob. (2016) ; ce qui a permis d'obtenir une dose d'environ 100 mg/kg. Cette dose a été divisée par 2 puis multipliée successivement par 2, 3 et 4 pour obtenir les doses de 50, 200, 300 et de 400 mg/kg.

II.2.3- Analyses phytochimiques

II.2.3.1- Analyse phytochimique qualitative

La phytochimie qualitative consiste en la mise en évidence des différentes classes de composés bioactifs présents dans les extraits de plantes et ayant un intérêt pharmacologique par la réalisation de réactions chimiques caractéristiques.

✓ **Mise en évidence des phénols**

Dans une solution de *P. soyauxii* (0,1 g/mL) ont été ajoutées quelques gouttes de chlorure de fer 5 %. La formation d'une coloration vert foncé du mélange obtenu indique la présence des phénols (Mir *et al.*, 2013).

✓ **Mise en évidence des flavonoïdes**

Dans une solution de *P. soyauxii* (0,1 g/mL) a été ajouté 1 mL d'ammoniac dilué à 1%. Après filtration, 0,2 mL d'acide sulfurique concentré a été ajouté à cette solution. La formation d'une coloration jaune qui disparaît progressivement indique la présence des flavonoïdes (Ayoola *et al.*, 2008 ; Mir *et al.*, 2013).

✓ **Mise en évidence des saponines**

Une solution de *P. soyauxii* (0,1 g/mL) a été vigoureusement agitée. La formation d'une mousse persistante au-delà de 10 minutes était le signe de la présence des saponines dans l'extrait.

✓ **Mise en évidence des glucosides**

Ce test est basé sur la réaction de Keller-Kiliani. A 1 mL de l'extrait (0,1 g/mL), a été ajouté 0,4 mL d'acide acétique glacial contenant une goutte de FeCl₃ concentré à 1 % et 0,2 mL d'acide sulfurique. La présence des glucosides est confirmée par la formation de deux phases, une colorée en brun rouge (acide acétique) et la deuxième en bleu-vert (acide sulfurique) (Edeoga *et al.*, 2005).

✓ **Mise en évidence des tanins**

Une masse de 0,1 g d'extrait de *P. soyauxii* a été dissoute dans 2 mL d'eau distillée. La solution a été ensuite filtrée. Après ajout de 2 à 3 gouttes de solution de chlorure ferrique FeCl₃ à 2%, l'observation d'une coloration vert-marron ou bleue-noir indique la présence des tanins (Karumi *et al.*, 2004).

✓ **Mise en évidence des alcaloïdes**

Pour mettre en évidence les alcaloïdes dans l'extrait de *P. soyauxii*, 0,1 g de cet extrait a été dissout dans 10 mL d'alcool acide puis bouilli et filtré. A 5 mL de filtrat ont été ajoutés 2 mL d'ammoniac dilué, puis 5 mL de chloroforme ont été ajoutés doucement pour extraire la base alcaloïde. La formation d'un précipité rouge brun avec le réactif de Dragendorff indiquait la présence des alcaloïdes (Ayoola *et al.*, 2008).

✓ **Mise en évidence des stéroïdes**

Deux cents milligrammes d'extrait ont été dissout dans 10 mL de chloroforme. Deux millilitres d'acide acétique y ont été introduits et l'ensemble a été refroidi dans un bain de glace. Quelques gouttes d'acide sulfurique concentré ont été ajoutées et la formation d'un anneau bleu gris marquait la présence des stéroïdes (Sofowora, 1993).

✓ **Mise en évidence des triterpènes**

A 10 mL d'une solution d'extrait concentrée à 10 mg/mL, 2 mL de chloroforme ont été ajoutés et l'ensemble a été homogénéisé. Trois millilitres d'acide sulfurique ont ensuite été ajoutés afin de former deux phases. La formation d'une interface brune rougeâtre marquait la présence des terpénoïdes (Trease et Evans, 1989).

✓ **Mise en évidence des quinones**

A 2 mL d'extrait de *P. soyauxii*, 2 à 3 gouttes de NaOH 10 % ont été ajoutées. Le virage de la phase aqueuse au rouge traduisait la présence des quinones dans la solution.

II.2.3.2- Analyse UHPLC-MS de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii*

L'analyse UHPLC-MS réalisée à l'école normale supérieure de Yaoundé 1 dans le cadre du projet YABINAPA et a été utilisée pour déterminer le profil phytochimique de l'extrait de *P. soyauxii*. Pour obtenir des spectres de masse haute résolution de l'extrait, un spectromètre (QTOF Bruker, Allemagne) équipé d'une source d'ionisation par électrobulbation chauffée (HESI) a été utilisé. Le spectromètre a été mis en mode positif (gamme de masse : 100-1500, avec une vitesse de balayage de 1,00 Hz) avec un contrôle automatique du gain pour fournir des mesures de masse de haute précision avec une déviation de 0,40 ppm en utilisant le formate de sodium comme calibrant. Une tension de pulvérisation de 4,5 kV et une température capillaire de 200 °C ont été utilisées pour les analyses. De l'azote a été utilisé comme gaz de gaine (10 L/min). Le spectromètre était attaché à un système UHPLC Ultimate 3000 (Thermo Fisher, Allemagne) composé d'une pompe LC, d'un détecteur à réseau de diodes (DAD) (λ : 190-600 nm), d'un échantillonneur automatique (volume d'injection 10 μ L) et d'un four à colonne (40 °C). La séparation a été réalisée à l'aide d'une colonne Synergi MAXRP 100A (50 x 2 mm, taille des particules 2,5 μ) avec un gradient H₂O (+0,1 % HCOOH) (A)/acétonitrile (+0,1 % HCOOH) (B) (débit 500 μ L/min, volume d'injection 5 μ L). L'échantillon a été analysé en utilisant un programme de gradient comme suit : 95 % A isocratique pendant 1,5 min, gradient linéaire jusqu'à 100 % B sur 6 min, après 100 % B isocratique pendant 2 min, le

système est revenu à sa condition initiale (90 % A) en 1 min, et a été équilibré pendant 1 min. Sur la base de la masse des composés précédemment identifiés dans le genre *Pterocarpus*, l'identification des composés a été effectuée en utilisant une base de données.

II.2.3.3- Analyse phytochimique quantitative

II.2.3.3.1- Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes dans l'extrait de *P. soyauxii* a été déterminée par la méthode décrite par Zhishen *et al.* (1999). L'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* a été homogénéisé avec un solvant d'extraction préparé avec le mélange méthanol-eau distillée-acide acétique (140 : 50 : 10, v/v). Le mélange a été filtré à l'aide du papier filtre Wattman n°3. A 0,2 mL du filtrat, a été ajouté 1 mL du réactif de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) (formé de 133 mg des cristaux de chlorure d'aluminium et 400 mg de cristaux d'acétate de sodium dissous dans 100 mL du solvant d'extraction) a été ajoutés et l'ensemble a été mélangé à l'aide du vortex. L'absorbance a été lue contre le blanc à 430 nm. Les teneurs en flavonoïdes ont été exprimées en milligrammes équivalents de Quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait) en utilisant la droite d'étalonnage de la figure 19.

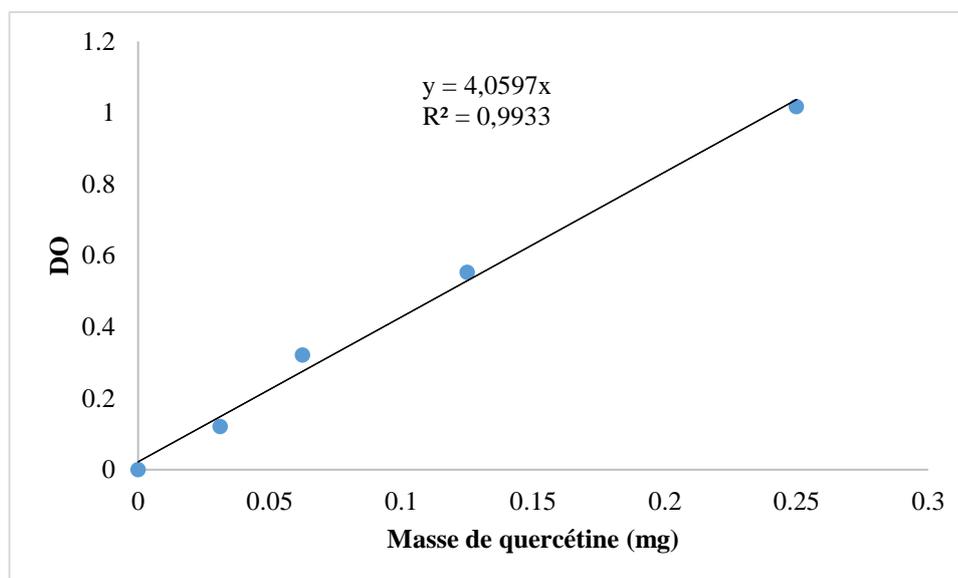


Figure 19: Courbe d'étalonnage pour la détermination de la teneur en flavonoïdes.

La concentration de quercétine a été déterminée à partir de l'équation de droite $y = 4,0597x$. y correspondant à l'absorbance de l'échantillon et x correspondant à concentration de quercétine en mg/mL à déterminer pour un échantillon.

II.2.3.3.2- Dosage des polyphénols

Les polyphénols totaux ont été évalués suivant la méthode spectrophotométrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu décrite par Chun *et al.* (2003). Environ 0,2 mL d'extrait aqueux de *P. soyauxii* (2 mg/mL) a été introduit dans un tube à essai, ensuite 1,2 mL d'eau distillée et 0,2 mL de réactif de Folin-Ciocalteu (10%). Après 3 min de repos, 0,4 mL de carbonate de sodium (Na_2CO_3 7,5%) ont été ajoutés au mélange. Les tubes ont été bien agités à l'aide d'un vortex, et incubés pendant 20 minutes dans un bain-marie à 40°C et l'absorbance a été lue contre le blanc à 760 nm. L'étalonnage a été réalisé à l'aide d'une solution aqueuse fraîchement préparée d'acide gallique (0,2 mg/mL). Les teneurs en polyphénols totaux ont été exprimées en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait) en utilisant la droite d'étalonnage (Figure 20).

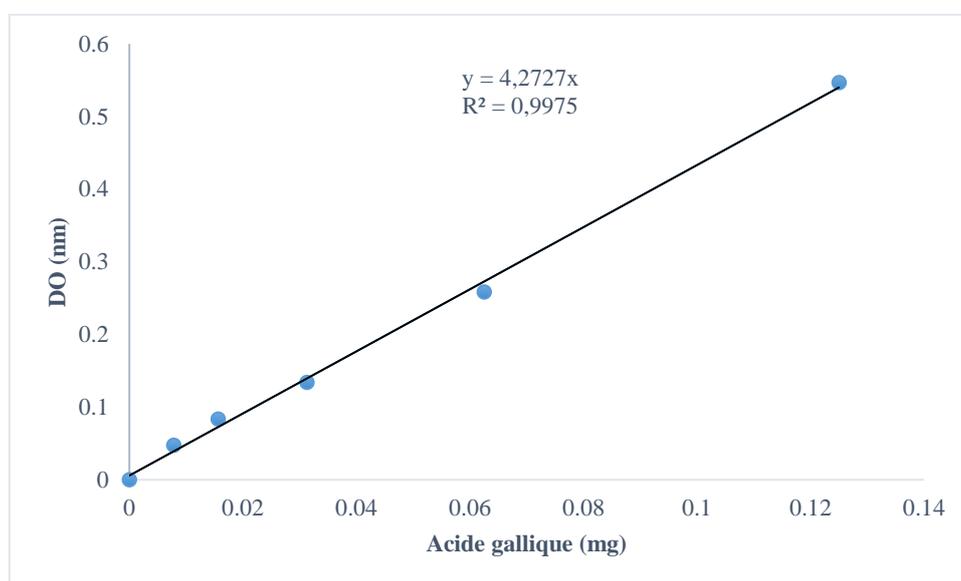


Figure 20: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

La concentration en acide gallique a été déterminée à partir de l'équation de droite $y = 4,2727x$. y correspondant à l'absorbance de l'échantillon et x correspondant à concentration d'acide gallique en mg/mL à déterminer pour un échantillon.

II.2.3.3.3- Dosage des tanins

Les tannins ont été déterminés suivant la méthode décrite par Broadhurst et Jones. (1978) en utilisant la vanilline acidifiée et l'acide tannique comme standard. Un volume de 1 mL d'extrait de *P. soyauxii* (2 mg/ml) a été introduit dans des tubes à essai recouverts de papier aluminium suivie de l'ajout de 3 mL d'une solution fraîchement préparée de vanilline 4% dans l'éthanol (w/v). Après agitation, 1 mL d'acide chlorhydrique concentré a été ajouté dans chaque

tube à essai qui, par la suite a été laissé au repos à température ambiante pendant 15 min et l'absorbance a été lue à 500 nm contre le blanc. La teneur en tannin a été exprimée en mg équivalent acide tannique par gramme de matière sèche en utilisant la courbe d'étalonnage de l'acide tannique (Figure 21).

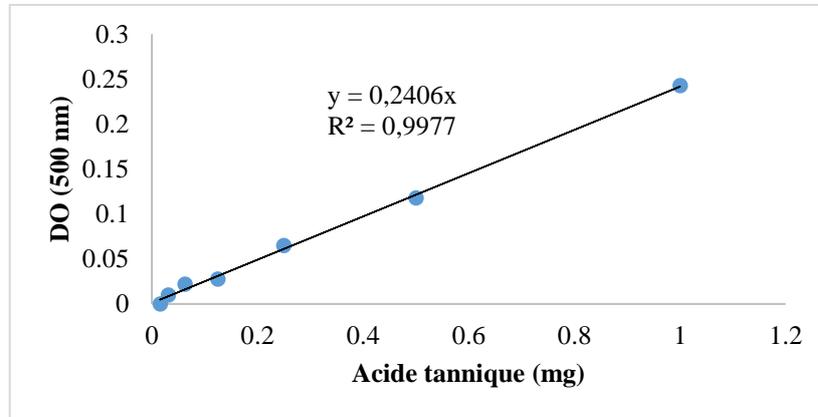


Figure 21: Courbe d'étalonnage de l'acide tannique.

La concentration en acide tannique a été déterminée à partir de l'équation de droite $y = 0,2406x$. y correspondant à l'absorbance de l'échantillon et x correspondant à concentration d'acide tannique en mg/mL à déterminer pour un échantillon.

II.2.3.4- Evaluation *in vitro* de l'activité antioxydante de *P. soyauxii*

II.2.3.4.1- Détermination de l'activité antiradicalaire de *P. soyauxii* sur les radicaux DPPH (1, 1,-diphényl-2-picrylhydrazyl)

✓ Principe

Le test est basé sur la capacité des composés des extraits à fournir des protons au radical libre 2, 2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Mensor *et al.*, 2001). Le radical DPPH est instable et lorsqu'il réagit avec un composé antioxydant, qui peut donner des ions hydrogène, il est réduit et devient stable. Ce pouvoir réducteur de l'extrait est révélé par un changement de couleur du violet au jaune. Une diminution de l'absorbance à 517 nm est proportionnelle au potentiel antioxydant de l'extrait de *P. soyauxii*.

✓ Mode opératoire

L'activité de piégeage du radical libre DPPH par l'extrait aqueux de *P. soyauxii* a été évaluée en utilisant la méthode décrite par Mensor *et al.* (2001).

L'extrait de *P. soyauxii* (1000 µg/mL) a été dilué avec du méthanol. Cinquante microlitres de l'extrait dilué ont été mélangés avec 150 µL de solution méthanolique de DPPH à 0,02%, ce

qui a donné une concentration finale d'extrait allant de 250 à 1,9531 µg/mL (250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,8125, 3,9062 et 1,9531µg/mL). Après 30 min d'incubation à l'obscurité à température ambiante, la densité optique a été mesurée à 517 nm sous un spectrophotomètre à lumière UV/Visible (Infinite M200, TECAN, Suisse). L'acide ascorbique (Vitamine C) a été utilisé comme contrôle positif. Chaque essai a été effectué en trois exemplaires et les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne ± écart-type (ET).

L'acide ascorbique (Vitamine C) a été utilisé comme contrôle. Chaque essai a été effectué en triplicate et les résultats ont été exprimé sous forme de moyenne ± l'écart-type (ET) des trois résultats, ont été présentés sous forme de tableau. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition et calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\text{Abs témoin} - \text{Abs échantillon})}{\text{Abs témoin}} \times 100$$

II.2.3.4.2- Détermination de l'activité antiradicalaire de *P. soyauxii* sur le radical acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

✓ Principe

Le radical ABTS⁺ est formé par la perte d'un électron de l'atome d'azote de l'ABTS en présence de permanganate de potassium (KMnO₄) ou de persulfate de potassium (K₂S₂O₈). Le principe repose sur la capacité des composés contenus dans l'extrait à réduire le radical bleu-vert ABTS⁺ en ABTS incolore en donnant son H⁺ (Re *et al.*, 1999). La décoloration du radical mesurée par spectrophotométrie à 734 nm est proportionnelle à la concentration antioxydante des extraits.

✓ Mode opératoire

L'extrait aqueux de *P. soyauxii* (1000 µg/mL) a été dilué deux fois en série avec du méthanol. Vingt-cinq microlitres de l'extrait dilué ont été mélangés avec soixante-quinze µl de solution méthanolique d'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS), pour obtenir une concentration finale de l'extrait comprise entre 250 et 1,9531 µg/mL (250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,8125, 3,9062 et 1,9531 µg/ml). Après 30 min d'incubation à l'obscurité à température ambiante, les densités optiques ont été mesurées à 734 nm sous un spectrophotomètre à lumière UV/Visible (Infinite M200 (TECAN, Suisse)).

L'acide ascorbique (Vitamine C) a été utilisé comme contrôle. Chaque essai a été effectué en triplicate et les résultats ont été exprimé sous forme de moyenne ± l'écart-type (ET) des trois

résultats, ont été présentés sous forme de tableau. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition et calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\text{Abs témoin} - \text{Abs échantillon})}{\text{Abs témoin}} \times 100$$

II.2.3.4.3- Détermination de l'activité antiradicalaire de *P. soyauxii* sur le radical *Ferric-Reducing Antioxidant Power* (FRAP)

Le test a été réalisé selon la méthode décrite par Benzie et Strain. (1996) avec de légères modifications.

✓ Principe

Le test est basé sur la réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} par les composants de l'extrait, qui en présence d'ortho-phénanthroline forme un complexe de couleur brune ou rouge-orange (Benzie et Strain, 1996). Le complexe absorbe à 505 nm et l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de Fe^{3+} convertie par l'extrait.

✓ Mode opératoire

Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations (31,25, 62,5, 125, 250, et 500 mg/mL) est mélangé avec 2,5 mL d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1 %. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50 °C pendant 20 min ensuite, 2,5 mL d'acide trichloroacétique à 10 % sont ajoutés pour stopper la réaction et les tubes sont centrifugés à 3000 tours pendant 10 min. Un aliquote (2,5 mL) de surnageant est combinée avec 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL d'une solution aqueuse de FeCl_3 à 0,1 %. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide gallique dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons.

Les résultats ont été exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait.

II.2.4- Evaluation de l'activité œstrogénique de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii*

II.2.4.1- Répartition, traitement des rates et paramètres évalués

Trente-cinq rates ont été ovariectomisées et 5 autres ont subi une simulation chirurgicale (*Sham-operated*). Après 14 jours de déclin hormonal, les rates ovariectomisées ont été réparties

en 7 lots de 5 animaux chacun. Le groupe témoin négatif (Ovx) et le groupe *sham-operated* ont reçu de l'eau distillée à raison de 10 mL/kg, un groupe témoin positif a reçu l'œstradiol valérate (E₂V) à la dose de 1 mg/kg. Cinq autres groupes ont été traités à l'extrait aqueux de la plante aux doses 50, 100, 200, 300 et de 400 mg/kg. Les traitements ont été faits par gavage œsophagien pour les animaux ayant reçu l'extrait pendant une durée de 3 jours. A la fin du traitement, un frottis vaginal de chaque rate a été réalisé. Les animaux ont par la suite été sacrifiés. L'utérus prélevé a été directement pesé et un homogénat de l'une de ses cornes a été réalisé. L'utérus, le vagin et la glande mammaire ont été fixés dans du formaldéhyde tamponné à 10% pour l'analyse histologique. La concentration des protéines totales utérines a été évaluée par dosage colorimétrique dans le surnageant de l'utérus de chaque rate (Figure 22).

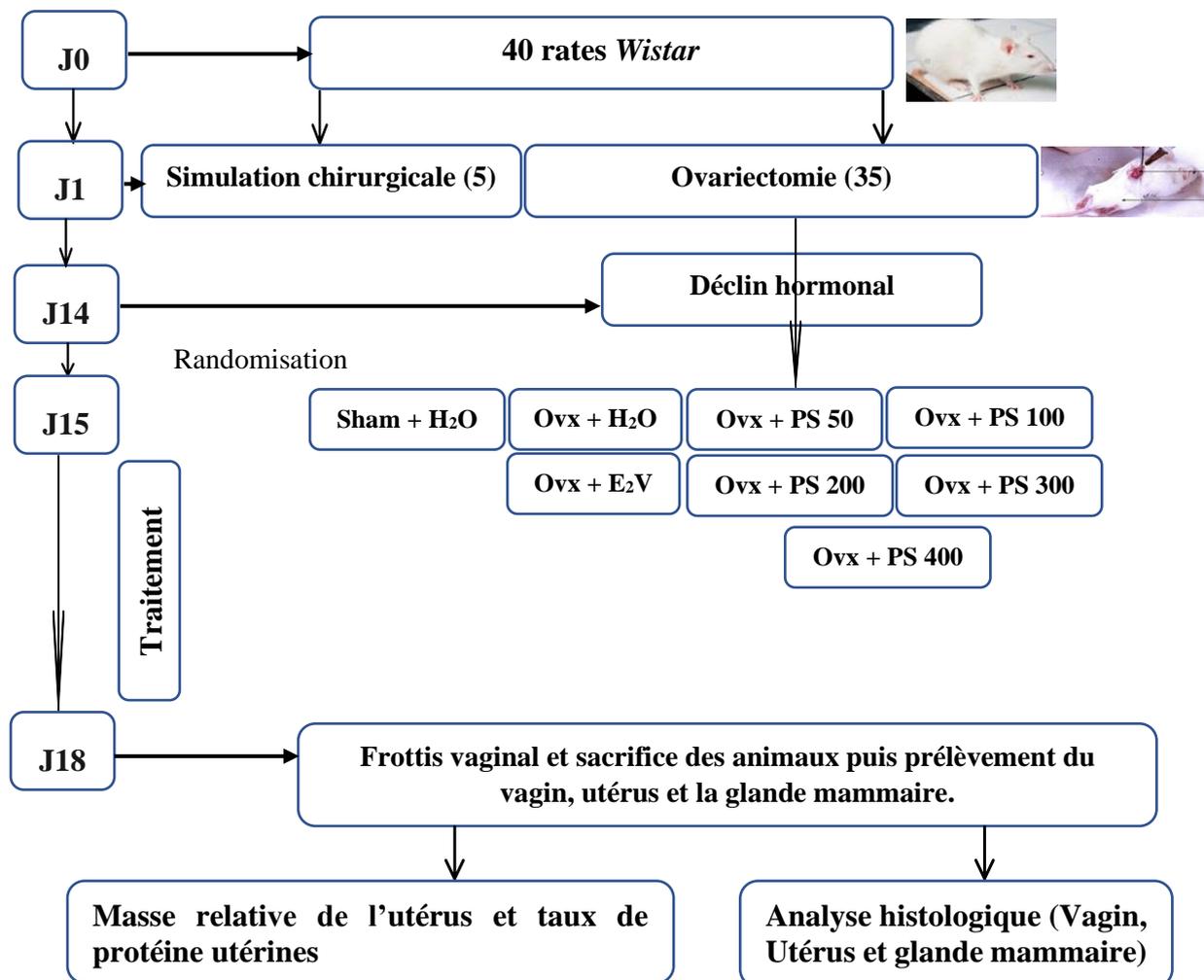


Figure 22: Schéma synoptique du protocole de mise en évidence *in vivo* de l'activité œstrogénique de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii*.

II.2.4.2- Description de la technique de l'ovariectomie

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

II.2.4.3- Description de la technique de réalisation du frottis vaginal

Pour réaliser le frottis vaginal, les sécrétions vaginales ont été prélevées à l'aide d'une micropipette contenant environ 40 µL de solution de NaCl 0,9 %. Cette solution a été introduite dans l'ouverture du vagin de la rate puis aspirée. Le liquide aspiré a été placé et étalé sur une lame porte-objet. Les cellules présentes ont été comptées et les lames ont été séchées à température ambiante avant d'être colorées suivant la méthode de Papanicolaou (Papanicolaou, 1942) dont le principe est basé sur l'association d'une coloration nucléaire par l'hématoxyline de Mayer et d'une coloration cytoplasmique par l'orange G et de la solution d'EA-65 (Fortier et Hould, 2003).

Les cellules contenues dans le prélèvement ont été fixées dans trois bains d'éthanol de degrés croissants (50°, 70°, et 80°) pendant 3 à 5 minutes par bain puis dans l'eau distillée pendant 30 secondes environ. Ensuite, les noyaux ont été colorés dans l'hématoxyline de Mayer pendant 5 min. L'excédent de colorant a été rincé à l'eau de robinet. Les lames ont ensuite été introduites dans la solution d'Orange G pendant 90 secondes puis imprégnées de 2 bains d'éthanol 95° pendant 30 secondes par bain. La coloration cytoplasmique de la solution d'EA-65 a été parachevée par trois bains de 90 secondes dans de l'éthanol 95°, un bain d'éthanol

absolu de 30 secondes, un bain d'éthanol/xylène de 30 secondes et de xylène (1 x 30 secondes). Les lames ainsi colorées ont été égouttées avant l'observation microscopique.

II.2.5- Evaluation des effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur quelques troubles ménopausiques

II.2.5.1- Répartition, traitement des animaux et paramètres évalués

Trente rates ont été ovariectomisées par la même méthode que dans le test évaluant l'oestrogénicité de *P. soyauxii*. Cinq autres rates ont subi une simulation chirurgicale. 84 jours après ovariectomie, les animaux ovariectomisés ont été répartis en 5 groupes de 5 animaux chacun et ont été traités comme suit :

- ✓ un lot *sham-opretated* recevant de l'eau distillée (SHAM + H₂O) ;
- ✓ un lot Ovx recevant de l'eau distillée (Ovx+ H₂O);
- ✓ un lot Ovx traité au valérate d'œstradiol (1mg/kg) (Ovx+ E₂V);
- ✓ un lot Ovx traité à l'extrait de *P. soyauxii* à la dose 100 mg/kg (Ovx + PS 100);
- ✓ un lot Ovx traité à l'extrait de *P. soyauxii* à la dose 200 mg/kg (Ovx + PS 200);
- ✓ un lot Ovx traité à l'extrait de *P. soyauxii* à la dose 300 mg/kg (Ovx + PS 300).

Au jour 98, le test de résistance à l'insuline a été effectué. Pendant la période allant du jour 100 au jour 109, le comportement des animaux a été évalué à travers les tests de reconnaissance du nouvel objet (Andrzej *et al.*, 2014), du labyrinthe aquatique de Morris (Morris, 1984), de la nage forcée (Erika *et al.*, 2003) et de l'alimentation supprimée par la nouveauté (Alena *et al.*, 2003). Un frottis vaginal de chaque rat a été réalisé au jour 112. Au terme des traitements (jours 112), les animaux ont été mis à jeun et les urines de 12h ont été prélevées à l'aide des cages métaboliques. Ces rates ont été sacrifiées et les organes tels que l'utérus, le vagin, la glande mammaire, le cerveau, le foie, l'aorte, le rein, la graisse abdominale, le tibia et le fémur ont été prélevés. Le sang a été également prélevé et collecté une partie dans les tubes EDTA et l'autre dans les tubes secs. Le sang recueilli dans les tubes EDTA a été utilisé pour la numération formule sanguine. Celui recueilli dans les tubes secs a servi pour et le dosage des sels minéraux (phosphore, Ca²⁺ et Mg²⁺), de la lipidémie (Cholestérol total, triglycérides, HDL-cholestérol, LDL-cholestérol et VLDL-cholestérol), de la phosphatase alcaline, de l'activité de l'ALAT, de l'ASAT, de l'acide urique et la détermination de l'index athérogénique (IA). Les urines prélevées à l'aide des cages métaboliques ont été utilisés pour le dosage des sels minéraux (phosphore, Ca²⁺ et Mg²⁺), de la créatinine et la détermination des rapports [calcium/créatinine] et [phosphore/créatinine]. Les

homogénats des organes prélevés excepté l'utérus, le vagin et la glande mammaire ont été utilisés pour le dosage des paramètres du statut oxydant (MDA, GSH, CAT, SOD et nitrites) et des protéines. L'homogénat frais du fémur a été utilisé en plus pour le dosage du phosphore, du Ca^{2+} , du Mg^{2+} et de la phosphatase alcaline. L'évaluation quantitative de quelques neuromédiateurs (GABA, sérotonine (5-HT) et GABA-T) a été réalisée dans l'homogénat de l'hippocampe. L'analyse histologique de tous les organes prélevés a été effectuée sur coupe de paraffine avec la coloration de routine (hématoxyline-éosine) (Figure 23).

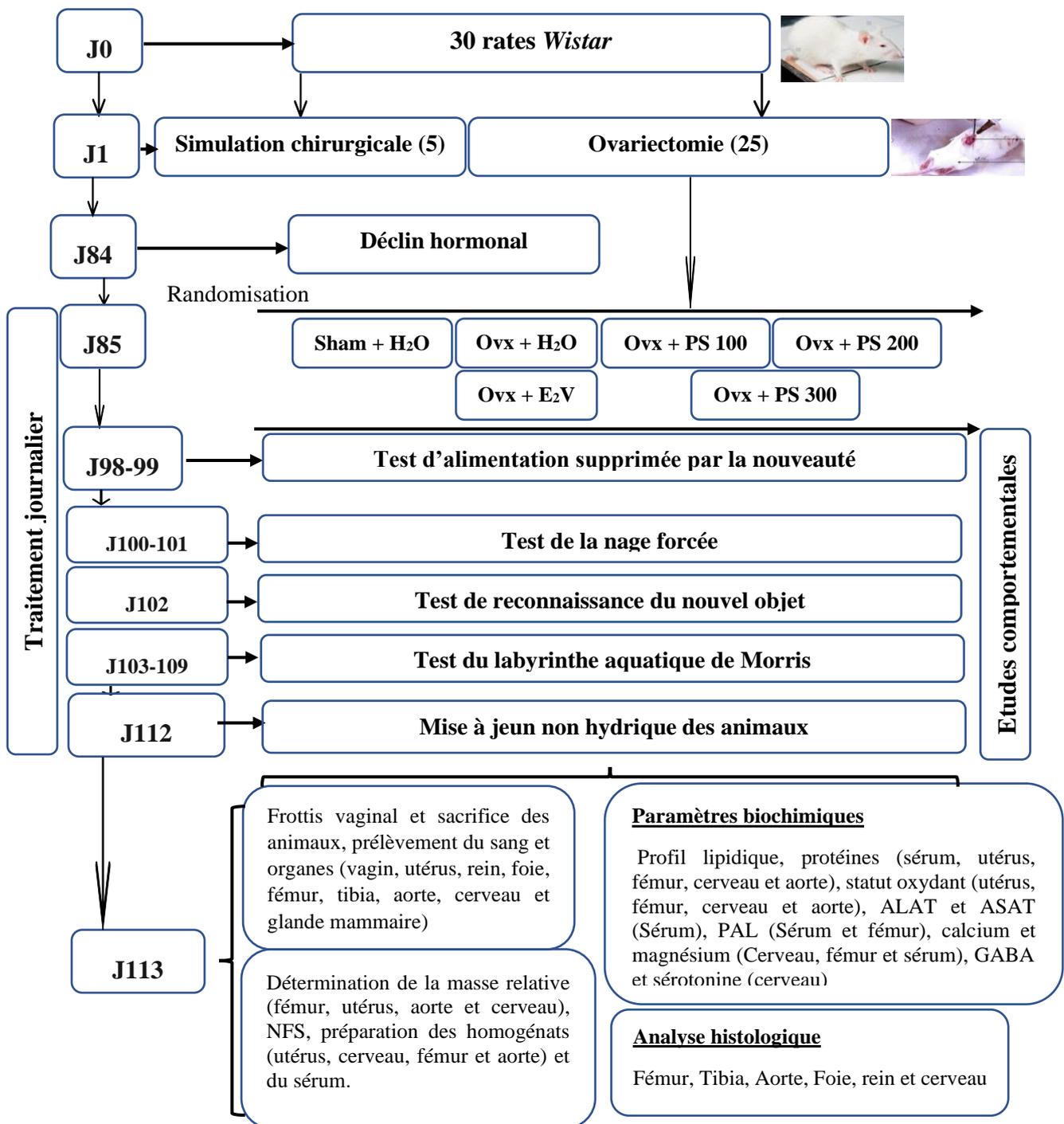


Figure 23: Schéma synoptique du protocole expérimental sur les effets de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur quelques troubles ménopausiques.

II.2.5.2- Evaluation du comportement chez les rates ménopausées

Le comportement des rates a été évalué afin de déterminer les probables effets anxiolytiques, antidépresseurs et antiamnésiques de l'extrait aqueux du duramen de *P.*

soyauxii. Pour cela, une série de tests comportementaux a été utilisée et décrites successivement suivant les protocoles suivants.

II.2.5.2.1- Evaluation de l'état d'anxiété au cours du test de l'alimentation supprimée par la nouveauté

Le test de l'alimentation supprimée par la nouveauté dans le model ménopausique susmentionné a permis d'évaluer le comportement anxieux chez les rates. Il a été réalisé après trois semaines de traitements des rates ovariectomisées.

L'évaluation s'est faite en mesurant le temps que met un animal à approcher et à mordre un aliment familier dans un nouvel environnement aversif. Pour sa réalisation, les rates ont été soumis à un jeun non hydrique de 24 h. Le test a été effectué suivant le protocole décrit par Alena *et al.* (2003). Après 24 heures de jeun, les rates étaient placées chacune à son tour dans une arène ouverte aux dimensions de 50×50×20 cm, avec une ampoule incandescente de 60 watts placée à 1,2 mètres au-dessus du dispositif

Un papier de couleur blanche a été placé au centre de l'arène ouverte. Sur ce papier, une petite pastille d'aliment a été déposée. Chaque animal était retiré de la cage habituelle et placé dans une cage d'attente 30 minutes avant l'épreuve. Ensuite, l'animal était placé dans un coin de l'arène et le chronomètre était immédiatement déclenché. Après le test de 5 minutes, la rate était retirée de la cage et placée dans sa cage familière pour 5 min. Le temps de latence pour mordre l'aliment a été évalué dans la cage familière et dans le milieu aversif.

II.2.5.2.2- Evaluation de la mémoire à court terme au cours du test de reconnaissance du nouvel objet

Le test de reconnaissance du nouvel objet dans le model ménopausique susmentionné a permis d'évaluer la mémoire à court terme chez les rates. Il a été effectué suivant le protocole décrit par Andrzej *et al.* (2014). Pour la pratique, l'animal était placé dans une arène ouverte aux dimensions de 50×50×20 cm. La première phase du test est une phase d'entraînement au cours de laquelle l'animal est autorisé à explorer librement deux objets identiques durant 5 minutes. Passé ce délai, l'animal est retiré de l'arène et remis dans la cage habituelle pour une durée d'une heure. Après ce temps passé dans la cage familière, le même animal est remis dans l'arène ouverte pour la seconde phase du test durant laquelle il est autorisé à explorer 2 objets sur une durée de 5 minutes. L'un des deux objets identiques et familiers, précédemment exploré par l'animal a préalablement été changé par un nouvel objet. L'emplacement des deux objets a

aléatoirement été changé entre les deux phases pour chaque animal afin d'éviter les biais dus à la préférence d'une place donnée dans l'arène ouverte.

La mémoire de reconnaissance était évaluée durant la phase 2 et était exprimée par l'indice de reconnaissance suivant la formule décrite par (Aguiar *et al.*, 2006) :

$$I_R = \frac{T_N}{(T_N + T_F)} \times 100$$

I_R = Indice de reconnaissance ; T_F = temps passé sur l'objet familier ; T_N = temps passé sur le nouvel objet.

II.2.5.2.3- Evaluation de la mémoire à long-terme au cours du test du labyrinthe aquatique de Morris

Le test du labyrinthe aquatique de Morris dans le model ménopausique susmentionné a permis d'évaluer la mémoire à long-terme chez les rates. Ce test a été effectué suivant un protocole décrit par Andrzej *et al.* (2014).

Il est basé sur les capacités natatoires de l'animal et sur son penchant inné à échapper à l'eau qui a un caractère aversif pour lui. Cette variante de la piscine de Morris nous a permis d'évaluer la mémoire à long terme. Le dispositif utilisé dans ce travail (Figure 24) était une enceinte circulaire en métal de couleur marron de 150 cm de diamètre et 60 cm de profondeur, remplie à hauteur de 40 cm d'une eau à température ambiante, opacifiée par un ajout de lait en poudre.

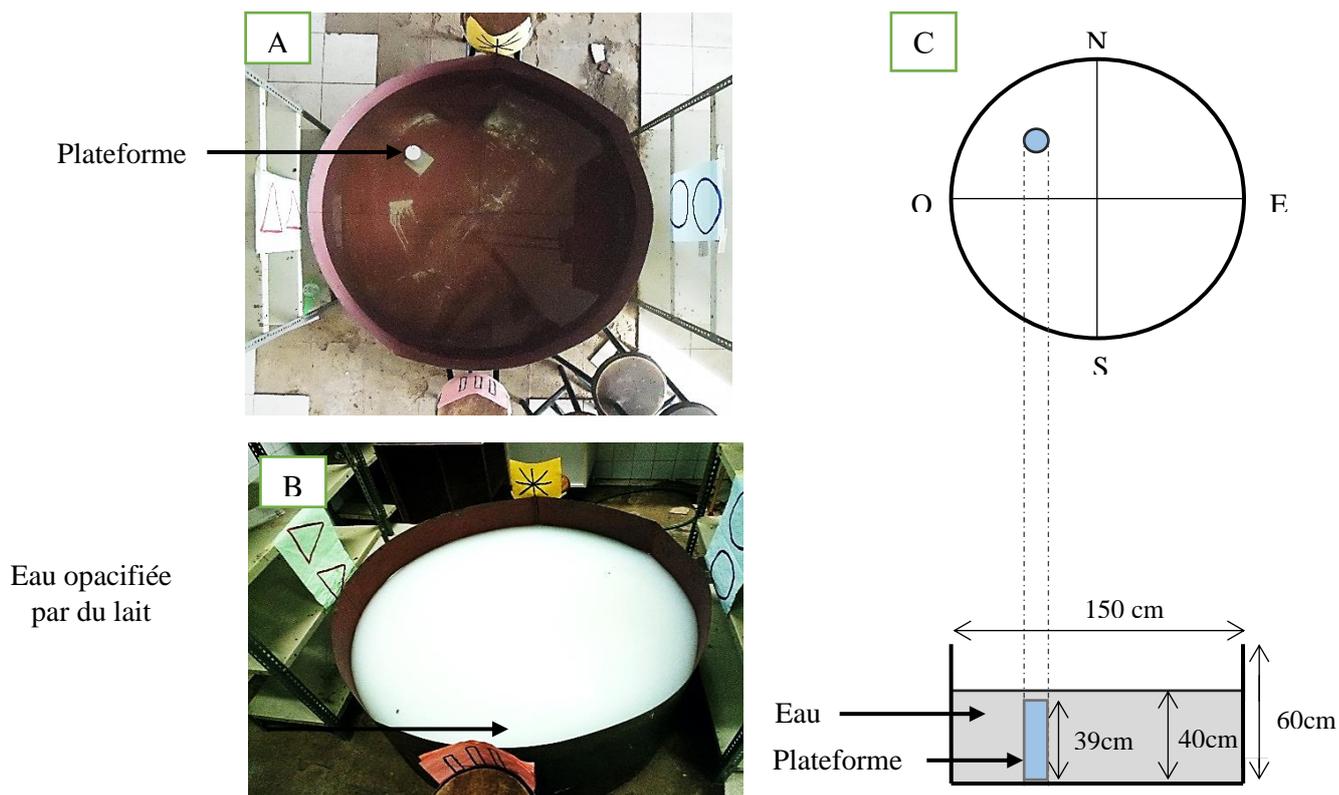


Figure 24: Photographies du labyrinthe aquatique prises par Owona Pascal (Février 2019 à Yaoundé).

Ce dispositif a été virtuellement divisé en quatre quadrants égaux représentés par les quatre points cardinaux (Nord, Sud, Est et Ouest). Le labyrinthe a été placé dans une salle contenant divers repères visuels pour les animaux (Figure 24). Une plateforme refuge de couleur blanche de 8 cm de diamètre, a été placée dans l'enceinte au centre d'un des quadrants à 1 cm sous la surface de l'eau (Figure 24 A et C). La position de l'enceinte et celle des repères ont été maintenues durant toutes les expérimentations.

Le test proprement dit s'est déroulé en deux phases :

✓ **Acquisition spatiale**

Les animaux ont été placés à la position de départ souhaitée dans le labyrinthe, face au mur du réservoir. Chaque animal a été délicatement libéré dans l'eau, et le chronomètre lancé. Un délai d'essai de 120 secondes était octroyé à chaque animal. Le chronomètre était directement arrêté lorsque l'animal touchait la plate-forme, et ce dernier y était autorisé à rester pendant 15 secondes.

Les animaux ne trouvant pas la plate-forme dans ce délai étaient soit placés sur la plate-forme, soit guidés vers elle, pour y rester pendant 15 secondes (intervalle inter essai) ; l'objectif

étant de lui permettre de s'orienter et de se rappeler de la position de la cible (plateforme) par rapport aux signaux environnants. Cette phase a duré 5 jours, en présence de la plateforme, avec 4 essais par animal à différentes positions de départ. Pendant chaque séance de la phase d'acquisition, le temps de latence pour retrouver la plateforme invisible a été noté pour chaque animal.

✓ **Mémoire de référence**

L'évaluation de la mémoire de référence (mémoire à long terme) a été faite 24 heures après le dernier jour d'entraînement. Durant cette phase qui a duré 60 secondes, la plateforme a été retirée de la cuve. Le temps de latence pour retrouver le compartiment qui abritait la plateforme et le temps passé dans ce compartiment ont été enregistrés.

II.2.5.2.4- Evaluation de l'état dépressif au cours du test de la nage forcée chez les rates postménopausiques

Le test de la nage forcée dans le model postménopausique a permis d'évaluer le comportement dépressif chez les rates ménopausées.

Ce test a été effectué suivant le protocole décrit par Erika *et al.* (2003). Le test a consisté à placer individuellement la rate dans un réservoir d'eau de 50 cm de haut sur 30 cm de large. Ces dimensions ont permis de s'assurer que la rate ne s'enfuit pas en s'agrippant aux bordures du dispositif. Le réservoir a été rempli d'eau à température ambiante. La hauteur de l'eau a atteint 35 cm, pour s'assurer que la rate ne se serve pas de ses membres inférieurs pour se maintenir à la surface, et donc l'obliger à nager. L'animal a été considéré immobile lorsqu'il flottait en position horizontale et ne réalisait que des mouvements de faible amplitude suffisant à maintenir sa tête hors de l'eau. Le test de la nage forcée (TNF) se déroule en deux phases séparées par un intervalle de 24 heures :

La phase du pré-test d'une durée de 15 minutes et la phase du test d'une durée de 5 minutes durant laquelle les temps d'immobilité, de nage et d'escalade ont été enregistrés.

II.2.5.3- Détermination de la densité minérale osseuse

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

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

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

II.2.6- Evaluation des effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur quelques paramètres de la fonction de reproduction chez les rates normales

II.2.6.1- Répartition, traitement et paramètres évalués

Dans la présente étude, 15 rats femelles âgés entre 10 semaines ont été utilisées. Les animaux ont été randomisés en fonction de la masse corporelle et repartis en 3 lots de 5 animaux chacun qui ont été traités comme suit :

- ✓ un lot recevant de l'eau distillée à raison de 10 mL/kg ;
- ✓ un lot traité à l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* à la dose 200 mg/kg ;
- ✓ un lot traité à l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* à la dose 300 mg/kg ;

La masse corporelle de ces animaux a été relevée de façon hebdomadaire durant la période d'administration de *P. soyauxii*. Après 28 jours d'administration de l'extrait de *P. soyauxii*, les animaux ont été sacrifiés après un jeun non hydrique de 12 h par décapitation. Le sang artérioveineux a été prélevé et centrifugé. Le sérum obtenu a été utilisé pour le dosage sérique de la "Luteinizing Hormon" (LH), de la "*Follicle Stimulating Hormon*" (FSH), de l'œstradiol, des protéines et du cholestérol. A l'issue de la laparatomie, le vagin, l'utérus, l'ovaire, la glande mammaire et le cerveau ont été prélevés. Une section de chacun de ces organes a été fixée dans du formol tamponné à 10% pour une analyse histologique de routine à l'hématoxyline éosine. L'analyse des coupes histologiques des ovaires a permis d'évaluer le nombre de follicules totaux, de follicules primordiaux, de follicules primaires, de follicules secondaires, de follicules antraux, de follicules de Degraaf, de follicules atrésiques et de corps jaunes. L'utérus et l'ovaire ont été homogénéisés dans des tampons appropriés pour le dosage du cholestérol ovarien et des protéines utérines (Figure 25).

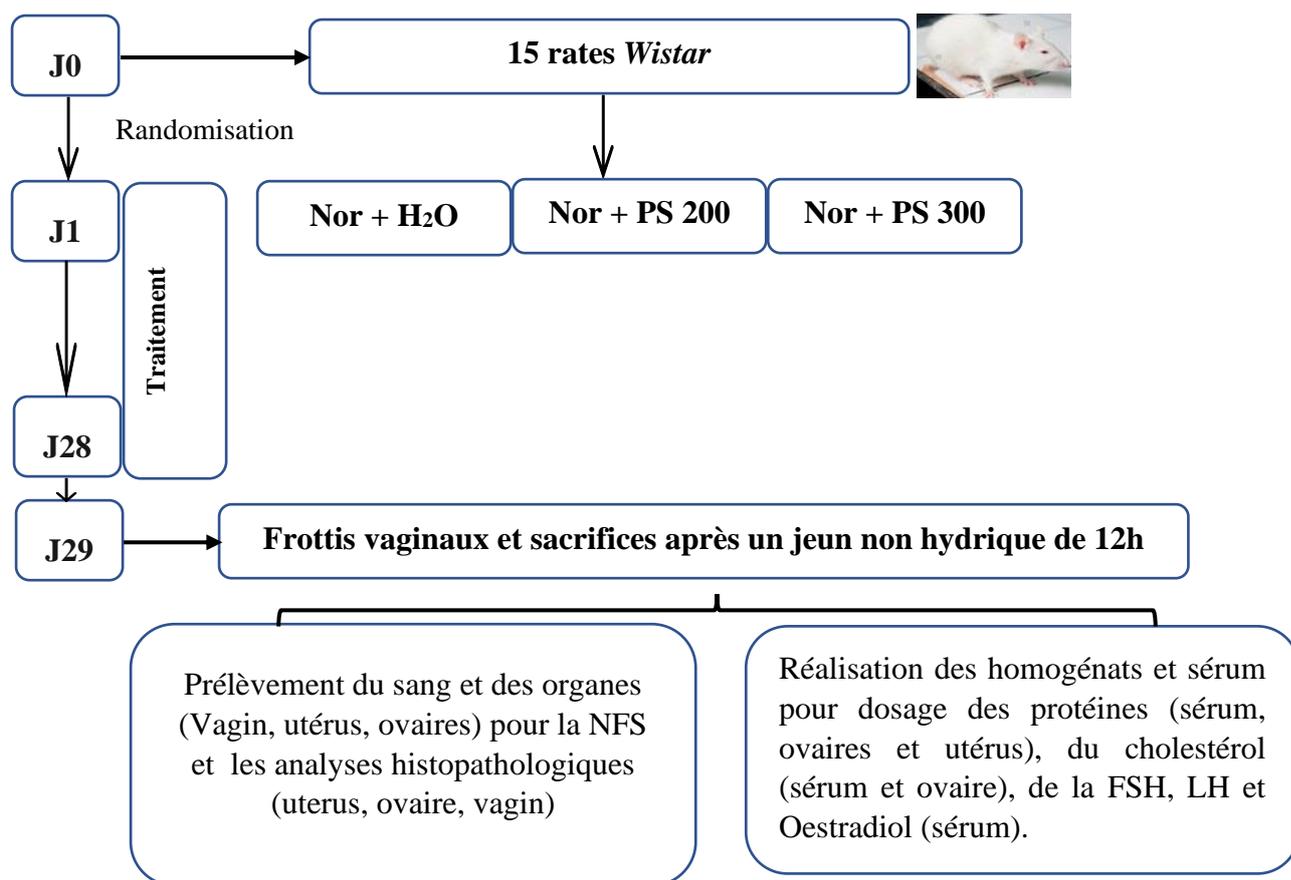


Figure 25: Schéma synoptique du protocole expérimental sur les effets de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur la fonction de reproduction des rates.

II.2.6.2- Description de la méthode de comptage des follicules ovariens chez les rates normales recevant l'extrait aqueux de *P. soyauxii*

Le comptage des follicules ovariens dans ce test a été entrepris dans le but d'évaluer les effets de *P. soyauxii* sur la population folliculaire chez les rates normales. Ce comptage a été effectué sur les coupes histologiques d'ovaires colorées à l'hématoxyline-éosine après 28 jours d'administration de l'extrait de plante suivant le protocole décrit par Mengue *et al.* (2023). Pour cela, des coupes sériées de l'ovaire ont été réalisées et la dixième section de l'ovaire droit a été choisie. Les différents stades des cellules ovariennes étaient les suivants :

- ✓ **Follicules primordiaux** : composés d'ovocytes entourés d'une couche de cellules folliculaires squameuses ;
- ✓ **Follicules primaires** : composés d'ovocytes entourés d'une couche de cellules folliculaires cuboïdales ;
- ✓ **Follicules secondaires** : ceux qui comportent plus d'une couche de cellules folliculaires ;

✓ **Follicules tertiaires** : ceux qui comportent des cellules de la *granulosa*, avec quatre sous-types distincts. La première étant la *corona radiata* qui entoure la zone pellucide ; la deuxième constituant la membrane qui est situé à l'intérieur de la lame basale ; la troisième étant la sous couche péri-antral qui est adjacent à l'antra et la dernière est le *cumulus oophorus* ;

✓ **Follicules de De Graaf** : avec un seul grand *antrum* de liquide folliculaire ;

✓ **Follicules atrésiques** : composés d'ovocytes avec apoptose radicale de toutes les cellules constitutives ;

✓ **Corps jaune** : follicules rompus avec cellules folliculaires hypertrophiées et cavité remplie de sang.

II.2.7- Evaluation du profil toxicologique de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii*

Dans le but de délimiter les doses d'utilisation de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii*, des tests de toxicité aiguë et subchronique ont été entrepris.

II.2.7.1- Evaluation de la toxicité orale aiguë de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii*

Le test de toxicité aiguë a été réalisé en utilisant le protocole de la ligne directrice 420 de l'OCDE (OCDE, 2001). Les signes de toxicité aiguë de l'extrait aqueux de *P. soyauxii* ont été observés après administration d'une dose unique de 2000 mg/kg ou de 5000 mg/kg. Pour mener à bien ce test, 15 rates nullipares et nulligestes âgées entre 8-10 semaines ont été utilisées et ont été réparties en 3 groupes dont un groupe recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) et 2 groupes recevant respectivement une dose unique de 2000 et de 5000 mg/kg d'extrait de plante et ont été observés pendant 14 jours.

II.2.7.2- Evaluation de la toxicité subaiguë de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii*

Cette évaluation a été faite suivant la Ligne directrice 407 de l'OCDE (OCDE, 2008). Trente rates âgées de 8-10 semaines et pesant en moyenne ont été randomisées et réparties dans 6 lots de 5 animaux chacun et ont été traitées comme suit :

- ✓ un lot normal recevant de l'eau distillée (10 mL/Kg);
- ✓ un lot normal recevant de l'eau distillée (10 mL/Kg) (témoin satellite);
- ✓ un lot satellite traité à l'extrait à la plus grande dose 800 mg/kg;
- ✓ un lot traité à l'extrait à la doses 200 mg/kg;
- ✓ un lot traité à l'extrait à la doses 400 mg/kg;
- ✓ un lot traité à l'extrait à la doses 800 mg/kg.

Les animaux ainsi repartis ont été traités quotidiennement pendant 28 jours au terme desquels les lots satellites ont été observés pendant 14 jours supplémentaires. Les signes de toxicité et de mortalité ont été observés durant toute la période expérimentale. Le poids corporel des animaux, a été mesuré de manière hebdomadaire. À la fin du traitement et après un jeun non hydrique de 12h, les animaux ont été sacrifiés par décapitation après une anesthésie à l'éther. Le sang recueilli dans les tubes à EDTA a été utilisé pour la numération formule sanguine. Le sang collecté dans les tubes secs a été centrifugé à 3000 tours/minute pendant 15 minutes à 4°C et le sérum obtenu a été conservé à -20 °C pour le dosage sérique de la bilirubine, de la créatinine, des protéines et l'évaluation de l'activité de l'ALAT, de la PAL et de l'ASAT. Les organes tels que le rein, le foie, la rate et les poumons ont été prélevés puis pesés. Une portion des organes (foie, rein, rate, poumon) a été fixé dans du formol pour une analyse histologique.

II.2.8- Analyses biochimiques

II.2.8.1- Préparation des échantillons

II.2.8.1.1- Obtention du sérum

Le sang artérioveineux a été collecté dans des tubes secs étiquetés et centrifugés à 3000 trs/min à 4°C pendant 15 minutes, à l'aide d'une centrifugeuse de marque Eppendorf 5804 R, Hamburg. Le sérum obtenu a été recueilli et conservé au congélateur à -20°C dans des tubes eppendorf pour l'évaluation ultérieure des paramètres biochimiques sériques.

II.2.8.1.2- Obtention des homogénats

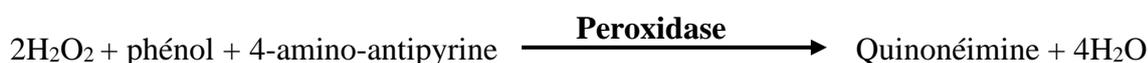
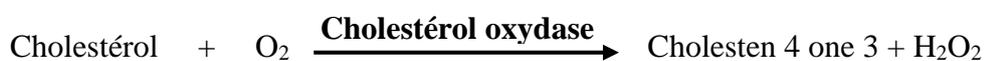
Une proportion de 0,1 g d'utérus, d'aorte, d'ovaire et une portion de 0,4 g de cerveau (région hippocampique), de foie et de rein a été broyée à l'aide d'un mortier et un pilon en céramique sur bac de glaces. Il a été ajouté au broyat de l'utérus et de l'aorte, 1 mL de Mc Ewen et au broyat du cerveau, du rein et du foie, 2 mL de tampon Tris HCl. Le broyat de l'ovaire a été homogénéisé dans 1 mL de tampon phosphate sodium (0,1M ; pH 7,3). 0,2 g de la tête du fémur gauche a été broyé grâce à une pierre à écraser, puis homogénéiser avec 3 mL de tampon phosphate saline. Les mélanges ont ensuite été transférés dans des tubes à essai secs étiquetés, puis centrifugés à 3000 tours/min à 4°C pendant 25 minutes. Le surnageant obtenu après centrifugation a été collecté dans des tubes eppendorf et conservé au congélateur à -20°C pour les analyses biochimiques tissulaires.

II.2.8.2- Evaluation de quelques marqueurs du profil lipidique

II.2.8.2.1- Dosage du cholestérol total

✓ Principe

Le cholestérol est présent dans le sérum sous forme d'ester de cholestérol et de cholestérol libre. L'ester de cholestérol est hydrolysé par le cholestérol oxydase pour former le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui réagit avec le phénol et le 4 amino-antipyrine formant ainsi la quinonéimine (Young, 1995). L'intensité de la coloration est directement proportionnelle au taux de cholestérol présent dans l'échantillon.



✓ Mode opératoire

Le taux de cholestérol total a été évalué selon le protocole proposé par le kit *BIOLABO* et décrit dans le tableau I.

Tableau I: Protocole de dosage du cholestérol total

	Blanc réactif	Standard	Echantillon
Réactif (µL)	1000	1000	1000
Eau distillée (µL)	10	-	-
Standard (µL)	-	10	-
Echantillon (µL)	-	-	10

Les tubes ont été homogénéisés et incubés pendant 5 minutes à 37 °C dans un bain-marie. L'absorbance des échantillons et du standard ont été lue contre le blanc en utilisant le spectrophotomètre (URIT 810) à une longueur d'onde de 500 nm.

La concentration de cholestérol dans les échantillons a été calculée à l'aide de la formule suivante proposée par le kit :

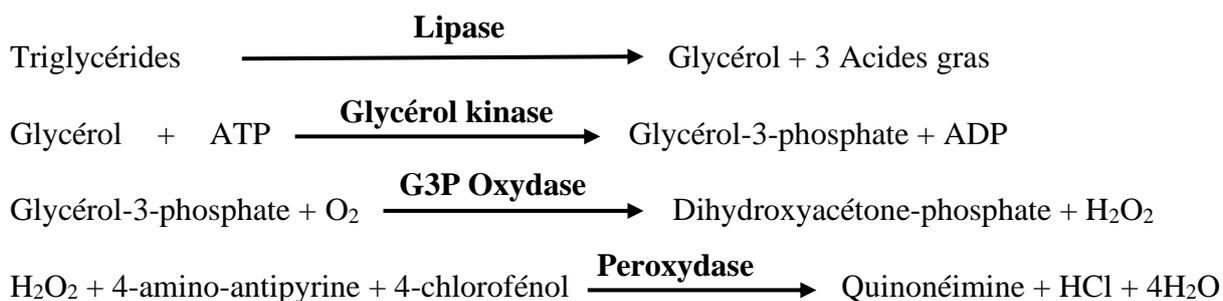
$$[\text{Cholestérol total}] = \frac{\text{Abs (Ech)}}{\text{Abs (Std)}} \times C$$

[Cholestérol total] = Concentration du cholestérol total en mmol/L, **C** = Concentration du standard (5,17 mmol/L), **Abs (Ech)** = Absorbance de l'échantillon, **Abs (Std)** = Absorbance du standard.

II.2.8.2.2- Dosage des triglycérides

✓ Principe

Sous l'action des lipases, les triglycérides (TG) sont hydrolysés en glycérol et acides gras. Le glycérol sera ensuite transformé en peroxyde d'hydrogène sous l'action successive de la glycérolkinase et de la glycérol-3-phosphate oxydase (Young, 1995). La quinonéimine qui sert d'indicateur, renseigne sur la formation de peroxyde d'hydrogène, de l'amino-antipyrine et du 4-chlorophénol sous l'action catalytique de la peroxydase.



✓ Mode opératoire

Les tubes ont été remplis selon le protocole proposé par le kit *BIOLABO* (Tableau II).

Tableau II: Protocole de dosage des triglycérides

	Blanc réactif	Standard	Echantillon
Réactif (µL)	1000	1000	1000
Eau distillée (µL)	10	-	-
Standard (µL)	-	10	-
Echantillon (µL)	-	-	10

Les tubes ont été homogénéisés et incubés pendant 5 minutes à 37 °C dans un bain-marie. L'absorbance des échantillons et du standard ont été lue contre le blanc en utilisant le spectrophotomètre (URIT 810) à une longueur d'onde de 500 nm.

Les concentrations en triglycérides ont été calculées à l'aide de la formule suivant proposée par le kit :

$$[\text{Triglycérides}] = \frac{\text{Abs (Ech)}}{\text{Abs (Std)}} \times C$$

[**Triglycérides**] = Concentration des triglycérides en mmol/L, **C** = Concentration de l'étalon (2,28 mmol/L), **Abs (Ech)** = Absorbance de l'échantillon, **Abs (Std)** = Absorbance du standard.

II.2.8.2.3- Dosage du HDL-Cholestérol

✓ Principe

Les chylomicrons, les VLDL-Cholestérol (VLDL-C) et les LDL-Cholestérol (LDL-C) sériques sont précipités par l'acide phosphotungstique, en présence des ions magnésium. Après centrifugation, les HDL-Cholestérol (HDL-C) présents dans le surnageant sont déterminés suivant la même procédure que celle du cholestérol total (Young, 1995).

✓ Mode opératoire

Le dosage colorimétrique du HDL-Cholestérol a été réalisé à l'aide d'un kit de marque *BIOLABO* et s'est fait en deux phases : une phase de précipitation et une phase de dosage.

Pour la précipitation, 100 µL de sérum ont été additionnés à 300 µL de précipitant du kit *BIOLABO*. L'ensemble a été laissé au repos pendant 5 minutes à température ambiante puis centrifugé pendant 10 minutes à 4000 tours/minutes. Le surnageant obtenu après centrifugation a été ensuite prélevé.

Pour le dosage, les différents tubes ont été complétés comme indiqué dans le tableau III. Le dosage a été fait suivant le protocole de dosage du cholestérol.

Tableau III: Protocole de dosage du HDL-C

	Blanc réactif	Standard/ Etalon	Echantillons
Réactif (µL)	1000	1000	1000
Standard (µL)	-	10	-
Echantillon (µL)	-	-	10
Eau distillée (µL)	10	-	-

Les tubes ont été agités, puis incubés pendant 5 minutes à 37 °C. Les densités optiques ont été lues au spectrophotomètre contre le blanc à une longueur d'onde de 500 nm.

La concentration de HDL-cholestérol a été calculée par la formule suivante :

$$[\text{HDL} - \text{cholestérol}] = \frac{\text{Abs (Ech)}}{\text{Abs (Std)}} \times C$$

[HDL-cholestérol] = Concentration de HDL-C en mmol/L, **C** = Concentration de l'étalon (2,58 mmol/L), **Abs (Ech)** = Absorbance de l'échantillon, **Abs (Std)** = Absorbance du standard.

II.2.8.2.4- Détermination du LDL-cholestérol

Le LDL-C a été déterminé en calculant la concentration suivant la formule de Dobiášová et Frohlich. (2001).

$$[\text{LDL C}] = [\text{CT}] - \frac{\text{TG}}{5} - [\text{HDL C}]$$

[LDL-C] = Concentration de LDL-Cholestérol (mmol/L) ; **[CT]** = Concentration de cholestérol total (mmol/L) ; **[TG]** = Concentration de triglycérides (mmol/L) ; **[HDL-C]** = Concentration de HDL-Cholestérol (mmol/L).

II.2.8.2.5- Détermination de l'index athérogène

L'index athérogène a été déterminé en utilisant la formule suivante (Youmbissi *et al.*, 2001) :

$$\text{Index athérogène} = \frac{[\text{Cholestérol total}]}{[\text{HDL-cholestérol}]}$$

II.2.8.2.6- Détermination du VLDL-Cholesterol

Le taux de VLDL-Cholesterol (VLDL-C) a été déterminé en utilisant la formule suivante (Warnick *et al.*, 1990)

$$\text{VLDL-C} = \frac{[\text{Triglycérides}]}{5}$$

II.2.8.3- Evaluation de quelques marqueurs du métabolisme osseux

II.2.8.3.1- Dosage de la phosphatase alcaline sérique et osseuse

✓ Principe

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

✓ Mode opératoire

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

Tableau IV: Protocole de dosage de la phosphatase alcaline sérique et osseuse

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

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

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

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

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

II.2.8.3.2- Dosage du calcium

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

✓ Principe

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

✓ Mode opératoire

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

Tableau V: Protocole de dosage du calcium

	Blanc	Standard	Echantillon
R1 (µL)	1000	1000	1000
Eau distillée (µL)	25	-	-
Standard (µL)	-	25	-
Echantillon (µL)	-	-	25

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

La concentration de calcium a été calculée par la formule suivante :

$$[\text{Calcium (mmol/L)}] = \frac{\text{Absorbance echantillon} - \text{Absorbance blanc}}{\text{Absorbance standard} - \text{Absorbance blanc}} \times C_{\text{std}}$$

[Calcium] = Concentration du calcium (mmol/L) ; **Cstd** = Concentration du standard égale à 2,5 mmol/L.

II.2.8.3.3- Dosage du magnésium

L'évaluation du taux de magnésium sérique et tissulaire a été réalisée à l'aide du kit de marque *Randox*.

✓ Principe

Les ions magnésium forment un complexe chélate coloré en présence du bleu de xylydyl dans une solution alcaline. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de magnésium dans l'échantillon (Treiz, 1983).

✓ Mode opératoire

L'évaluation du taux de magnésium a été réalisée en pipetant les volumes de solution et de réactif tel que présenté dans le tableau VI.

Tableau VI: Protocole de dosage du magnésium

	Blanc	Standard	Echantillon
Réactifs (µL)	1000	1000	1000
Eau distillée (µL)	10	-	-
Standard (µL)	-	10	-
Echantillon (µL)	-	-	10

Les tubes ont été agités et incubés au bain marie à 37 °C pendant 5 minutes. Les absorbances ont été lues au spectrophotomètre de marque URIT-810 contre le blanc à 546 nm.

La concentration en magnésium a été calculée par la formule suivante :

$$[\text{Magnésium (mmol/L)}] = \frac{\text{Absorbance échantillon} - \text{Absorbance blanc}}{\text{Absorbance standard} - \text{Absorbance blanc}} \times C_{\text{std}}$$

[Magnésium] = Concentration en magnésium (mmol/L); **Cstd** = Concentration du standard (1 mmol/L).

II.2.8.3.4- Dosage du phosphore

✓ Principe

En milieu acide, les ions phosphates forment avec le molybdate d'ammonium un complexe phospho-molybdique (Young, 1995). L'absorbance mesurée à 340 nm, est proportionnelle à la concentration en ions phosphates présente dans l'échantillon.

✓ Mode opératoire

Le taux de phosphore a été évalué selon le protocole fourni par le kit *BIOLABO* (Tableau VII).

Tableau VII: Protocole de dosage du phosphore osseux et sérique

	Blanc	Echantillon	Standard
Réactif (µL)	1000	1000	1000
Eau distillée (µL)	10	-	-
Sérum ou homogénat (µL)	-	10	-
Standard (µL)	-	-	10

Les solutions ont été mélangées et incubées pendant 5 minutes à 37°C. L'absorbance des échantillons et du standard a été lue contre le blanc en utilisant un spectrophotomètre (URIT 810) à une longueur d'onde de 340 nm.

Les concentrations ont été déterminées par la formule suivante :

$$[\text{Phosphore}] = \frac{\text{Absorbance échantillon} - \text{Absorbance blanc}}{\text{Absorbance standard} - \text{Absorbance blanc}} \times \text{Cstd}$$

[Phosphore] = Concentration du phosphore ; Cstd = Concentration du standard (1,61 mmol/L).

II.2.8.4- Dosage de quelques marqueurs biochimiques de la fonction hépatique

II.2.8.4.1- Dosage de l'alanine amino transférase

✓ Principe

L'alanine aminotransférase (ALAT) ou glutamate pyruvate transaminase (GPT) catalyse le transfert réversible d'un groupe amine de l'alanine à l'alpha-cétoglutarate en formant du glutamate et du pyruvate (Young, 1995). Le pyruvate produit est réduit en lactate par la lactase déshydrogénase (LDH) et le NADH selon la série d'équation ci-dessous :



✓ Mode opératoire

Le dosage de l'ALAT a été réalisé suivant le protocole fournit par le kit *LABKIT* résumé dans le tableau VIII.

Tableau VIII: Mode opératoire du dosage de l'ALAT

Réactif de dosage de l'ALAT (mL)	1
Echantillon (µL)	100

Les solutions ont été mélangées puis incubées pendant 1 minute à température ambiante.

Les absorbances des échantillons ont été lues à 1 et à 3 minutes à 340 nm en utilisant un spectrophotomètre (URIT 810) et les variations d'absorbance en ces deux instants de lecture ont été calculées.

La concentration en ALAT contenue dans l'échantillon a été calculée en utilisant la relation

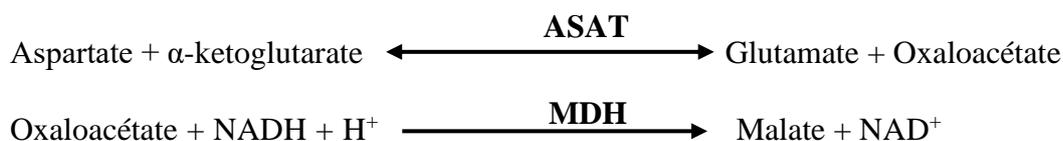
$$\text{Activité ALAT } \left(\frac{UI}{L}\right) = \Delta A / \text{min} \times F$$

ΔA = Variation de l'absorbance = $A_2 - A_1$, A_2 = Absorbance lue à après 3 minutes, A_1 = Absorbance lue après 1 minutes ; F = Facteur de calcul fournit par le kit = 1750.

II.2.8.4.2- Dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT)

✓ Principe

L'aspartate aminotransférase (ASAT) ou glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe amine de l'aspartate à l'alpha-cétoglutarate en formant du glutamate et l'oxaloacétate (Young, 1995). L'oxaloacétate produit est réduit en malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH selon la série d'équation ci-dessous :



La diminution de la vitesse de concentration de NADH, mesurée par photométrie, est proportionnelle à la concentration catalytique de l'ASAT présente dans l'échantillon.

✓ Mode opératoire

Le dosage de l'ASAT a été réalisé suivant le protocole fournit par le kit *LABKIT* résumé dans le tableau IX. Les différents volumes des substances consignés dans ce tableau ont été introduits dans une série de tubes.

Tableau IX: Mode opératoire du dosage de l'ASAT

Réactif de dosage de l'ASAT (mL)	1
Echantillon (µL)	100

Les solutions ont été mélangées et incubées pendant 1 minute à température ambiante.

Les absorbances des échantillons ont été lues à 1 et à 3 minutes à 340 nm en utilisant un spectrophotomètre (URIT 810) et les variations d'absorbance en ces deux instants de lecture ont été calculées.

La concentration en ASAT contenue dans l'échantillon a été calculée en utilisant la relation

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

ΔA = Variation de l'absorbance = $A_2 - A_1$, A_2 = Absorbance lue à après 3 minutes, A_1 = Absorbance lue après 1 minutes ; F = Facteur de calcul fournit par le kit = 1750.

II.2.8.4.3- Dosage de la bilirubine totale et directe

✓ Principe

La bilirubine est convertie en azobilirubine coloré par l'acide sulfanilique diazoté et est photométriquement mesurée. L'intensité de la coloration formée est proportionnelle à la concentration en bilirubine présente dans l'échantillon (Young, 1995). L'absorbance de l'azobilirubine ainsi produite est lue au spectrophotomètre à 546 nm.

➤ Mode opératoire

Le dosage de la bilirubine a été réalisé selon le protocole décrit par le kit *LABKIT*. Les différents tubes ont été remplis et traités d'après le tableau X.

Tableau X: Protocole de dosage de la bilirubine.

	Blanc	B. Totale	Blanc	B. Directe
R 1 (D) (mL)	-	-	1,5	1,5
R 2 (T) (mL)	1,5	1,5	-	-
R 1' (mL)	-	50	-	50
Echantillon/Standard	100	100	100	100

Le mélange a été agité à l'aide du vortex puis incubé pendant 5 minutes à température ambiante. L'absorbance des tubes échantillons a été lue contre le blanc à 546 nm.

R1 = Réactif de travail de la bilirubine directe, **R2** = Réactif de travail de la bilirubine totale.

La concentration de la bilirubine totale dans les échantillons a été déterminée par la formule suivante

$$[\text{Bilirubine}] = [\text{Abs Echantillon} - \text{Abs blanc}] \times F$$

[Bilirubine] = Concentration de bilirubine (mg/dL) ; **F** = Facteur fourni par le kit: 9 mg/dL ;
Abs = absorbance.

II.2.8.5- Evaluation de quelques marqueurs biochimiques de la fonction rénale

II.2.8.5.1- Dosage de la créatinine

✓ Principe

En milieu alcalin, la créatinine forme avec le picrate de sodium un complexe orangé qui absorbe à 492 nm (Young, 2001). L'augmentation de l'absorbance est proportionnelle à la concentration de la créatinine dans le milieu réactionnel.

✓ Mode opératoire

Le dosage de la créatinine a été réalisé à l'aide du kit *LABKIT* suivant le protocole qui est résumé dans le tableau XI.

Tableau XI: Protocole de dosage de la créatinine

	Blanc	Standard	Echantillon
Réactif de dosage de la créatinine (mL)	1	1	1
Eau distillée (µL)	100	-	-
Standard (µL)	-	100	-
Echantillon (µL)	-	-	100

Les tubes ont été mélangés et la densité optique de l'échantillon ou du standard a été lue au spectrophotomètre Urit-810 à 492 nm après 30 secondes (A1) et après 90 secondes (A2).

La concentration de créatinine était calculée par la formule suivante :

$$\left[\text{Créatinine} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) \right] = \frac{\Delta \text{Absorbance échantillon} - \Delta \text{Absorbance blanc}}{\Delta \text{Absorbance standard} - \Delta \text{Absorbance blanc}} \times \text{Cstd}$$

[Créatinine] = Concentration de la créatinine ; Cstd = Concentration du standard (2 mg/dL).

Δ Absorbance = A2-A1, A2 = Absorbance lue a après 90 minutes, A1 = Absorbance lue après 30 minutes.

II.2.8.5.2- Dosage de l'acide urique

✓ Principe

L'acide urique est oxydé par l'uricase en allantoiné et en peroxyde d'hydrogène (2H₂O₂), qui sous l'influence de la peroxydase (POD), de la 4-aminophénazone (4-AP) et de l'adénosine diphosphate (ADPS) forme un composé rouge de quinonéimine (Young, 2001).



L'intensité de la coloration rouge est proportionnelle à la concentration d'acide urique dans les échantillons.

✓ Mode opératoire

Le dosage de l'acide urique a été réalisé à l'aide du kit *LABKIT* et les étapes sont résumées dans le tableau XII.

Tableau XII: Protocole de dosage de l'acide urique

	Blanc	Standard	Echantillon
Réactif de dosage de l'acide urique (mL)	1	1	1
Standard (µL)	-	25	-
Echantillon (µL)	-	-	25
Eau distillée	25	-	-

Les tubes ont été mélangés et incubés pendant 10 minutes à température ambiante et la densité optique de l'échantillon ou du standard a été lue au spectrophotomètre URIT-810 à 500 nm. La couleur est stable pendant au moins 5 minutes.

La concentration de créatinine était calculée par la formule suivante :

$$\left[\text{Acide urique} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) \right] = \frac{\text{Absorbance échantillon} - \text{Absorbance blanc}}{\text{Absorbance standard} - \text{Absorbance blanc}} \times \text{Cstd}$$

[Acide urique] = Concentration en acide urique, Cstd = Concentration standard (6 mg/dL).

II.2.8.6- Evaluation de quelques marqueurs endocriniens

II.2.8.6.1- Dosage de l'œstradiol

Le dosage de l'œstradiol a été réalisé en utilisant la technique ELISA à l'aide d'un kit dosage de marque *CALBIOTECH* (Cordell Ct, El Cajon, USA).

✓ Principe

Il est basé sur la liaison compétitive entre l'œstradiol non marqué et l'œstradiol marqué à une enzyme pour un nombre limité de sites de liaison d'anticorps sur la plaque de microtitration. L'ajout du substrat enzymatique déclenche une réaction enzymatique et l'absorbance est mesurée. L'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la concentration d'œstradiol non marqué dans l'échantillon (Abraham *et al.*, 1972).

✓ Mode opératoire

La détermination de la concentration en œstradiol dans les échantillons de sérum a été faite selon le protocole résumé dans le tableau XIII.

Tableau XIII: Mode opératoire du dosage de l'œstradiol

Phases	Puits	
	Etalon	Echantillon
Les réactifs ont été placés à température ambiante (20-25°C) avant usage		
Standard	25 µL	0 µL
Echantillon	0 µL	25 µL
Réactif d'œstradiol-Biotine	50 µL	50 µL
Les plaques ont été agitées (10-20 secondes) puis incubées à température ambiante pendant 45 minutes.		
Réactif enzymatique d'œstradiol	100 µL	100 µL
Les plaques ont été agitées (10-20 secondes) puis incubées à température ambiante pendant 45 minutes.		
Tampon de lavage	300 µL / puit	
Les plaques ont été lavées 3fois et épongées sur du papier absorbant		
Substrat 3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine (TMB)	100 µL	100 µL
Les plaques de microtitration ont été incubées à température ambiante (20-25°C) pendant 45 minutes		
Solution STOP	50 µL	50 µL
Quinze minutes après avoir ajouté la solution STOP et soigneusement mélangé, les absorbances ont été lues à 450 nm.		

La quantité de d'œstradiol contenue dans chaque échantillon a été déterminée à partir de la droite d'équation $y = -0,0023x$ (Figure 26) qui a été tracée à partir des puits étalon suivant les densités optiques et les concentrations respectives suivantes :

Densités optiques (nm)	2,980	2,422	2,279	1,547	0,914	0,244
Concentrations (Pg/mL)	0,000	10,000	30,000	100,000	300,000	1000,000

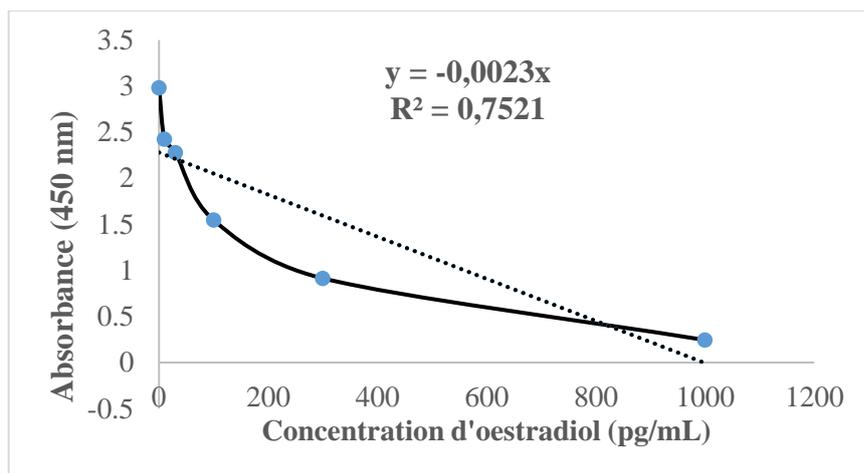


Figure 26: Courbe d'étalonnage de l'oestradiol.

II.2.8.6.2- Dosage de la l'hormone lutéinisante

Le dosage de la l'hormone lutéinisante (LH) a été réalisé en utilisant la technique ELISA à l'aide d'un kit dosage de marque *DIALAB* (Neudort, Autriche).

✓ Principe

La LH présente dans l'échantillon à analyser et le conjugué LH-HRP entrent en compétition pour se fixer sur les anticorps anti-LH tapissant la surface des puits. L'addition du 3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine (TMB) dans le milieu réactionnel amorce la réaction enzymatique qui est marquée par le virage de la coloration bleue au jaune. L'absorbance a été ensuite mesurée à 450 nm et l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de LH dans l'échantillon (Thakur *et al.*, 1997).

Mode opératoire

La détermination de la concentration en LH dans les échantillons de sérum a été faite selon le protocole résumé dans le tableau XIV.

Tableau XIV: Mode opératoire du dosage de la LH

Phases	Puits		
	Etalon	Echantillon	Blanc
Les réactifs ont été placés à température ambiante (20-25°C) avant usage			
Standard	50 µL	0 µL	50 µL
Echantillon	0 µL	50 µL	0 µL
Conjugué enzymatique	100 µL	100 µL	0 µL
Les plaques ont été agitées (10-20 secondes) puis incubées à température ambiante pendant 60 minutes.			
Lavage à l'eau distillée	200 µL / puits		
Les plaques ont été lavées 3 fois et éponnées sur du papier absorbant			
Substrat TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Les plaques ont été agitées (5 secondes) et incubées à température ambiante à l'abri de la lumière (10-20 minutes).			
Solution STOP	100 µL	100 µL	100 µL
Les plaques ont été agitées pour le mélange pendant 10-20 minutes jusqu'au virage de la coloration et les absorbances ont été lues à 450 nm contre le blanc. La réaction est stable pendant 30 minutes.			

La quantité de LH contenue dans chaque échantillon a été déterminée à partir de la droite d'équation $y = 0,0163x$ (Figure 27) qui a été tracée à partir des puits étalon suivant les densités optiques et les concentrations respectives suivantes :

Densités optiques (nm)	0,000	0,034	0,210	0,824
Concentrations (mUI/mL)	0,000	2,00	10,00	50,00

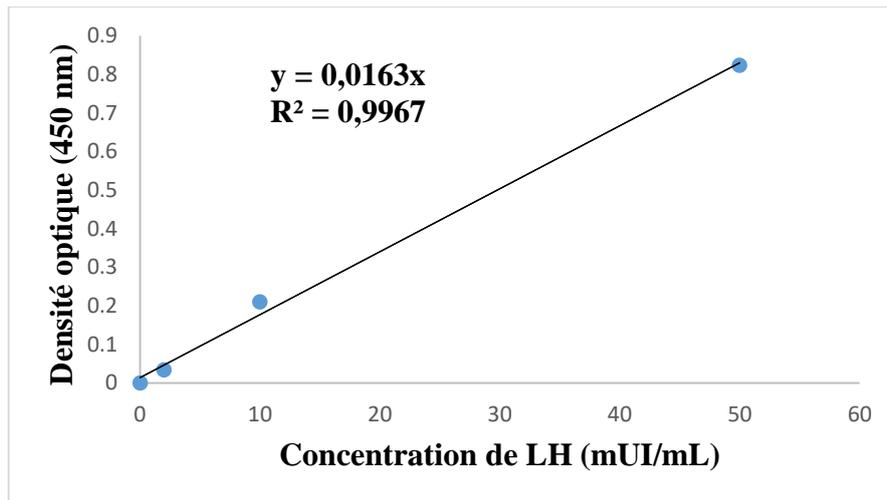


Figure 27: Courbe d'étalonnage de la LH.

II.2.8.6.3- Dosage de la FSH

Le dosage de la FSH a été réalisé en utilisant la technique ELISA à l'aide d'un kit dosage de marque *CALBIOTECH* (Cordell Ct, El Cajon, USA).

✓ Principe

La FSH présente dans l'échantillon à analyser et le conjugué FSH-HRP entrent en compétition pour se fixer sur les anticorps anti-FSH tapissant la surface des puits. L'addition du 3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine (TMB) dans le milieu réactionnel amorce la réaction enzymatique qui est marquée par le virage d'une coloration. L'absorbance a été ensuite mesurée à 450 nm et l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de FSH dans l'échantillon (Qiu *et al.*, 1998).

✓ Mode opératoire

La détermination de la concentration en FSH dans les échantillons de sérum a été faite selon le protocole résumé dans le Tableau XV.

Tableau XV: Mode opératoire du dosage de la FSH

Phases	Puits		
	Étalon	Echantillon	Blanc
Les réactifs ont été placés à température ambiante (20-25°C) avant usage			
Standard	50 µL	0 µL	50 µL
Echantillon	0 µL	50 µL	0 µL
Conjugué enzymatique	100 µL	100 µL	0 µL
Les plaques ont été agitées (10-20 secondes) puis incubées à température ambiante pendant 60 minutes.			
Lavage à l'eau distillée	200 µL / puits		
Les plaques ont été lavées 3 fois et épongées sur du papier absorbant			
Substrat TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Le mélange a été agité (5 secondes) et incubé à température ambiante à l'abri de la lumière (10-20 minutes).			
Solution STOP	100 µL	100 µL	100 µL
Le mélange des réactifs a été réalisé pendant 10-20 minutes jusqu'au virage de la coloration et les absorbances ont été lues à 450 nm contre le blanc. La réaction est stable pendant 30 minutes.			

La quantité de FSH contenue dans chaque échantillon a été déterminée à partir de la droite d'équation $y = 0,0354x$ (Figure 28) qui a été tracée à partir des puits étalon suivant les densités optiques et les concentrations respectives suivantes :

Densités optiques (nm)	0,000	0,206	0,378	0,993	1,766
Concentrations (mUI/mL)	0,000	5,000	10,000	25,000	50,000

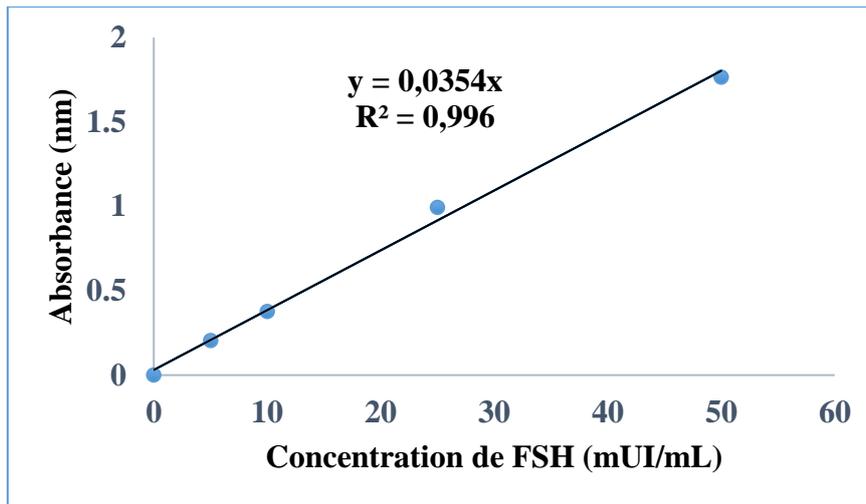


Figure 28: Courbe d'étalonnage de la FSH.

II.2.8.7- Dosage de quelques marqueurs hippocampiques de la neurotransmission

II.2.8.7.1- Evaluation du taux de l'acide gamma aminobutyrique (GABA)

✓ Principe

En milieu basique, la réaction entre la ninhydrine et l'acide gamma aminobutyrique (GABA) donne une coloration rouge violacée proportionnelle à la concentration de GABA dans l'homogénat (Nayak et Chatterje, 2001).

✓ Mode opératoire

Les tubes ont été remplis suivant le protocole décrit dans le tableau XVI.

Tableau XVI: Protocole de dosage de l'acide gamma aminobutyrique

Tubes	Etalons								Echantillons
	1	2	3	4	5	6	7	8	X ₁X ₂
Concentration de GABA (µg/mL)	0	20	40	60	80	100	120	140	-
Volume de GABA (µL)	100	100	100	100	100	100	100	100	-
Ninhydrine (0,14 M) (µL)	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Echantillon (µL)	-	-	-	-	-	-	-	-	100
TCA 10 % (µL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
le mélange a été incubé à 60°C dans un bain marie pendant 30 minutes puis laissé au repos									
Tartrate de cuivre (µL)	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
le mélange a été incubé à 25°C dans un bain marie pendant 10 minutes									
TCA 10 % (µL)	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
L'absorbance des tubes a été mesurée entre 530 nm									
Absorbances obtenues	0,00	0,05	0,11	0,17	0,22	0,28	0,34	0,39	-

Les étalons (tubes 1 à 8) ont permis de réaliser la courbe d'étalonnage (Figure 29).

L'activité du GABA a été déterminée à partir de l'équation de droite $y = 0,0028x$.

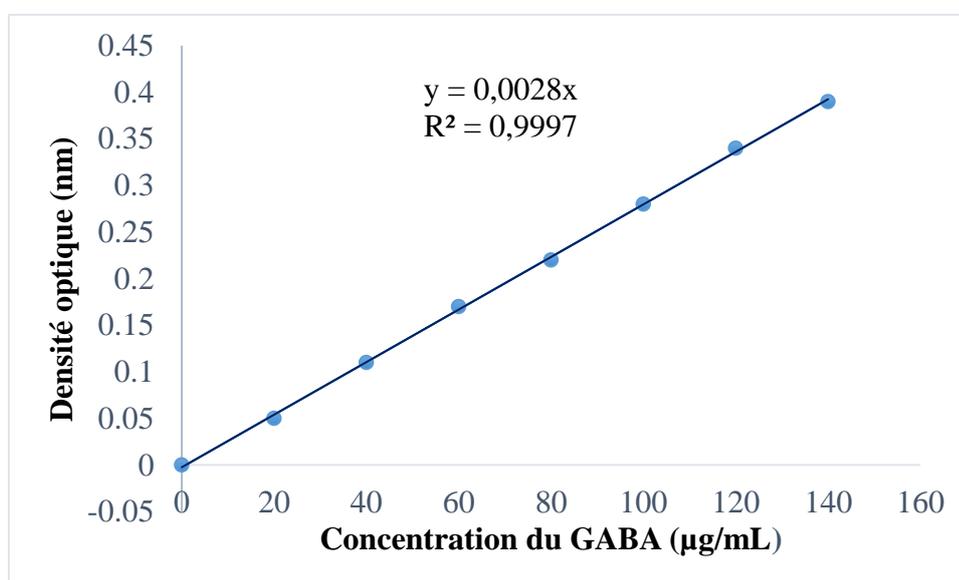


Figure 29: Courbe d'étalonnage du GABA.

II.2.8.7.2- Evaluation de l'activité de la GABA-transaminase

✓ Principe

En présence de chlorure de fer, l'acide semialdéhyde succinique et le 3-méthyl-2-benzothiazolone-2-hydrazone vont former un complexe coloré, dont l'absorbance à 610 nm, est proportionnelle à l'activité de GABA-transaminase (Nayak et Chatterje, 2001).

✓ Mode opératoire

Les tubes ont été remplis suivant le protocole du Tableau XVII.

Tableau XVII: Protocole de dosage de l'acide gamma aminobutyrique

	Echantillon	Blanc
Alpha-ketoglutarate (µL)	15	15
GABA (µL)	15	15
Depyridoxal-5-phosphate (µL)	10	10
Echantillon (µL)	100	-
Méthanol 5 % (µL)	-	100
tampon tris-HCl 50 mM, pH 7,4 (µL)	300	300
les tubes ont été incubés à 37°C dans un bain Marie pendant 60 minutes		
TCA 20 % (µL)	500	500
chlorure ferrique III 12 % (µL)	100	100

L'absorbance des échantillons a été mesurée à 20 et à 90 secondes contre celle du blanc à 610 nm.

L'activité enzymatique de la GABA-T a été déterminée en µg/min/mg de tissu selon la loi de Beer-Lambert :

$$\text{Activité enzymatique de GABA - T (}\mu\text{g/min/mg de tissu)} = \frac{(\mathbf{A_m} \times \mathbf{V_t})}{(\boldsymbol{\varepsilon} \times \mathbf{l} \times \mathbf{V_e} \times \mathbf{m})}$$

A_m : moyenne des absorbances à 610 nm ; **ε** = coefficient d'extinction molaire = 40 M⁻¹.cm⁻¹ ; **V_t** = volume total du milieu réactionnel (ml) ; **V_e** = volume de l'homogénat (mL) ; **l** = trajet optique de cuve = 1cm ; **m** = masse de tissu utilisée (g).

II.2.8.7.3- Evaluation du taux de sérotonine

✓ Principe

En présence de l'acide chlorhydrique, la sérotonine va s'oxyder pour donner un dérivé de l'indole. Ce dernier va s'associer à l'O-phthaldialdehyde pour donner un complexe fluorescent, dont l'absorbance à 470 nm, est proportionnelle à la concentration de la sérotonine (Yoshitake *et al.*, 2004).

✓ Mode opératoire

Les tubes ont été remplis suivant le protocole du tableau XVIII.

Tableau XVIII: Protocole de dosage de la sérotonine

Tubes	Blanc			Etalons					Echantillons
	0	1	2	3	4	5	6	7	X ₁X ₂
Concentration de sérotonine (µg/mL)	-	20	40	60	80	100	120	140	-
Volume de sérotonine (µL)	-	100	100	100	100	100	100	100	-
Echantillon (µL)									80
Eau distillée (µL)	80								
Heptane (µL)	200	200	200	200	200	200	200	200	200
HCl (0,1 M) (µL)	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Les tubes ont été agités vigoureusement pendant 10 minutes à l'aide d'un vortex puis, centrifugés à 3000 tr/min à 0°C pendant 15 minutes									
Surnageant	200	200	200	200	200	200	200	200	200
O-phthaldialdehyde	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Le mélange a été incubé à 70°C dans un bain marie pendant 10 minutes									
L'absorbance des tubes a été mesurée contre le blanc à 470 nm									
Absorbances obtenues	0,000	0,010	0,020	0,027	0,035	0,045	0,055	0,065	-

Les étalons (tubes 1 à 7) ont permis de réaliser la courbe d'étalonnage (Figure 30). Les concentrations de sérotonine (µg/mL) ont été déterminée à partir de l'équation de droite $y = 0,0005x$.

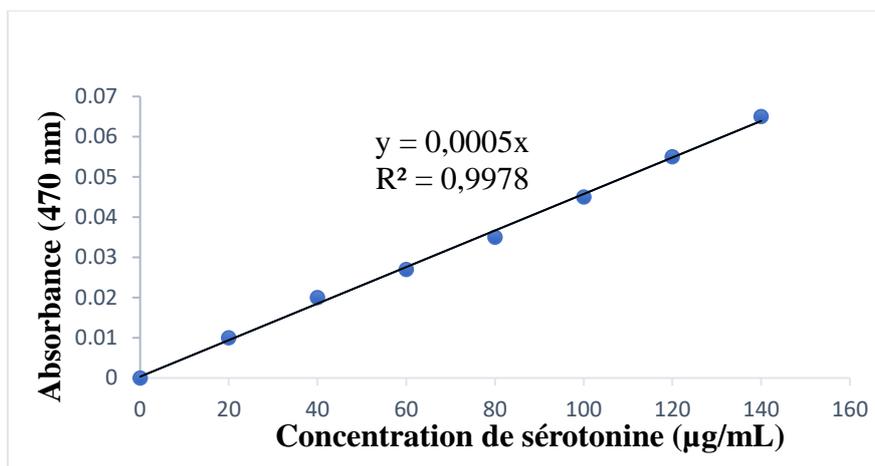


Figure 30: Courbe d'étalonnage de la sérotonine.

II.2.8.9- Evaluation des protéines et de quelques marqueurs du statut oxydant

II.2.8.9.1- Dosage des protéines

✓ Principe

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

✓ Mode opératoire

Le dosage des protéines totales a été réalisé suivant la méthode de Biuret. Le protocole de dosage est présenté dans le tableau XIX.

Tableau XIX: Protocole de dosage des protéines totales

	Blanc		Etalons							Echantillons	
Tubes	0	1	2	3	4	5	6	7	X ₁	X _n	
SAB (µL)	0	50	100	150	200	250	300	600	-	-	
Eau distillée (µL)	600	550	500	450	400	350	300	0	590	590	
Réactif de Biuret (µL)	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	
Echantillons (µL)	-	-	-	-	-	-	-	-	10	10	
Quantité de protéines (mg)	0	0,15	0,30	0,45	0,60	0,75	0,90	1,8	-	-	

Le contenu de chaque tube a été homogénéisé et incubé pendant 10 minutes à température ambiante. L'absorbance a été lue contre le blanc au spectrophotomètre Urit-810 à 540 nm.

Absorbances obtenues	0	0,02	0,03	0,05	0,07	0,09	0,10	0,20	?	?
----------------------	---	------	------	------	------	------	------	------	---	---

SAB = Sérum Albumine Bovin ; 0 = Tube blanc ; 1-7 = Tubes étalons ; X₁-X_n = Tubes échantillons.

La courbe d'étalonnage a été obtenue en faisant correspondre l'absorbance des tubes étalons à la quantité de protéines. La quantité de protéines contenue dans chaque échantillon a été déterminée à partir de la droite d'équation $y = 0,1115x$ (Figure 31).

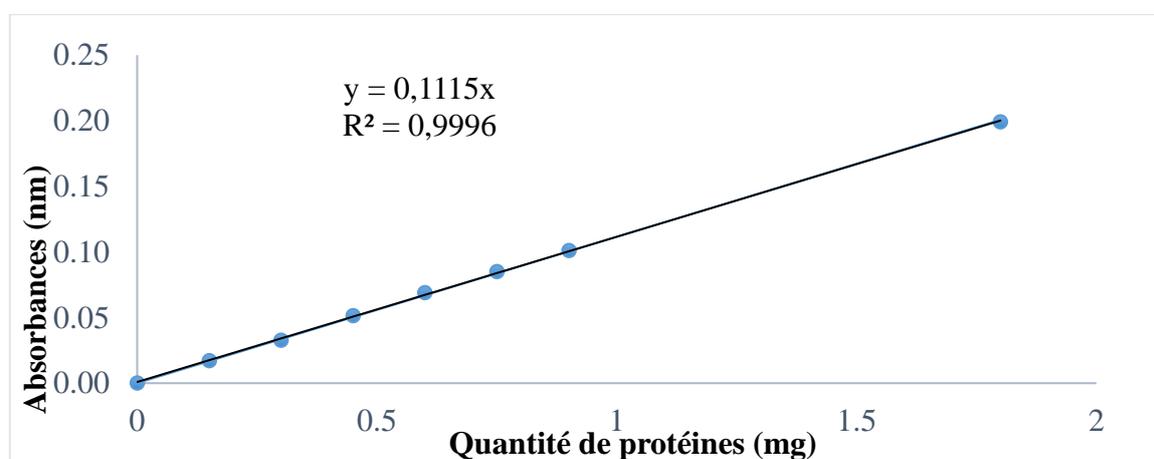


Figure 31: Courbe d'étalonnage des protéines.

II.2.8.9.2- Evaluation du glutathion réduit

✓ Principe

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

✓ **Mode opératoire**

Le tableau XX présente le protocole de dosage colorimétrique du glutathion réduit.

Tableau XX: Protocole de dosage du glutathion réduit

	Blanc réactif	Echantillon
Tampon Tris-HCl 50 mM , pH 7,4 (µL)	100	-
Homogénat (µL)	-	100
Réactif de Ellman (µL)	1500	1500

Les tubes ont été agités et incubés pendant 60 minutes à température ambiante et les absorbances des échantillons ont été lues contre le blanc à 412 nm.

La concentration en glutathion réduit (GSH) dans chaque échantillon a été déterminée par la formule suivante :

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

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

II.2.8.9.3- Dosage du malondialdéhyde

✓ **Principe**

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

✓ **Mode opératoire**

Le dosage colorimétrique du MDA a été réalisé comme décrit dans le XXI.

Tableau XXI: Protocole de dosage du MDA

	Blanc réactif	Echantillon
Tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 (µL)	250	-
Homogénat (µL)	-	250
TCA 20 % (µL)	125	125
TBA 0,67 % (µL)	250	250

Les tubes ont été bouchés à l'aide de billes de verre, chauffés à 90°C au bain-marie pendant 10 minutes, puis refroidis à l'eau de robinet et centrifugés à 3000 tours/min à température ambiante pendant 15 minutes. Le surnageant a été pipeté et l'absorbance lue à 530 nm contre le blanc.

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

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

[MDA] = Concentration de MDA (mol/g d'organes) ; ΔDO = DO essai - DO blanc ; **L** = Trajet optique (1 cm) ; ϵ = Coefficient d'extinction molaire (15600 mol⁻¹. cm⁻¹) ; **m** = Masse de l'organe (g).

II.2.8.9.4- Dosage des nitrites

✓ Principe

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

✓ Mode opératoire

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

Tableau XXII: Protocole de dosage des nitrites

	Blanc	Étalons						Echantillons	
Tubes	0	1	2	3	4	5	6	X ₁	X _n
Concentration de NaNO₂ (µM)	0	0,03	0,06	0,13	0,25	0,50	1,00	-	-
Volume de NaNO₂ (µL)	-	100	100	100	100	100	100	-	-
Echantillons (µL)	-	-	-	-	-	-	-	100	100
Eau distillée (µL)	500	400	400	400	400	400	400	400	400
Réactif de Griess (µL)	500	500	500	500	500	500	500	500	500
Absorbances obtenues	0	0,12	0,26	0,47	0,95	1,97	3,87	-	-

Le contenu de chaque tube a été homogénéisé et incubé à l’abri de la lumière, pendant 10 minutes à température ambiante. L’absorbance a été lue contre le blanc au spectrophotomètre à 546 nm.

La courbe d’étalonnage a été obtenue en faisant correspondre l’absorbance des tubes étalons à la concentration de NaNO₂ (Figure 32).

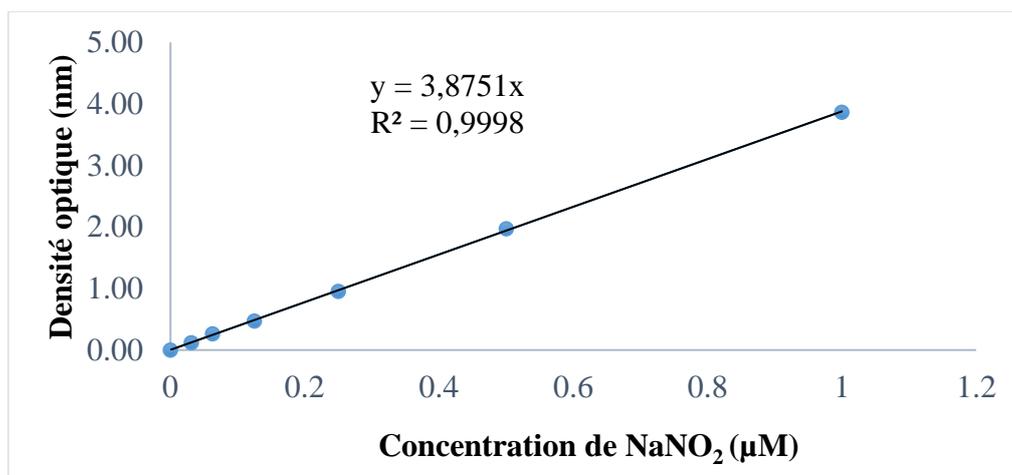


Figure 32: Courbe d’étalonnage des nitrites.

II.2.9- Analyse histologique

L’analyse histologique est la technique de préparation des tissus et/ou organes en vue de leur observation au microscope. Elle comprend différentes étapes dont la fixation, la recoupe ou « trimming », la déshydratation, l’inclusion, la coupe, la coloration, le montage et l’observation.

✓ **Fixation**

L'objectif de la fixation est de maintenir les cellules et les constituants tissulaires dans un état aussi proche que possible de celui du vivant. Ainsi, après le sacrifice des animaux, les organes ont été prélevés et conservés immédiatement dans du formol 10% tamponné.

✓ **Recoupe**

Une fois les organes fixés, ils ont été « trimmés ». À cette étape, il a été question de couper le tissu de manière à lui épaisseur inférieure à celle des cassettes de déshydratation. Les tissus coupés ont été déposés dans des cassettes étiquetées et ont été plongés pour une durée de 1 heure, dans un premier bain d'alcool 70°, première étape du processus de déshydratation.

✓ **Déshydratation**

La déshydratation s'est déroulée en trois étapes successives. La déshydratation proprement dite, l'éclaircissement et l'imprégnation.

❖ **Déshydratation proprement dite**

Cette étape a pour but de débarrasser les échantillons de toute trace d'eau avant leur inclusion dans de la paraffine. Elle a consisté à laisser les cassettes contenant les tissus dans des bains d'alcool de concentrations croissantes respectives de 70 % (1 h), 95 % (1 h), 95 % (1 h 30), 100 % (1 h), 100 % (1 h 30), 100 % (2 h).

❖ **Éclaircissement**

L'éclaircissement a consisté à remplacer la solution de déshydratation qui est l'alcool par le solvant miscible dans le milieu d'inclusion. Les cassettes contenant les tissus ont séjourné dans deux bains de xylène consécutifs. Un premier bain de deux heures et un deuxième bain "over night".

❖ **Imprégnation**

Cette étape a consisté à introduire les cassettes contenant les tissus dans un bain de paraffine en fusion pendant 4 h 30 min dans la station d'enrobage de marque Microm Heidelberg.

✓ **Inclusion**

L'inclusion est le procédé qui fournit un support externe aux tissus, ce qui permet la réalisation de fines coupes au microtome. Les tissus ont été placés selon une orientation précise

dans des moules en inox qui ont par la suite été remplis de paraffine en fusion. L'ensemble a été mis à solidifier sur une plaque réfrigérée pour en obtenir des blocs.

✓ Coupe

La coupe des blocs de paraffine contenant les tissus a été réalisée à l'aide d'un microtome de marque Reichert-Jung 2030. L'épaisseur des rubans après coupe était de 5 µm. Une fois coupées, les sections de rubans ont été mises à déplier dans un bain-marie contenant de l'eau gélatinée à environ 45°C. Elles ont été récupérées sur des lames de verre étiquetées et séchées à l'étuve à 45°C, pendant 24 heures avant coloration.

✓ Coloration

La coloration a pour but de mettre en évidence les différents éléments tissulaires et de les différencier entre eux afin de permettre l'étude de leur structure, de leur morphologie et des éventuelles modifications pathologiques. Avant l'étape de la coloration, les coupes ont d'abord été déparaffinées. Le protocole de déparaffinage est consigné dans le tableau XXIII. Immédiatement après l'étape de déparaffinage, les lames portant les coupes de tissus ont été colorées à l'hématoxyline et à l'éosine. Les étapes de cette coloration sont résumées dans le tableau XXIV.

Tableau XXIII: Protocole de déparaffinage

Ordre	Solution	Temps de séjour	Ordre	Solution	Temps de séjour
1	Xylène	10 minutes	5	Ethanol 100°	3 minutes
2	Xylène	10 minutes	6	Ethanol 100°	3 minutes
3	Xylène	10 minutes	7	Eau distillée	10 minutes
4	Ethanol 100°	3 minutes			

Tableau XXIV: Etapes de la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine

Ordre	Solution	Temps de séjour	Ordre	Solution	Temps de séjour
1	Hématoxyline de Mayer	10 minutes	7	Ethanol 100%	1 minute
2	Rinçage à l'eau courante	10 minutes	8	Ethanol 100%	1 minute
3	Carbonate de sodium 0,5%	15 secondes	9	Xylène	5 minutes
4	Rinçage à l'eau distillée	5 minutes	10	Xylène	5 minutes
5	Eosine à l'alcool 0,5%	5 minutes	11	Xylène	5 minutes
6	Ethanol 100%	1 minute	12	Montage sous résine	

✓ Montage

L'étape de montage entre lame et lamelle a directement suivi la coloration. Pour se faire, quelques gouttes de résine synthétique de marque Eukit ont été déposées sur la lame portant la coupe colorée avant apposition d'une lamelle. Les coupes de tissus sur les lames ont ainsi été protégées et conservées. Les lames colorées puis montées ont été observées à différents grossissement, à l'aide d'un microscope optique de marque Scientico STM-50 muni d'une caméra digitale de marque Celestron 44421 connectée à un ordinateur pour la prise des microphotographies. A l'aide du logiciel imageJ version 1.520, les images obtenues ont été utilisées pour le comptage des cellules dans les régions CA1 et CA3 de l'hippocampe, le comptage des follicules ovariens et la mesure de la taille de la média et de l'épithélium utérin et vaginal.

II.2.10- Analyses statistiques des résultats

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

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1- Résultats

III.1.1- Analyse phytochimique de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii*

III.1.1.1- Composition phytochimique qualitative de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii* (*P. soyauxii*)

L'analyse phytochimique qualitative de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* a permis de mettre en évidence les composés bioactifs suivants : les tanins, les saponines, les phénols, les stéroïdes, les alcaloïdes, les glycosides, les quinones et les flavonoïdes. Les triterpènes et les anthocyanes étaient absents dans cet extrait (tableau XXV).

Tableau XXV: Composés bioactifs identifiés dans l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii*

Métabolites secondaires	Extrait aqueux du duramen de <i>Pterocarpus soyauxii</i>
Alcaloïdes	+
Flavonoïdes	+
Saponines	+
Anthocyanines	-
Quinones	+
Glycosides	+
Stéroïdes	+
Triterpènes	-
Tannins	+
Phénols	+

+ : présent ; - : absent

III.1.1.2- Identification des composés de l'extrait de *P. soyauxii* par analyse UHPLC-MS

La spectrométrie de masse des ions et un chromatogramme de pic de base représentatif sont présentés à la figure 33 et au tableau XXVI. L'UHPLC-MS a permis d'identifier sept composants : l'ambrial, le 7-O-acétylformononetine, le khrinone A, le mono (2-éthylhexyl) phtalate, le Cembrene, le 3',5'-diméthoxy-4-stilbénol et l'acide linoléique.

Tableau XXVI: Principaux signaux présentés dans les spectres LC-MS des composés détectés chez *Pterocarpus soyauxii* et attribution proposée

N°	Tr (min)	[M+H] ⁺		Formule moléculaire	Noms des composés
		Exp.	Calcl.		
1	0,4	235,2035	235,2056	C ₁₆ H ₂₇ O	Ambrial
2	0,5	215,0544	215,0550	C ₉ H ₁₁ O ₆	Non identifié
3	0,6	311,0875	311,0914	C ₁₈ H ₁₅ O ₅	7-O-Acetylformononetin
4	0,7	301,0738	301,0707	C ₁₆ H ₁₃ O ₆	Khrinone A
5	0,8	181,1063	181,1071	C ₇ H ₁₇ O ₅	Non identifié
6	2,4	195,1223	195,1227	C ₈ H ₁₉ O ₅	Non identifié
7	2,6	279,1609	279,1591	C ₁₆ H ₂₃ O ₄	Mono (2-ethylhexyl) phthalate
8	2,8	437,2909	437,2898	C ₂₅ H ₄₁ O ₆	Non identifié
9	2,9	273,2577	273,2577	C ₂₀ H ₃₃	Cembrene A
10	2,9	305,1074	305,1078	C ₉ H ₂₁ O ₁₁	Non identifié
11	3,0	209,1507	209,1536	C ₁₃ H ₂₁ O ₂	Non identifié
12	3,1	211,1301	211,1329	C ₁₂ H ₁₉ O ₃	Non identifié
13	3,2	293,2127	293,2111	C ₁₈ H ₂₉ O ₃	Non identifié
14	3,5	257,1210	257,1172	C ₁₆ H ₁₇ O ₃	3',5'-dimethoxy-4-Stilbenol
15	3,8	281,2495	281,2474	C ₁₈ H ₃₃ O ₂	Acide linoléique
16	4,0	235,2054	235,2056	C ₁₆ H ₂₇ O	Non identifié
17	4,1	263,2378	263,2369	C ₁₈ H ₃₁ O	Non identifié

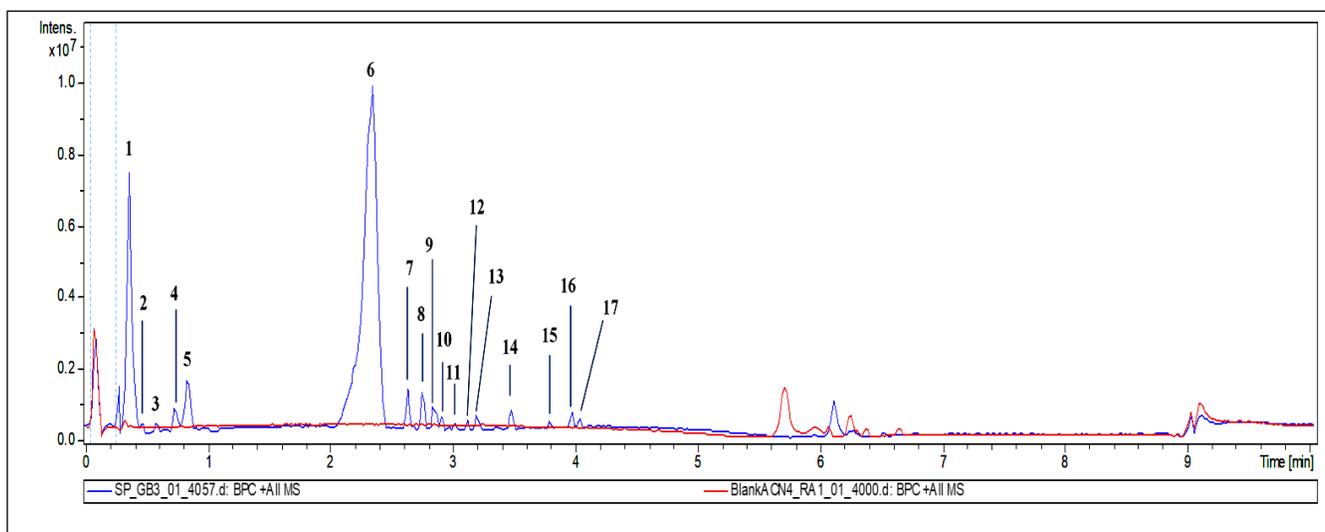


Figure 33: Profil chromatographique de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii*.

III.1.2- Composition phytochimique quantitative de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii*

Le tableau XXVII présente les concentrations de flavonoïdes, de polyphénols et de tanins contenues dans l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii*. Il ressort de ce tableau que l'extrait de *Pterocarpus soyauxii* contient respectivement $229,42 \pm 3,62$ mg EAG/g, $63,42 \pm 2,16$ mg EQ/g et $27,88 \pm 0,23$ mg ETA/g de polyphénols, flavonoïdes et tanins.

Tableau XXVII: Analyse phytochimique quantitative de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii*

Métabolites secondaires	Extrait aqueux du duramen de <i>P. soyauxii</i>
Flavonoïdes (mg EQ/g)	$63,42 \pm 2,16$
Polyphénols (mg EAG/g)	$229,42 \pm 3,62$
Tannins (mg EAT/g)	$27,88 \pm 0,23$

mg EAT/g = mg équivalent d'acide tannique par gramme d'extrait, **mg EAG/g** = mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait, **mg EQ/g** = mg équivalent de quercétine par gramme d'extrait.

III.1.3- Activité antioxydante *in vitro* de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii*

Le tableau XXVIII présente les concentrations inhibitrices 50 de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* vis-à-vis des radicaux DPPH, ABTS et FRAP. Il ressort de ce tableau que la concentration inhibitrice 50 (CI₅₀) de la vitamine C était de 24,56 µg/mL et celle de l'extrait aqueux de *P. soyauxii* était de 730,20 µg/mL vis-à-vis du radical DPPH. La CI₅₀ de la vitamine C était de 37,75 µg/mL et de 892,90 µg/mL pour l'extrait de *P. soyauxii* vis-à-vis du radical ABTS. La concentration de FRAP était de 765,75 mEAG/g.

Tableau XXVIII: Concentration inhibitrice 50 de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii* contre les radicaux DPPH et ABTS et concentration FRAP

Substances	Paramètres FRAP (mEAG/g)	CI ₅₀ du DPPH (µg/mL)	CI ₅₀ de l'ABTS (µg/mL)
Vitamine C	-	24,56	37,75
Extrait de <i>P. soyauxii</i>	765,79	730,20	892,90

mg EAG/g = mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait.

III.1.4- Effets œstrogéniques de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* dans un test utéro-trophique classique

III.1.4.1- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur l'utérus

III.1.4.1.1- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur la masse relative et le taux de protéines de l'utérus chez les rates ovariectomisées traitées pendant 3 jours

La figure 34 est une représentation des effets du traitement de trois jours à l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur la masse relative de l'utérus (Figure 34A) et le taux de protéines utérines (Figure 34B). Il ressort de cette figure que l'ovariectomie a entraîné une diminution significative ($p < 0,001$) de la masse relative de l'utérus et du taux de protéines en comparaison aux animaux *sham-operated*. Le traitement à l'extrait de *P. soyauxii* a entraîné comparativement aux animaux Ovx recevant de l'eau distillée, une augmentation significative ($p < 0,05$) de la masse relative de l'utérus frais à la dose de 200 mg/kg. *P. soyauxii* à 200 et à 300 mg/kg a augmenté de manière significative le taux de protéines utérines ($p < 0,001$) en comparaison aux témoins Ovx. Il en est de même de l'extrait à la dose de 100 mg/kg qui a augmenté significativement ($p < 0,05$) le taux de protéines utérines comparativement aux témoins Ovx.

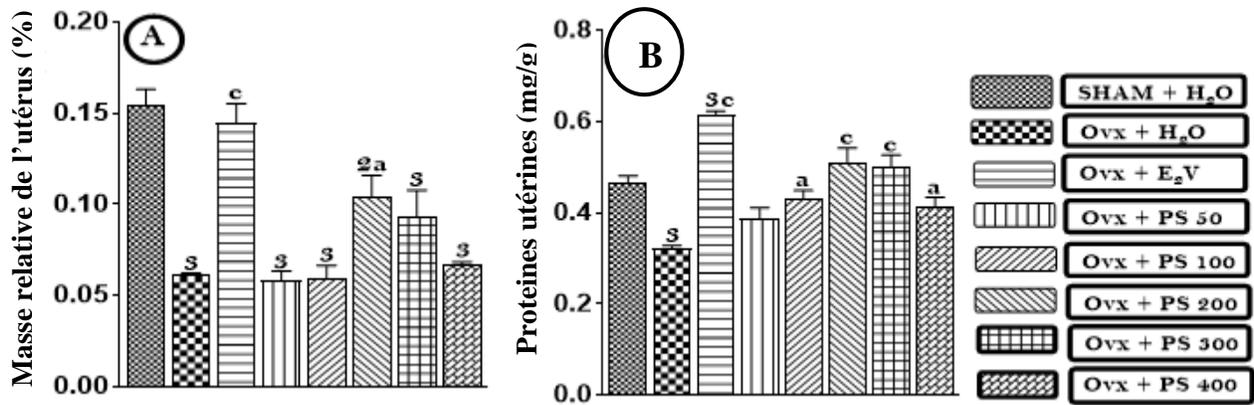


Figure 34: Effets du traitement de 3 jours des rates ovariectomisées à l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur la masse relative de l'utérus frais (A) et le taux de protéines totales dans l'utérus (B).

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM ; n = 5 ; ¹p < 0,05 ; ²p < 0,01 ; ³p < 0,001, différence significative par rapport au Témoin *Sham-operated* ; ^ap < 0,033 ; ^bp < 0,002 ; ^cp < 0,001, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin *sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant de l'eau distillée (10 mL/kg), **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. **Ovx + PS 50, Ovx + PS 100, Ovx + PS 200, Ovx + PS 300 et Ovx + 400** = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* aux doses de 50, 100, 200, 300 et 400 mg/kg

III.1.4.1.2- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur la structure de l'utérus chez les rates ovariectomisées traitées pendant 3 jours

La figure 35 montre les effets de *P. soyauxii* sur la structure de l'utérus. Il ressort de cette figure que les animaux du groupes "Sham-operated" présentent une lumière utérine, un épithélium utérin et un stroma bien différencié. L'ovariectomie a réduit par rapport aux Sham-operated, la taille de l'épithélium utérin. *P. soyauxii* à 200 et à 300 mg/kg a induit une augmentation de la taille de l'épithélium utérin.

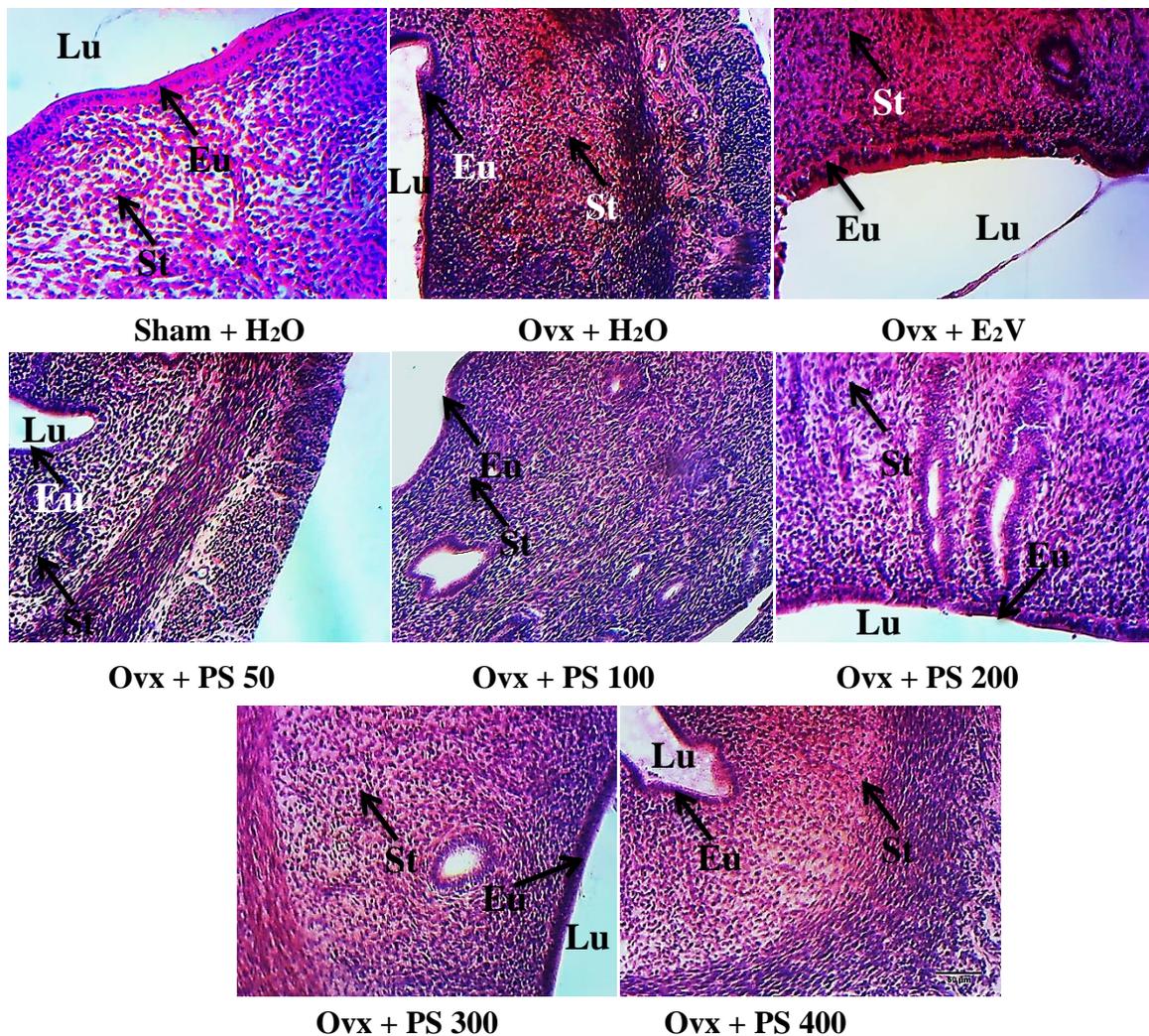


Figure 35: Effets du traitement de 3 jours des rates ovariectomisées à l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur la structure de l'utérus (H-E, 100X).

SHAM + H₂O = Témoin *sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant de l'eau distillée (10 mL/kg), **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. **Ovx + PS 50, Ovx + PS 100, Ovx + PS 200, Ovx + PS 300 et Ovx + 400** = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* aux doses de 50, 100, 200, 300 et 400 mg/kg. **Lu** = lumière utérine ; **Eu** = Epithélium utérin ; **St** = Stroma.

III.1.4.1.3- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur la taille de l'épithélium utérin chez les rates ovariectomisées traitées pendant 3 jours

La figure 36 présente les effets de *P. soyauxii* sur la taille de l'épithélium utérin. Il ressort de cette figure que l'ovariectomie a réduit de manière significative ($p < 0,001$), la taille de l'épithélium utérin en comparaison au animaux *sham-operated*. L'extrait aqueux de *P. soyauxii* a

augmenté de manière significative la taille de l'épithélium utérin aux doses de 200 ($p < 0,001$) et de 300 ($p < 0,01$) mg/kg comparativement aux témoins Ovx recevant de l'eau distillée.

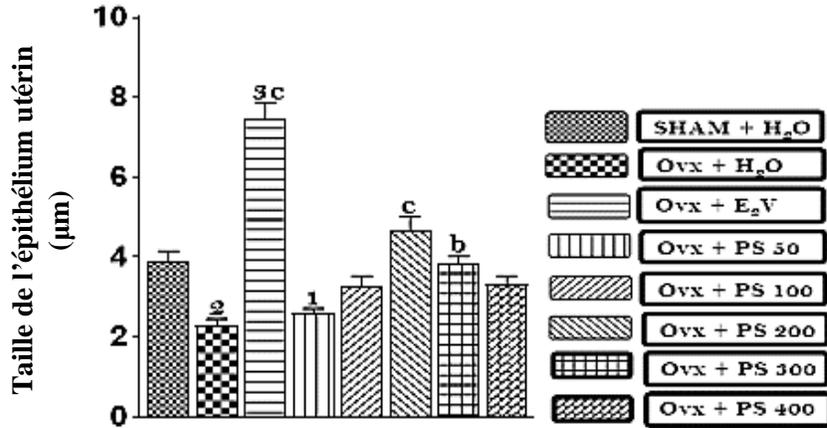


Figure 36: Effets du traitement de 3 jours des rates ovariectomisées à l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur la taille de l'épithélium utérin.

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM ; $n = 75$; ¹ $p < 0,05$; ² $p < 0,01$; ³ $p < 0,001$, différence significative par rapport au Témoin *Sham-operated* ; ^a $p < 0,033$; ^b $p < 0,002$; ^c $p < 0,001$, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; SHAM + H₂O = Témoin *sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; Ovx + H₂O = Témoin négatif recevant de l'eau distillée (10 mL/kg), Ovx + E₂V = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. Ovx + PS 50, Ovx + PS 100, Ovx + PS 200, Ovx + PS 300 et Ovx + 400 = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* aux doses de 50, 100, 200, 300 et 400 mg/kg.

III.1.4.2- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur le vagin des rates ovariectomisées et traitées pendant 3 jours

III.1.4.2.1- Effets de *P. soyauxii* sur la cytologie vaginale chez les rates ovariectomisées traitées pendant 3 jours

La figure 37 montre les effets de *P. soyauxii* sur la cytologie vaginale des rates Ovx. Il ressort de cette figure que la suppression des ovaires a entraîné une abondance des cellules polynucléaires sur le frottis vaginal des rates Ovx recevant de l'eau distillée. Le frottis vaginal des rates Ovx traitées à *P. soyauxii* présente en plus des polynucléaire, des cellules intermédiaires et des cellules parabasales. Le frottis vaginal des rates traitées au duramen de *P. soyauxii* à la dose de 100 mg/kg présente des cellules épithéliales rondes avec un noyau bien différencié. À 200 et 300 mg/kg on note la présence des cellules plates et kératinisées semblables à celles des rates traitées à l'oestradiol. À 400 mg/kg, on note la présence des cellules kératinisées, des cellules intermédiaires et des polynucléaires.

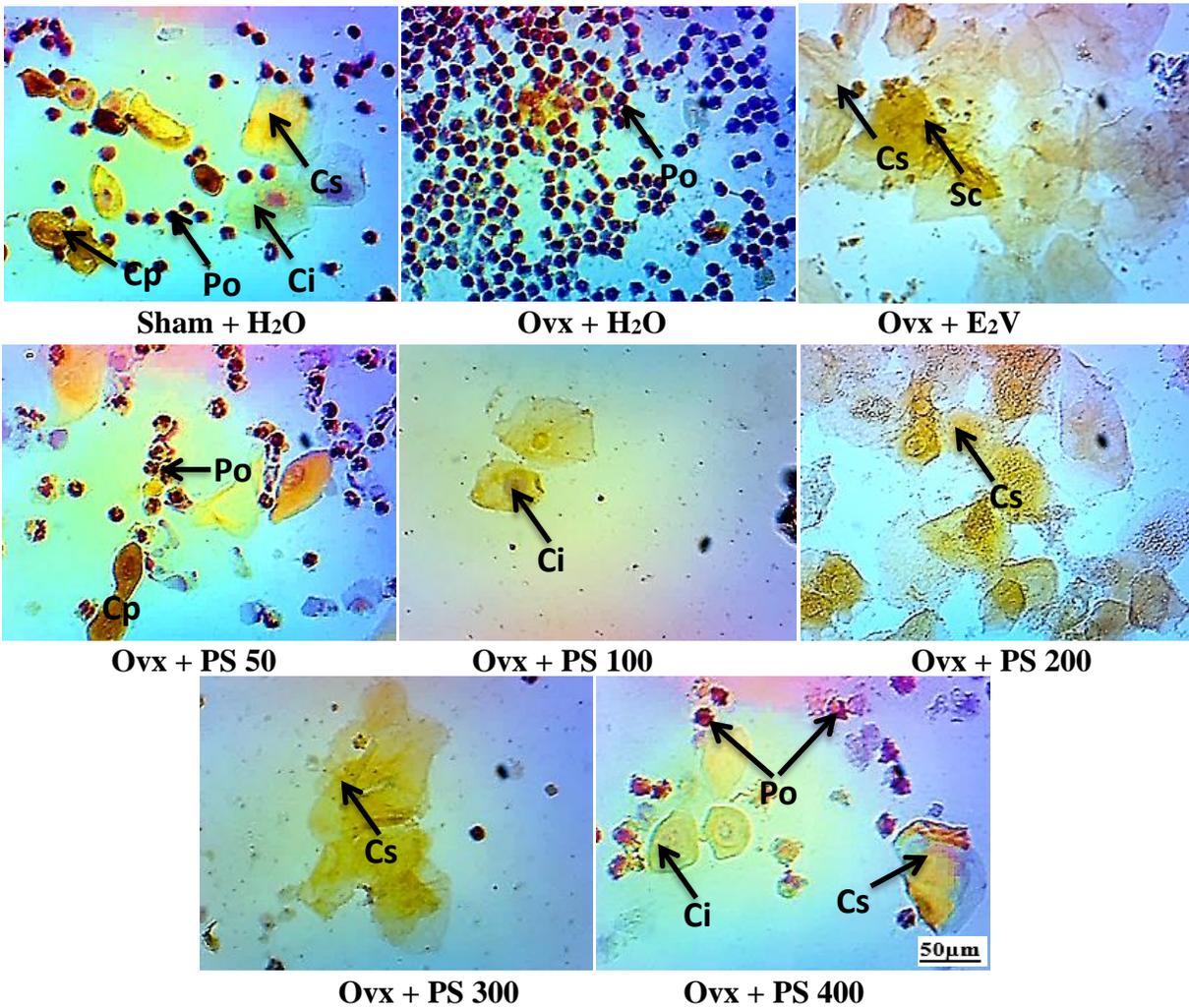


Figure 37: Photographies montrant l'effet d'un traitement au duramen de *P. soyauxii* de 3 jours sur la cytologie vaginale des rates ovariectomisées (100X, Papanicolaou).

SHAM + H₂O = Témoin *sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant de l'eau distillée (10 mL/kg), **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. **Ovx + PS 50, Ovx + PS 100, Ovx + PS 200, Ovx + PS 300 et Ovx + 400** = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* aux doses de 50, 100, 200, 300 et 400 mg/kg. **CS** = Cellule superficielle ; **Ci** = Cellule intermédiaire ; **Po** = Polynucléaires ; **CP** = Cellule parabasale.

III.1.4.2.2- Effets de l'extrait aqueux de *P. soyauxii* sur la structure du vagin des rates ovariectomisées traitées pendant 3 jours

La figure 38 montre les effets du traitement de 3 jours à *P. soyauxii* sur la structure du vagin. Il ressort de cette figure que les animaux *sham-operated* ont un vagin qui présente une couche germinative et une couche granuleuse. Les rates Ovx recevant l'eau distillée présentent uniquement la couche germinative. Les animaux des groupes Ovx recevant l'E₂V et l'extrait à la dose de 200 mg/kg présentent des couches germinatives, granuleuses et cornées. A 300 mg/kg, on

note la présence des couches granuleuses et germinatives. Les groupes recevant l'extrait aux doses de 100 et 400 mg/kg présentent uniquement les couches germinatives.

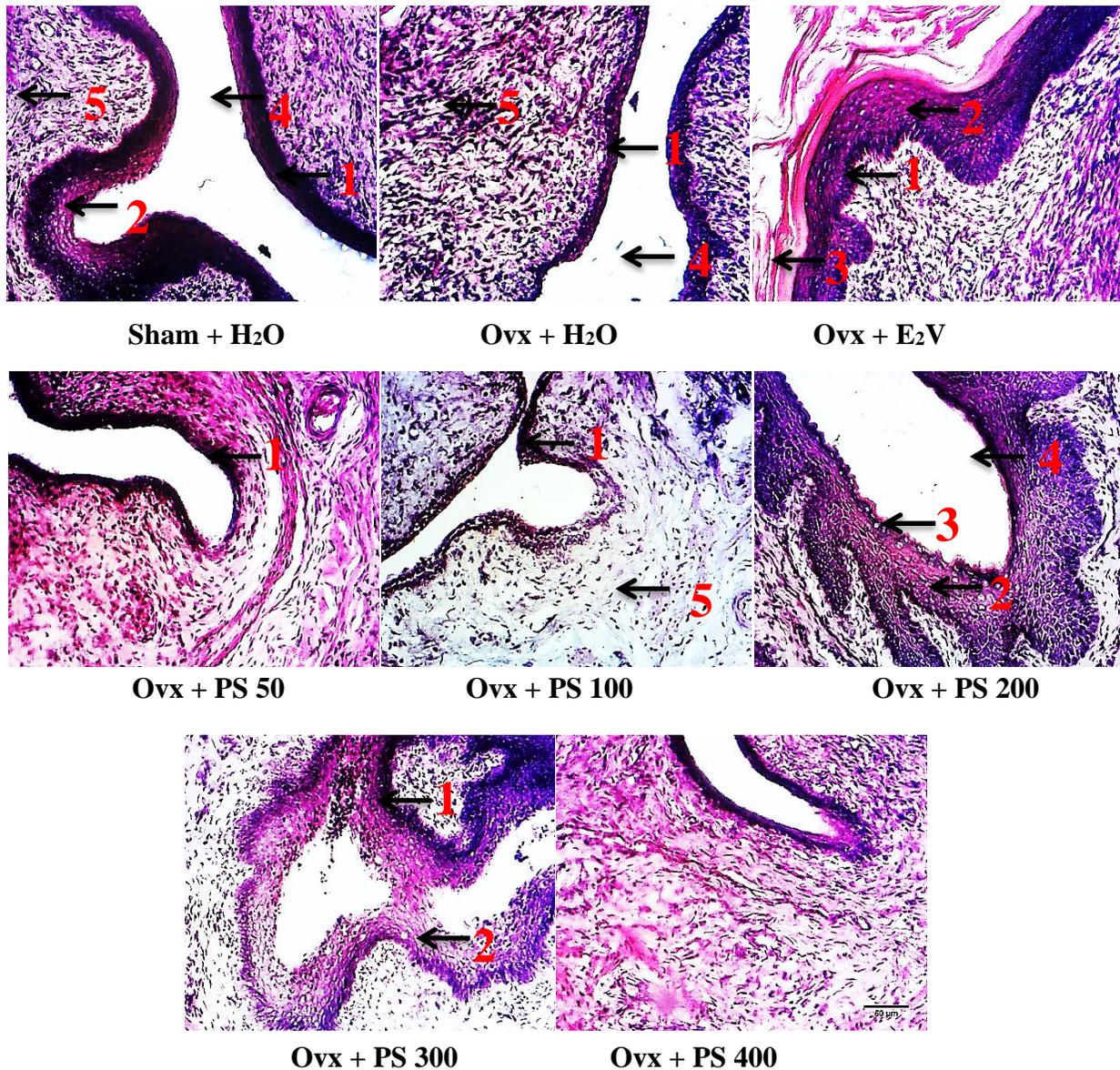


Figure 38: Effets de *Pterocarpus soyauxii* sur la structure du vagin des rates ovariectomisées traitées pendant 3 jours (100X, H-E).

SHAM + H₂O = Témoin *sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant de l'eau distillée (10 mL/kg), **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. **Ovx + PS 50, Ovx + PS 100, Ovx + PS 200, Ovx + PS 300 et Ovx + 400** = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* aux doses de 50, 100, 200, 300 et 400 mg/kg. **1** = "Stratum germinativum" ; **2** = "Stratum granulosum", **3** = "Stratum corneum", **4** = "Lumen", **5** = Chorion.

III.1.4.2.- Effets de l'extrait aqueux de *P. soyauxii* sur la taille de l'épithélium vaginal des rates ovariectomisées traitées pendant 3 jours

La figure 39 traduit les effets de *P. soyauxii* sur la taille de l'épithélium vaginal des rates ovariectomisées au terme d'un traitement de 3 jours. Il ressort de cette figure que l'ablation des ovaires a entraîné une diminution significative ($p < 0,001$) de la taille de l'épithélium vaginal comparativement aux animaux *sham-operated*. *P. soyauxii* a entraîné une augmentation significative ($p < 0,001$) de la taille de l'épithélium vaginal aux doses de 200 et 300 mg/kg en comparaison au témoin Ovx.

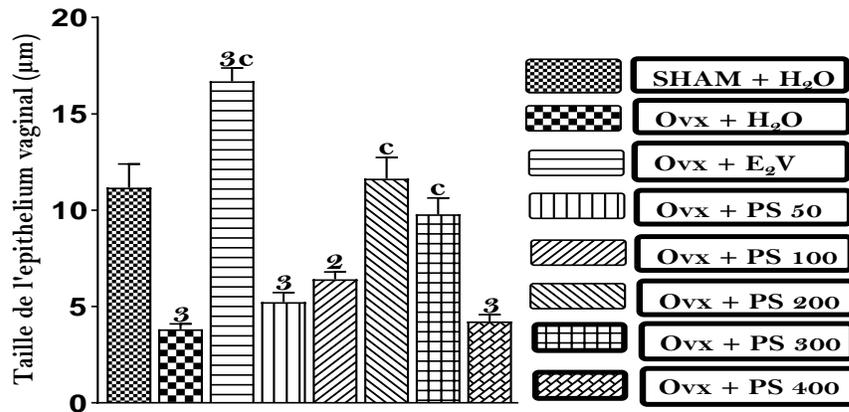


Figure 39: Effets de *Pterocarpus soyauxii* sur la structure du vagin des rates ovariectomisées traitées pendant 3 jours (100X, H-E).

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM ; $n = 75$; $^2p < 0,01$; $^3p < 0,001$, différence significative par rapport au contrôle *Sham-operated* ; $^cp < 0,001$, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin *sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant de l'eau distillée (10 mL/kg), **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. **Ovx + PS 50, Ovx + PS 100, Ovx + PS 200, Ovx + PS 300 et Ovx + 400** = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* aux doses de 50, 100, 200, 300 et 400 mg/kg. **1** = Stratum germinativum ; **2** = *Stratum granulosum*, **3** = *Stratum corneum*, **4** = Lumen, **5** = Chorion.

III.1.4.3.- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur la glande mammaire des rates ovariectomisées et traitées pendant 3 jours

La figure 40 est une représentation des effets de *P. soyauxii* sur la structure de la glande mammaire. Il ressort de cette figure que l'ablation chirurgicale des ovaires a entraîné une régression de la taille des acinis mammaires qui ne présentent pas dans leur lumière des sécrétions éosinophiles en comparaison aux animaux *sham-operated*. Le traitement à *P. soyauxii* a entraîné

une augmentation de la taille des acinis mammaires et on n’y observe la présence des sécrétions éosinophiles aux doses de 100, 200 et de 300 mg/kg en comparaison aux animaux du lot Ovx.

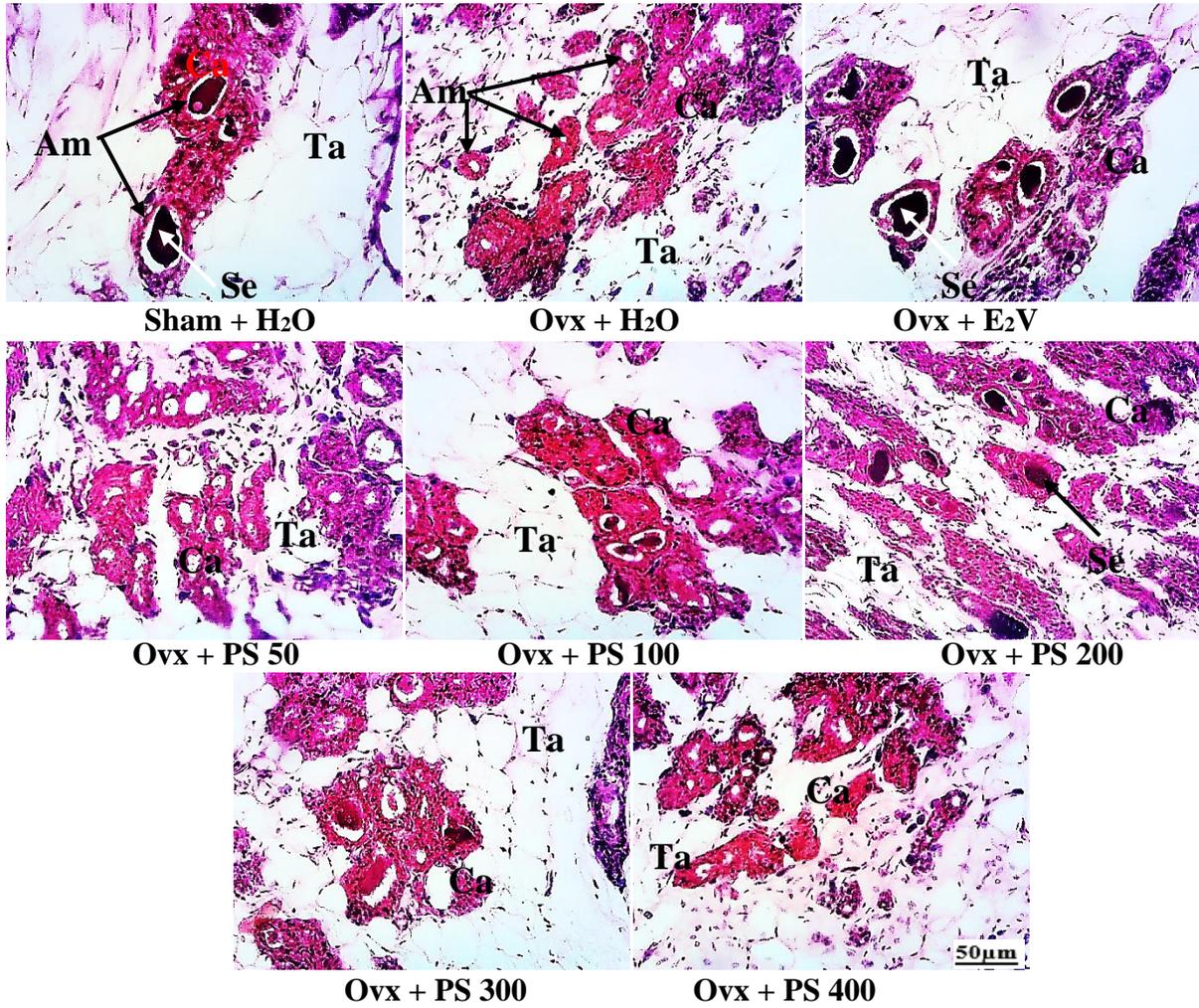


Figure 40: Photographies montrant l’effet d’un traitement de 3 jours au duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur la structure de la glande mammaire chez les rates ovariectomisées (100X, H-E).

(n = 5). **SHAM + H₂O** = Témoin *sham-operated* recevant de l’eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant de l’eau distillée (10 mL/kg), **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l’E₂V à la dose de 1 mg/kg. **Ovx + PS 50, Ovx + PS 100, Ovx + PS 200, Ovx + PS 300 et Ovx + 400** = Animaux traités à l’extrait aqueux de *P. soyauxii* aux doses de 50, 100, 200, 300 et 400 mg/kg. **Am** = Acini mammaire, **Lu** = lumière acinaire ; **Ca** = couche cellulaire de l’acinus ; **Ta** = tissu adipeux ; **Se** = Sécrétion éosinophile.

III.1.5- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur quelques symptômes de la ménopause chez les rates ovariectomisées

III.1.5.1- Effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii* sur les organes œstrogénodépendants chez les rates ovariectomisées

III.1.5.1.1- Effets de l'extrait aqueux *P. soyauxii* sur l'utérus chez les rates ovariectomisées

III.1.5.1.1.1- Effets de l'extrait aqueux *P. soyauxii* sur la masse relative et le taux de protéines de l'utérus chez les rates ovariectomisées

La figure 41 illustre les effets du traitement à l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* pendant 28 jours sur la masse relative de l'utérus (Figure 41A) et le taux de protéines utérines (Figure 41B). Il ressort de ces figures que l'ovariectomie après 112 jours a entraîné comparativement aux animaux *sham-operated* une diminution significative ($p < 0,001$) de la masse relative de l'utérus et du taux de protéines utérine. L'administration pendant 28 jours de l'extrait de plante à la dose de 200 mg/kg a entraîné une augmentation significative du taux de protéines utérines ($p < 0,05$).

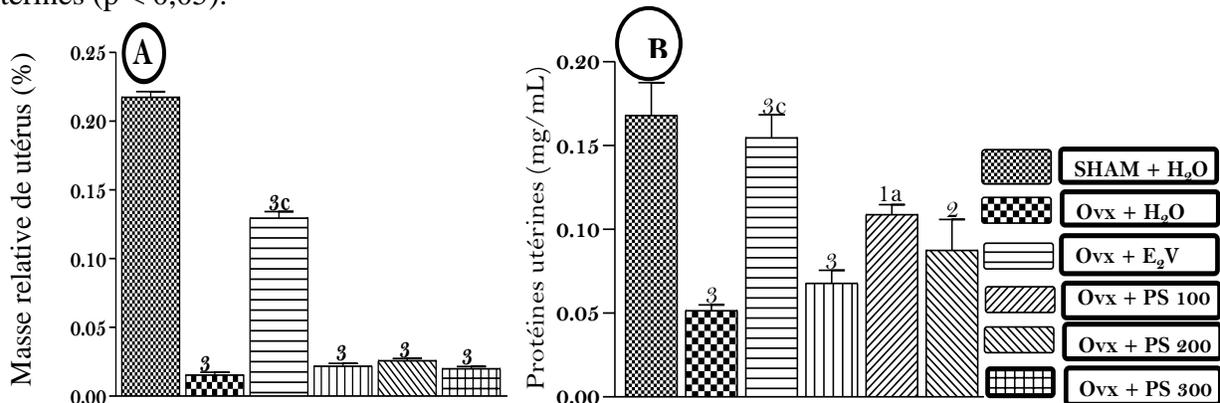


Figure 41: Effets du traitement de 28 jours à l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur la masse relative de l'utérus frais (A) et le taux de protéines utérines (B) chez les rates 84 jours après ovariectomie.

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM ; $n = 5$; ¹ $p < 0,05$; ² $p < 0,01$; ³ $p < 0,001$, différence significative par rapport au contrôle *sham-operated* ; ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$, différence significative par rapport aux rates Ovx à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin *sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant de l'eau distillée (10 mL/kg), **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. **Ovx + PS 100**, **Ovx + PS 200**, et **Ovx + PS 300** = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* aux doses de 100, 200 et de 300 mg/kg.

III.1.5.1.1.2- Effets de l'extrait aqueux de *P. soyauxii* sur la structure de l'utérus chez les rates ovariectomisées

La figure 42 illustre les effets du traitement à l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* pendant 28 jours sur la structure de l'utérus des rates ovariectomisées. Il ressort de cette figure que les animaux du groupes "Sham-operated" présentent une lumière utérine, un épithélium utérin et un stroma bien différenciés. L'ovariectomie a réduite la taille de l'épithélium utérin 112 jours après l'ablation des ovaires. *P. soyauxii* aux différentes doses n'a pas fait varier cette taille de l'épithélium utérin.

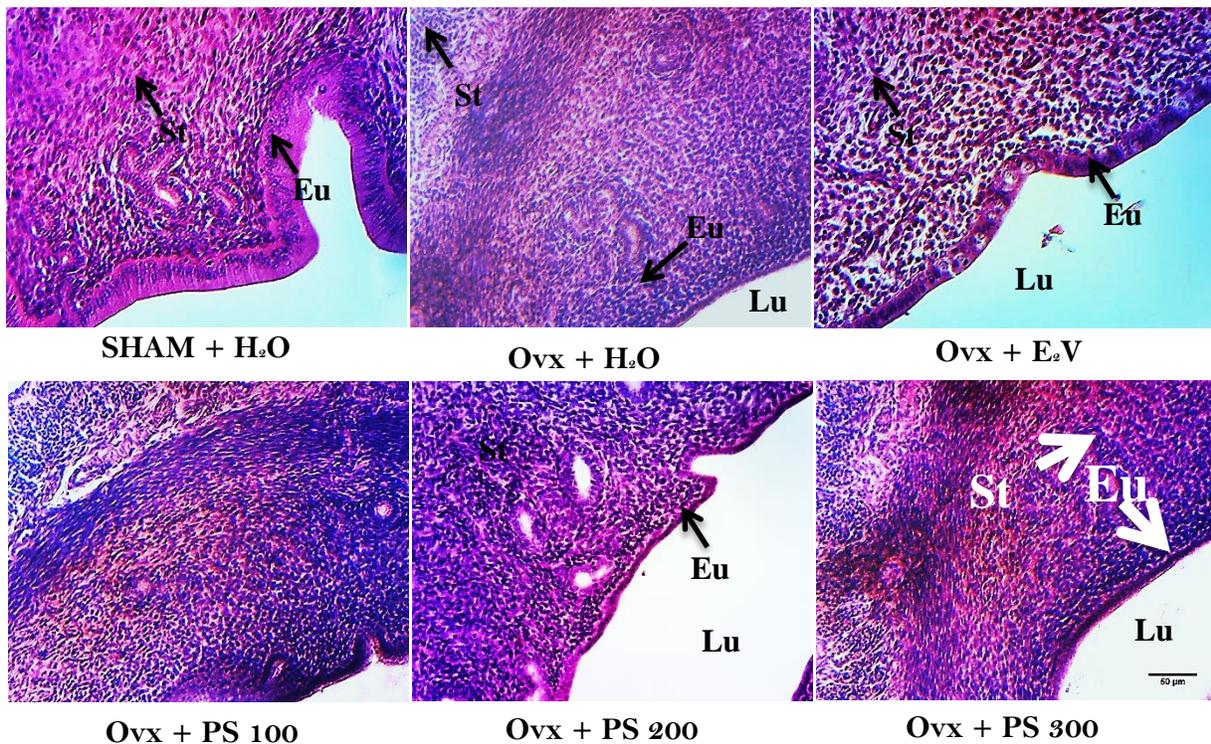


Figure 42: Effets du traitement de 28 jours à l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur la structure de l'utérus, 84 jours post-ovariectomie suivis de 28 jours de traitement (H-E, 100X).

SHAM + H₂O = Témoin *sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant de l'eau distillée (10 mL/kg), **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. **Ovx + PS 100, Ovx + PS 200, et Ovx + PS 300** = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* aux doses de 100, 200 et de 300 mg/kg. **Lu** = lumière utérine ; **Eu** = Epithélium utérin ; **St** = Stroma.

III.1.5.1.1.3- Effets de l'extrait aqueux de *P. soyauxii* sur la taille de l'épithélium utérin chez les rates ovariectomisées

La figure 43 traduit les effets de 28 jours de traitement à l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur la taille de l'épithélium utérin des rates ovariectomisées. Il ressort de cette figure que l'ovariectomie 112 après a réduit de manière significative ($p < 0,001$), la taille de l'épithélium utérin en comparaison au animaux *sham-operated*. L'extrait aqueux de *P. soyauxii* aux différentes doses et comparativement aux témoins Ovx recevant de l'eau distillée n'a pas affecté significativement la taille de l'épithélium utérin.

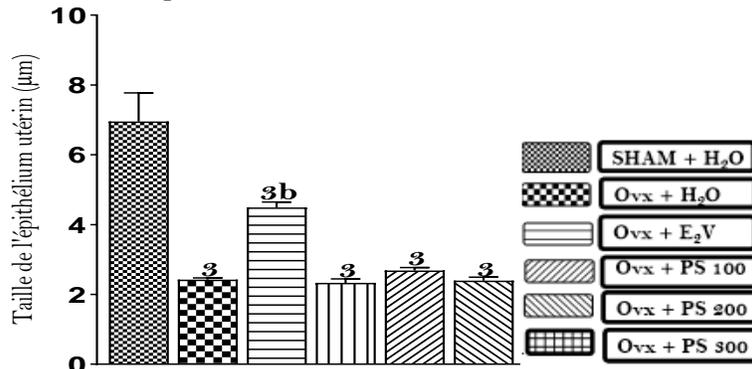


Figure 43 : Effets du traitement de 28 jours à l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur la taille de l'épithélium utérin, 84 jours post-ovariectomie suivis de 28 jours de traitement.

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM ; $n = 5$; ¹ $p < 0,05$; ² $p < 0,01$; ³ $p < 0,001$, différence significative par rapport au contrôle *sham-operated* ; ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$, différence significative par rapport aux rates Ovx à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin *sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant de l'eau distillée (10 mL/kg), **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. **Ovx + PS 100**, **Ovx + PS 200**, et **Ovx + PS 300** = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* aux doses de 100, 200 et de 300 mg/kg.

III.1.5.1.2- Effets de l'extrait aqueux de *P. soyauxii* sur le vagin chez les rates ovariectomisées

III.1.5.1.2.1- Effets de l'extrait aqueux de *P. soyauxii* sur la cytologie vaginale chez les rates ovariectomisées

La figure 44 montre les effets du traitement de 28 jours au duramen de *P. soyauxii* sur la cytologie vaginale des rates ovariectomisées après 84 jours. Il découle de cette figure que la suppression chirurgicale des ovaires a induit après 112 jours, une abondance des cellules polynucléaires observables sur le frottis vaginal des animaux Ovx. L'extrait de *P. soyauxii* a entraîné une apparition des cellules superficielles sur les frottis vaginaux des rates traitées à l'extrait aux doses de 100, 200 et de 300 mg/kg au même titre que l'œstradiol valérate comparativement au lot Ovx.

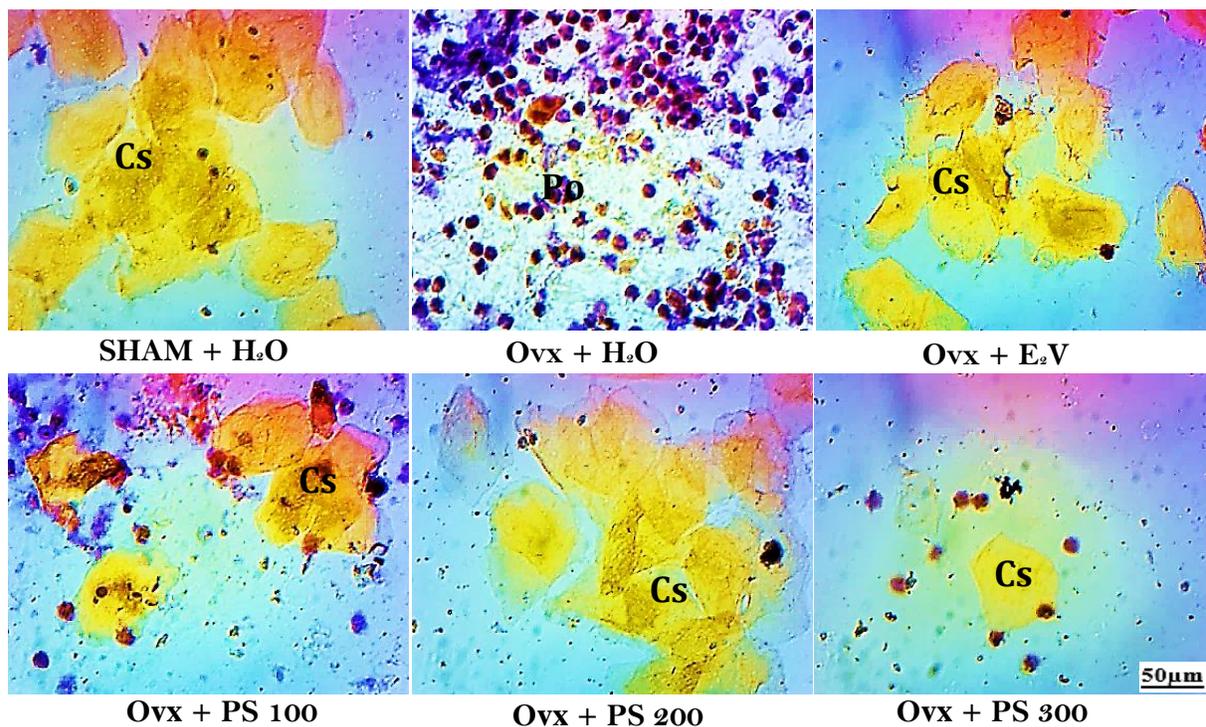


Figure 44: Photographies montrant l'effet du traitement à l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* pendant 28 jours sur la cytologie vaginale des rates, 84 jours post-ovariectomie suivis de 28 jours de traitement (100X, Papanicolaou).

SHAM + H₂O = Témoin *Sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant le véhicule. **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. **Ovx + PS 100**, **Ovx + PS 200**, **Ovx + PS 300**, = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* à la dose de 100, 200 et 300 mg/kg ; **Cs** = Cellule superficielle ; **CI** = Cellule intermédiaire ; **Po** = Polynucléaires.

III.1.5.1.2.2- Effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii* sur la structure et la taille de l'épithélium vaginal chez les rates ovariectomisées

La figure 45 présente les effets du traitement de 28 jours à l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur la structure (Figure 45A) et la taille de l'épithélium du vagin (Figure 45B) des rates ovariectomisées. Il en découle de ces figures que les rates ovariectomisées recevant de l'eau distillée présentent après 112 jours, un épithélium vaginal avec couche germinative compartiment aux rates "Sham-operated" qui présentent un épithélium présentant une couche germinative, une couche granuleuse et une couche cornée. Les rates Ovx traitées pendant 28 jours à l'extrait de *P. soyauxii* aux doses de 200 et de 300 mg/kg présentent un épithélium vaginal avec une couche germinative et granuleuse. L'ablation des ovaires a induit après 112 jours, une baisse significative ($p < 0,001$) de la taille de l'épithélium vaginal comparativement aux témoins Ovx. L'administration de l'extrait aqueux de *P. soyauxii* a inversé cette baisse en augmentant de manière

significative ($p < 0,001$) la taille de l'épithélium vaginal aux doses de 200 et de 300 mg/kg en comparaison animaux du lot Ovx recevant de l'eau distillée.

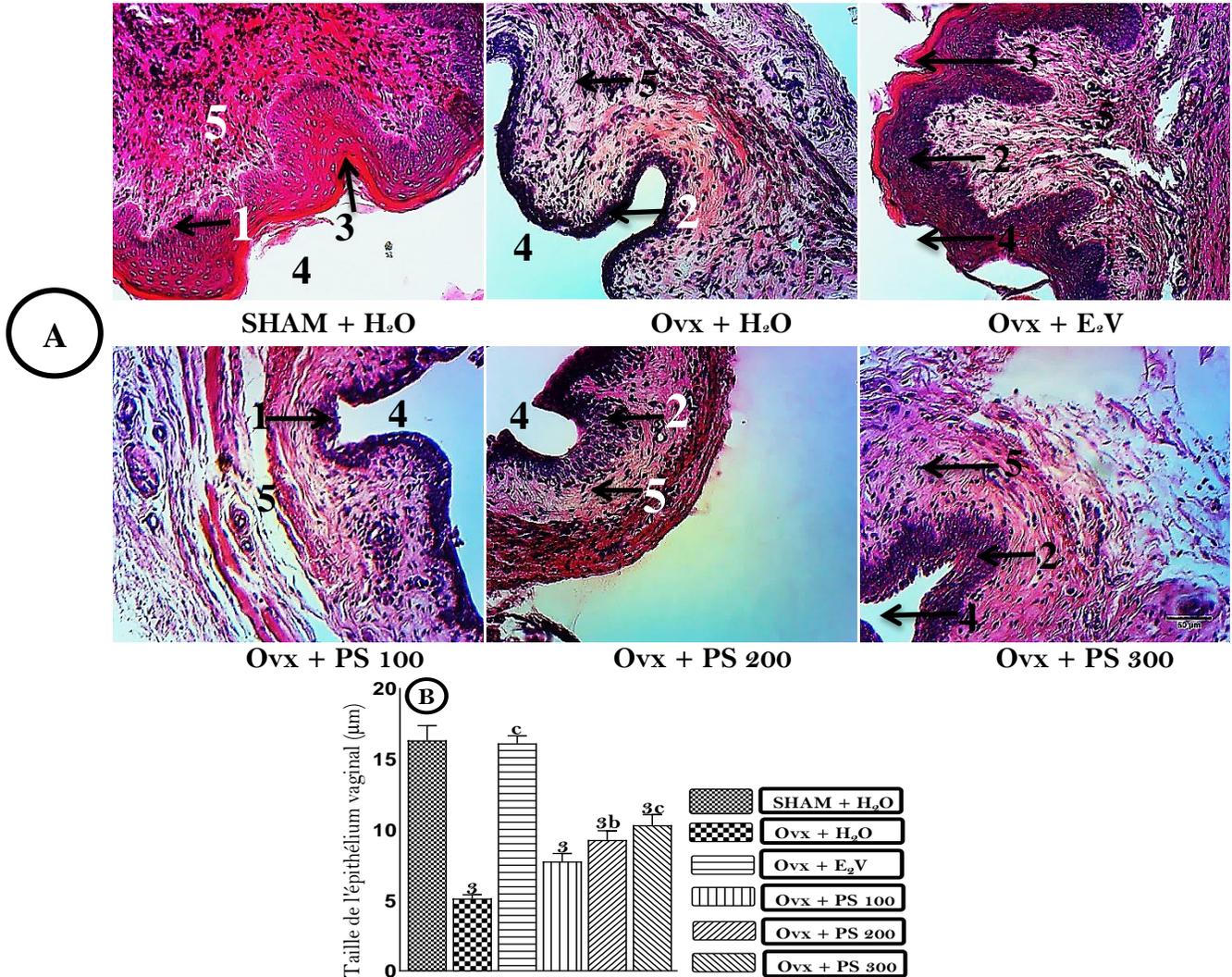


Figure 45: Effets du traitement de 28 jours à l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur la taille de l'épithélium vaginal, 84 jours post-ovariectomie suivis de 28 jours de traitement (H-E, 100X).

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM ; $n = 75$; ³ $p < 0,001$, différence significative par rapport au contrôle *Sham-operated* ; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin *Sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant le véhicule. **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. **Ovx + PS 100**, **Ovx + PS 200**, **Ovx + PS 300**, = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* à la dose de 100, 200 et 300 mg/kg. 1 = *Stratum germinativum* ; 2 = *Stratum granulosum*, 3 = *Stratum corneum*, 4 = Lumen, 5 = Chorion.

III.1.5.1.3- Effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii* sur la structure de la glande mammaire chez les rates ovariectomisées

La figure 46 présente les effets du traitement de 28 jours à l'extrait de *P. soyauxii* sur la structure de la glande mammaire des rates ovariectomisées. Il ressort de cette figure que comparativement aux animaux *Sham-operated*, l'ovariectomie a diminuée après 112 jours la taille des acinis mammaire et a supprimée les sécrétions éosinophiles dans ces acinis. Le traitement à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* aux doses de 100, 200 et de 300 mg/kg n'a pas augmenté la taille des acinis mammaires comparativement aux animaux du lot Ovx.

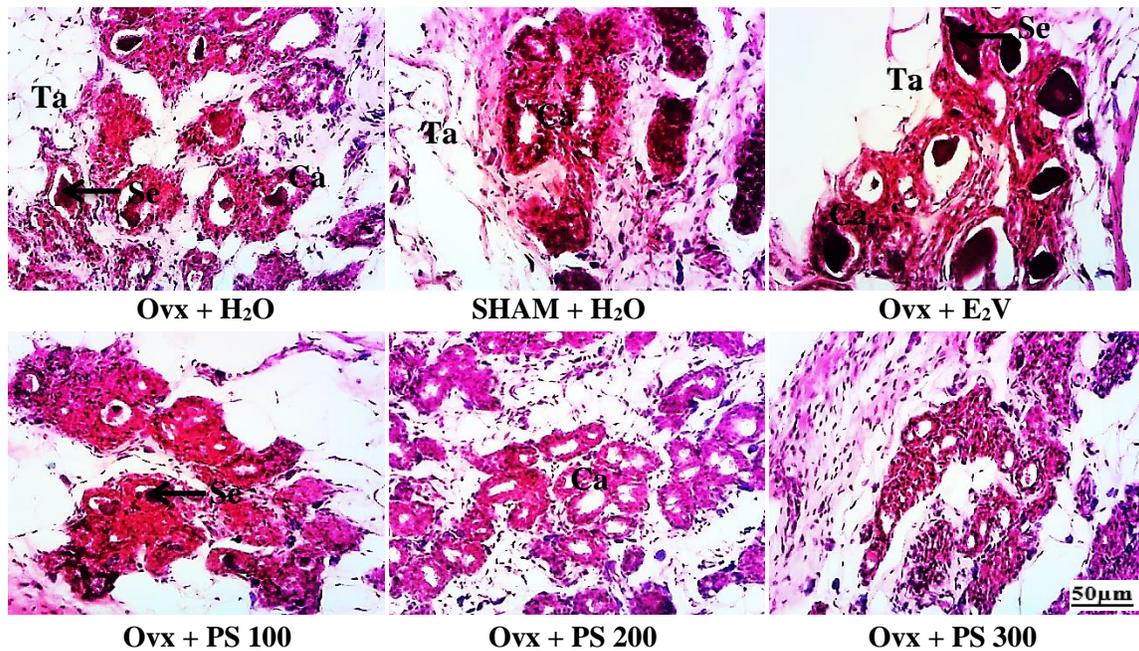


Figure 46: Photographies montrant les effets de *Pterocarpus soyauxii* pendant 28 jours sur la structure de la glande mammaire, 84 jours post-ovariectomie suivis de 28 jours de traitement (100X, H-E).

SHAM + H₂O = Témoin *Sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant le véhicule. **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. **Ovx + PS 100, Ovx + PS 200, Ovx + PS 300,** = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* à la dose de 100, 200 et 300 mg/kg; **Lu** = lumière acinaire ; **Ca** = couche cellulaire de l'acinus ; **Ta** = tissu adipeux ; **Se** = Sécrétion éosinophile.

III.1.5.2- Effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii* sur quelques facteurs de risque des maladies cardiovasculaires chez les rates ovariectomisées

III.1.5.2.1- Effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii* sur le gain pondéral et la masse relative de la graisse abdominale chez les rates ovariectomisées

Le tableau XXIX est une représentation des effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii* sur le gain pondéral et sur la masse relative de la graisse abdominale chez les rates Ovx, 84 jours après. Il ressort de ce tableau que l'ovariectomie a entraîné après 112 jours et comparativement aux animaux *Sham-operated*, une augmentation significative ($p < 0,01$, $p < 0,05$) de la masse corporelle aux jours 7, 14 et 21. Le traitement à l'extrait de plante aux doses de 200 et de 300 mg/kg a entraîné une diminution significative ($p < 0,05$) de ce gain pondéral comparativement aux animaux ovariectomisés recevant de l'eau distillée. L'ovariectomie a entraîné après 16 semaines, une augmentation significative ($p < 0,001$) de la masse relative des graisses abdominales. L'extrait aux doses de 200 et de 300 mg/kg de même que le valérate d'œstradiol a entraîné une diminution significative ($p < 0,001$) de cette masse relative de la graisse abdominale comparativement aux animaux ovariectomisés recevant de l'eau distillée.

Tableau XXIX: Effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii* sur le gain pondéral et sur la masse relative de la graisse abdominale après 28 jours de traitement chez les rates ovariectomisées, 84 jours postovariectomie.

Paramètres	Gain pondéral (%)					Graisse (%)
	J0	J7	J14	J21	J28	
SHAM + H₂O	0,00 ± 0,00	2,63 ± 0,33	5,76 ± 0,43	4,22 ± 0,24	2,58 ± 0,07	1,73 ± 0,20
Ovx + H₂O	0,00 ± 0,00	6,37 ± 0,73 ²	8,35 ± 0,44 ¹	5,72 ± 0,49 ¹	2,65 ± 0,55	2,96 ± 0,09 ³
Ovx + E₂V	0,00 ± 0,00	4,67 ± 0,49	5,58 ± 0,54 ^a	4,14 ± 0,54	2,14 ± 0,05	1,82 ± 0,05 ^c
Ovx + PS 100	0,00 ± 0,00	4,49 ± 0,33	6,70 ± 0,60	4,46 ± 0,55	2,18 ± 0,03	2,54 ± 0,13 ¹
Ovx + PS 200	0,00 ± 0,00	5,55 ± 0,98 ¹	6,56 ± 0,49	3,50 ± 0,52 ^a	2,35 ± 0,23	1,51 ± 0,19 ^c
Ovx + PS 300	0,00 ± 0,00	5,49 ± 0,72 ¹	5,71 ± 0,79 ^a	3,23 ± 0,33 ^a	2,27 ± 0,38	1,68 ± 0,16 ^c

Chaque barre représente la moyenne ± ESM ; n = 5 ; ¹p < 0,05 ; ²p < 0,01 ; ³p < 0,001, différence significative par rapport au témoin *sham-operated* ; ^ap < 0,05 ; ^cp < 0,001, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin *Sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant le véhicule. **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. **Ovx + PS 100, Ovx + PS 200, Ovx + PS 300,** = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* à la dose de 100, 200 et 300 mg/kg.

III.1.5.2.2- Effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii* sur la masse relative de l'aorte et le taux de protéines aortiques des rates ovariectomisées

La figure 47 est une représentation des effets de 28 jours de traitement à l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur la masse relative et le taux de protéines de l'aorte. Il ressort de la figure 47A que l'ovariectomie a entraîné après 112 jours, une augmentation significative ($p < 0,05$) de la masse relative de l'aorte comparativement aux animaux *sham-operated*. Le traitement à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* à la dose de 300 mg/kg pendant 28 jours a entraîné une diminution significative ($p < 0,001$) de la masse relative de l'aorte comparativement aux animaux ovariectomisés ayant reçu de l'eau distillée. En ce qui concerne les protéines aortiques (Figure 47B), l'ovariectomie a entraîné leur diminution significative ($p < 0,05$) 112 postovarietomie comparativement aux animaux *sham-operated*. L'administration de l'extrait de plante à la dose de 200 mg/kg a augmenté de manière significative ($p < 0,001$) le taux de ces protéines comparativement aux rates ovariectomisées ayant reçu de l'eau distillée. L'extrait à la dose de 300 mg/kg a également entraîné de façon significative ($p < 0,01$) et en comparaison aux animaux ovariectomisés ayant reçu de l'eau distillée une augmentation du taux de protéine dans l'aorte.

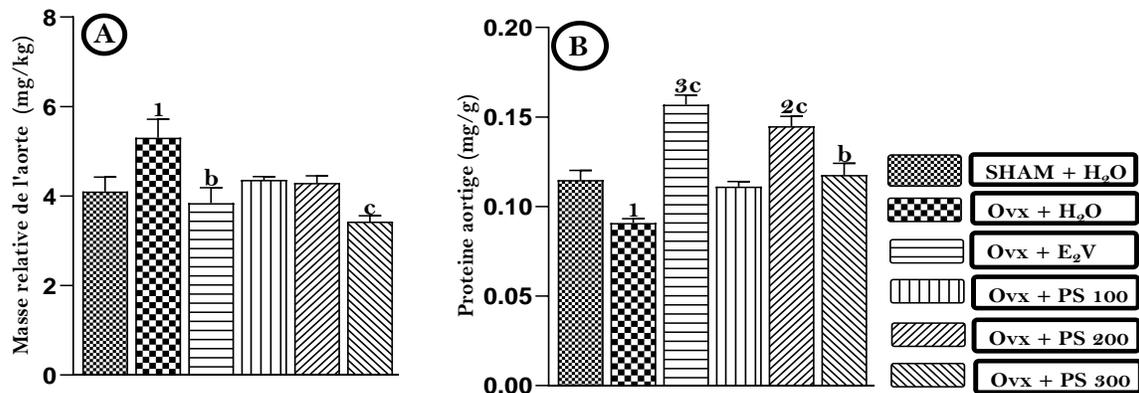


Figure 47: Effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii* sur la masse relative de l'aorte (A) et sur le taux de protéine dans l'aorte (B) chez les rates ovariectomisées traitées pendant 28 jours.

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM ; $n = 5$; ¹ $p < 0,05$; ² $p < 0,01$; ³ $p < 0,001$, différence significative par rapport au témoin *sham-operated* ; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin *Sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant le véhicule. **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. **Ovx + PS 100**, **Ovx + PS 200**, **Ovx + PS 300**, = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* à la dose de 100, 200 et 300 mg/kg.

III.1.5.2.4- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur la lipidémie des rates ovariectomisées

Le tableau XXX présente les effets du traitement des rates ovariectomisées au duramen de *P. soyauxii* pendant 28 jours sur quelques marqueurs du profil lipidique. Il ressort de ce tableau que l'ovariectomie 112 jours après a entraîné une augmentation significative ($p < 0,001$) des concentrations de cholestérol total (CT), de triglycérides (TG), de LDL-Cholestérol (LDL-C), de VLDL-Cholestérol (VLDL-C), de l'index athérogène et a induit une diminution significative ($p < 0,001$) du taux de HDL-Cholestérol (HDL-C) par rapport au groupe témoin *sham-operated*. Le traitement à l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* à la dose de 100 mg/kg a induit une diminution significative du taux de LDL-C de 45,53% ($p < 0,001$) par rapport au groupe témoin Ovx. *P. soyauxii* à la dose de 200 mg/kg a réduit de manière significative les taux de CT, de TG, de LDL-C, de VLDL-C et l'indice athérogène de 15,13% ($p < 0,01$), de 20,23% ($p < 0,001$), de 36,60% ($p < 0,001$), de 20,23% ($p < 0,001$) et de 32,32% ($p < 0,001$) respectivement et a augmenté le taux de de HDL-C de 34,54% ($p < 0,05$) par rapport au groupe témoin Ovx. A la dose de 300 mg/kg, l'extrait de *P. soyauxii* a diminué significativement les niveaux de TG, de LDL-C, de VLDL-C et l'index athérogène de 17,85% ($p < 0,001$), de 46,42% ($p < 0,001$), de 17,85% ($p < 0,001$) et de 34,44% ($p < 0,001$) respectivement et a augmenté significativement les niveaux de HDL-C de 34,54 % ($p < 0,05$) par rapport au groupe contrôle Ovx.

Tableau XXX: Effets de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur la lipidémie des rates ovariectomisées

Groups	SHAM + H ₂ O	O _{VX} + H ₂ O	O _{VX} + E ₂ V	O _{VX} + PS 100	O _{VX} + PS 200	O _{VX} + PS 300
Paramètres						
CT (mmol/L)	1,43 ± 0,03	1,85 ± 0,03 ³	1,56 ± 0,05 ^c	1,80 ± 0,03 ³	1,57 ± 0,01 ^b	1,69 ± 0,02
HDL-C (mmol/L)	0,97 ± 0,02	0,55 ± 0,01 ³	0,78 ± 0,04 ^{1b}	0,54 ± 0,02 ³	0,74 ± 0,02 ^{2a}	0,74 ± 0,01 ^{2a}
LDL-C (mmol/L)	0,32 ± 0,05	1,12 ± 0,02 ³	0,56 ± 0,07 ^c	0,61 ± 0,06 ^c	0,71 ± 0,03 ^{3c}	0,60 ± 0,06 ^c
TG (mmol/L)	0,63 ± 0,02	0,84 ± 0,00 ³	0,68 ± 0,02 ^b	0,73 ± 0,03	0,67 ± 0,00 ^b	0,69 ± 0,01 ^b
VLDL-C (mmol/L)	0,12 ± 0,00	0,16 ± 0,00 ³	0,12 ± 0,03 ^c	0,14 ± 0,00	0,13 ± 0,00 ^b	0,14 ± 0,00 ^c
IA	1,45 ± 0,05	3,31 ± 0,05 ³	2,20 ± 0,12 ^{3c}	3,44 ± 0,06	2,24 ± 0,08 ^c	2,17 ± 0,13 ^{3c}

Chaque valeur représente la moyenne ± ESM ; n = 5 ; ¹p < 0,05 ; ²p < 0,01 ; ³p < 0,001, différence significative par rapport au témoin *Sham-operated* ; ^ap < 0,05 ; ^bp < 0,01 ; ^cp < 0,001, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin *Sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **O_{VX} + H₂O** = Témoin négatif recevant le véhicule. **O_{VX} + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. **O_{VX} + PS 100**, **O_{VX} + PS 200**, **O_{VX} + PS 300**, = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* à la dose de 100, 200 et 300 mg/kg. **IA** = Index athérogénique, **CT** = Cholestérol total, **TG** = Triglycérides, **LDL-C** = "Low density lipoprotein-cholesterol", **HDL-C** = "High density lipoprotein-cholesterol", **VLDL-C** = "Very low lipoprotein cholesterol", **P.S** = *P. soyauxii*.

III.1.5.2.5- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur quelques paramètres du statut oxydant dans l'aorte des rates ovariectomisées

La figure 48 est une représentation des effets de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur quelques paramètres du statut oxydant dans l'aorte des rates. Il ressort de la figure 48A que l'ovariectomie a entraîné après 112 jours, une augmentation significative ($p < 0,001$) du taux de MDA dans l'aorte comparativement aux animaux *sham-operated*. Le traitement à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* aux doses de 200 et de 300 mg/kg a entraîné une diminution significative de taux de MDA comparativement aux animaux ovariectomisés ayant reçu de l'eau distillée respectivement de ($p < 0,01$) et ($p < 0,05$).

Concernant la figure 48B, l'ovariectomie a entraîné une diminution significative ($p < 0,001$) du taux de GSH dans l'aorte comparativement aux animaux *Sham-operated*. Le traitement à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* aux doses de 200 et de 300 mg/kg a entraîné une augmentation significative du taux de GSH comparativement aux animaux ovariectomisés ayant reçu de l'eau distillée respectivement de ($p < 0,01$) et ($p < 0,05$).

S'agissant de la figure 48C, il a été noté une diminution significative ($p < 0,001$) du taux de nitrites dans l'aorte des animaux ayant subi une ablation chirurgicale des ovaires et ayant reçu de l'eau distillée comparativement aux animaux *sham-operated*. Le traitement à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* aux doses de 100, de 200 et de 300 mg/kg a entraîné une augmentation significative ($p < 0,05$, $p < 0,001$ respectivement) de ce taux de nitrites comparativement aux animaux ovariectomisés ayant reçu de l'eau distillée.

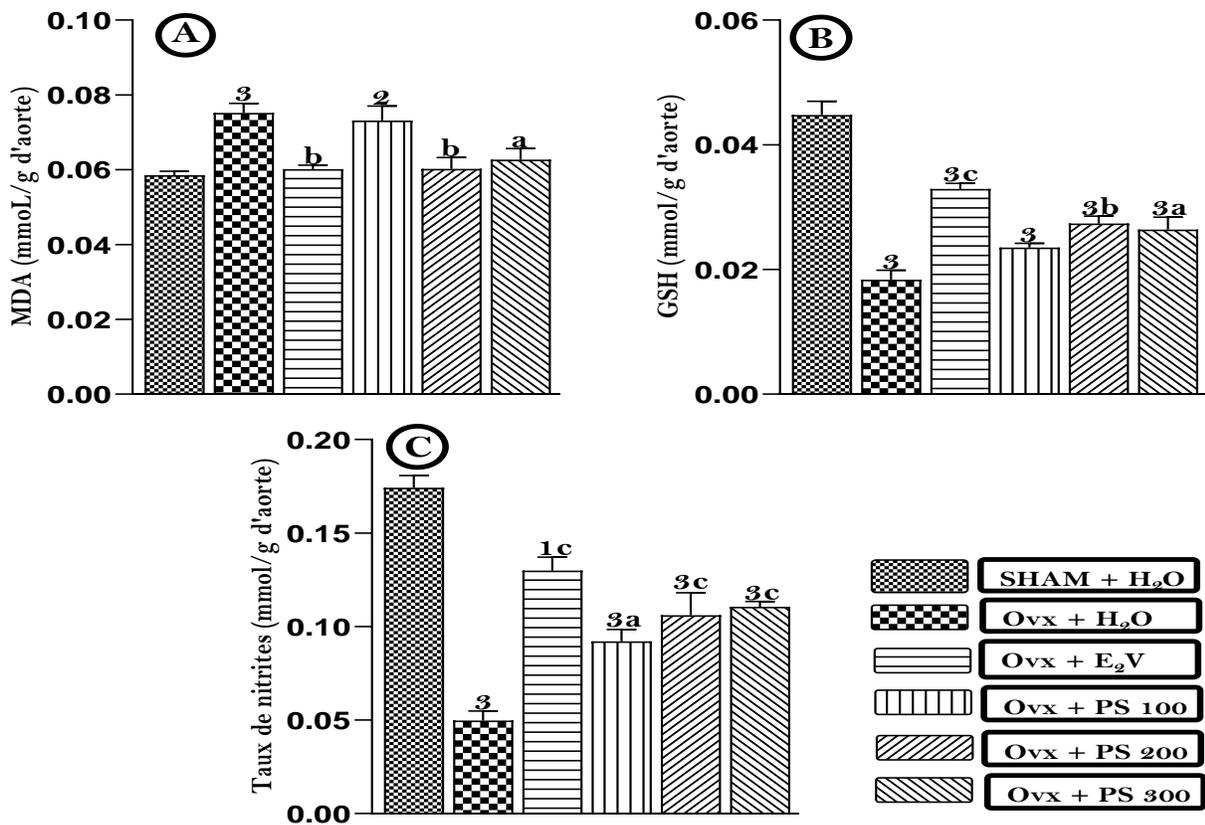


Figure 48: Effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii* sur le taux de MDA (A), de GSH (B) et de nitrites dans l'aorte (C) chez les rates ménopausées et traitées pendant 28 jours.

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM ; $n = 5$; $^1p < 0,05$; $^2p < 0,01$; $^3p < 0,001$, différence significative par rapport au témoin *Sham-operated* ; $^ap < 0,05$; $^bp < 0,01$; $^cp < 0,001$, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin *Sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **OvX + H₂O** = Témoin négatif recevant le véhicule. **OvX + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. **OvX + PS 100**, **OvX + PS 200**, **OvX + PS 300**, = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* à la dose de 100, 200 et 300 mg/kg.

III.1.5.2.6- Effets de l'extrait aqueux de *P. soyauxii* sur la structure de l'aorte des rates ovariectomisées

La figure 49 présente les effets du traitement de 28 jours à l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* aux doses de 100, 200 et de 300 mg/kg 84 jours après l'ovariectomie sur la structure de l'aorte (Figure 49A) et le rapport intima sur média. Il ressort de la figure 49A que les coupes histologiques de l'aorte des animaux ovariectomisés et ayant reçu de l'eau distillée présentent un épaissement de la média. Cette taille de la media aortique a réduit chez les animaux OvX traités à l'extrait de *P. soyauxii* aux différentes doses après 28 jours.

Sur la figure 49B, on note une augmentation significative ($p < 0,001$) du rapport intima/média chez les animaux Ovx comparativement aux animaux *Sham-operated*. L'extrait de plante aux doses de 100, 200 et de 300 mg/kg a réduit significativement ($p < 0,01$) ce rapport comparativement aux animaux Ovx ayant reçu de l'eau distillée.

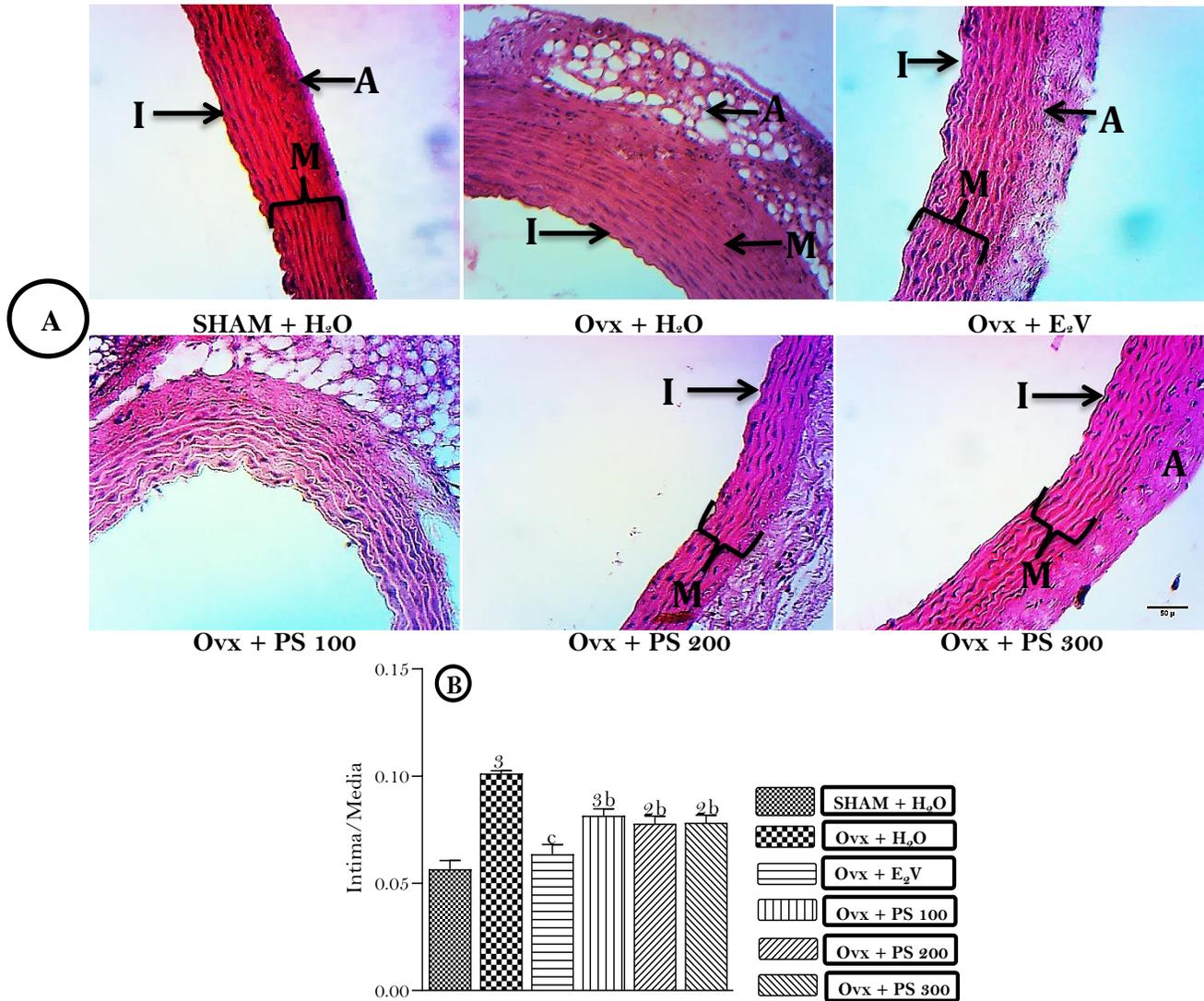


Figure 49: Effets du traitement de 28 jours au duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur la structure de l'aorte (A) et le rapport intima/média (B), 84 jours postovariectomie suivi du traitement de 28 jours (100X, H-E).

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM ; $n = 5$; $^2p < 0,01$; $^3p < 0,001$, différence significative par rapport au témoin *sham-operated* ; $^b p < 0,01$; $^c p < 0,001$, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin *Sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant le véhicule. **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. **Ovx + PS 100, Ovx + PS 200, Ovx + PS 300**, = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* à la dose de 100, 200 et 300 mg/kg. **I** = Intima, **M** = Media, **A** = Adventice.

III.1.5.3- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur quelques troubles nerveux chez les rates ovariectomisées

III.1.5.3.1- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur les troubles comportementaux provoqués par l'ovariectomie

III.1.5.3.1.1- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur l'anxiété provoquée par l'ovariectomie

La figure 50 illustre les effets du traitement de 28 jours à l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur l'état d'anxiété lié à l'ovariectomie après 84 jours et évalué par le test d'alimentation supprimée par la nouveauté.

Il en ressort que, l'ovariectomie, comparativement aux rates *sham-operated* et après 112 jours a entraîné une augmentation significative ($p < 0,001$) du temps de latence à mordre manifestement l'aliment dans l'environnement aversif. L'administration de l'extrait de plante pendant 28 jours à la dose de 100 mg/kg a réduit de manière significative ($p < 0,01$) ce temps de latence comparativement aux animaux Ovx recevant de l'eau distillée. L'extrait aux doses de 200 et de 300 mg/kg, a entraîné une diminution significative ($p < 0,001$) de ce temps de latence en comparaison aux animaux Ovx recevant de l'eau distillée.

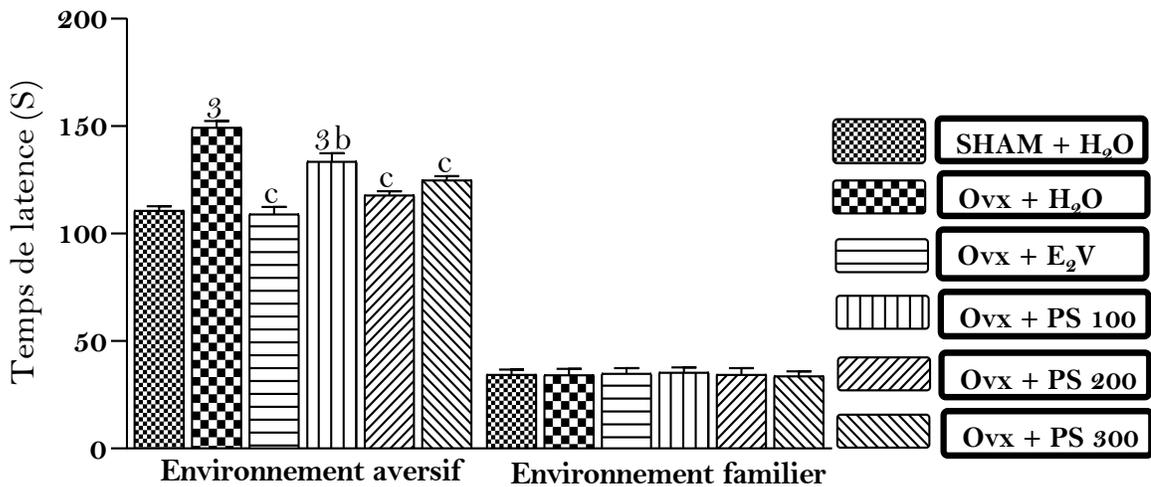


Figure 50: Effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii* sur le temps de latence à mordre la nourriture dans l'environnement aversif et familier au cours du test d'alimentation supprimée par la nouveauté après 28 jours de traitement chez les rates ovariectomisées.

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM ; $n = 5$; $^3p < 0,001$, différence significative par rapport au contrôle *Sham-operated* ; $^b p < 0,01$; $^c p < 0,001$, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin *Sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant le véhicule. **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. **Ovx + PS 100**, **Ovx + PS 200**, **Ovx + PS 300**, = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* à la dose de 100, 200 et 300 mg/kg.

III.1.5.3.1.2- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur la dépression provoquée l'ovariectomie

La figure 51 illustre les effets du traitement à l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* pendant 28 jours sur l'état dépressif des rates ovariectomisées au cours du test de la nage forcée.

Il en ressort que chez les rates ovariectomisées comparativement aux animaux *sham-operated*, il a été enregistré une augmentation significative ($p < 0,001$) du temps d'immobilité et une diminution significative du temps de nage et d'escalade ($p < 0,01$) 112 jours postovariectomie. L'administration de l'extrait de plante à la dose de 200 mg/kg a réduit de manière significative ($p < 0,001$) le temps d'immobilité et a augmenté significativement le temps de nage ($p < 0,05$) et d'escalade ($p < 0,001$) comparativement aux animaux Ovx recevant de l'eau distillée. L'extrait à la dose de 300 mg/kg a entraîné une diminution significative ($p < 0,001$) du temps d'immobilité et une augmentation significative du temps de nage ($p < 0,05$) et d'escalade ($p < 0,01$) en comparaison aux animaux Ovx recevant de l'eau distillée.

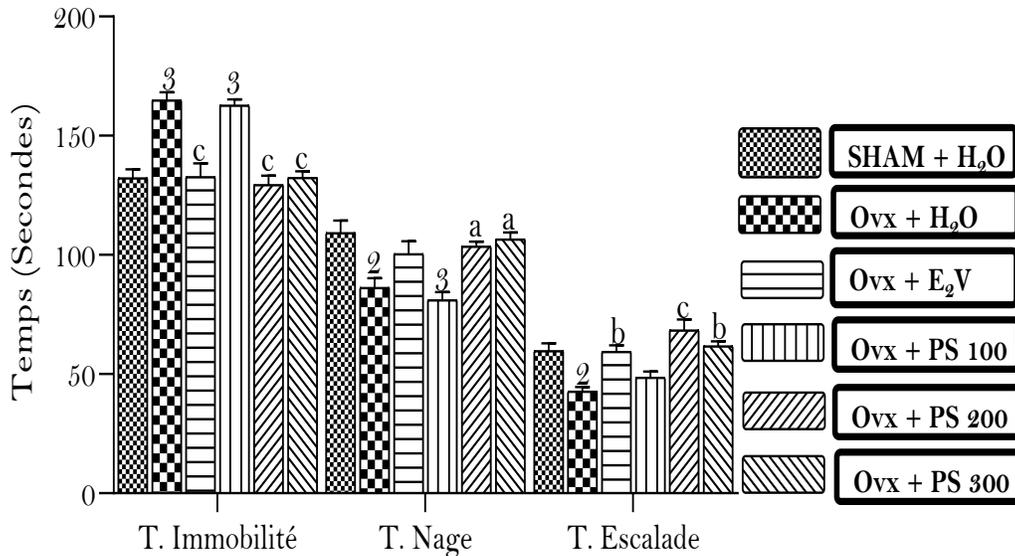


Figure 51: Effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii* sur le temps d'immobilité, de nage et d'escalade au cours du test de la nage forcée après un traitement de 28 jours chez les rates ovariectomisées.

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM ; $n = 5$; ² $p < 0,01$; ³ $p < 0,001$, différence significative par rapport au témoin *Sham-operated* ; ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin *Sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant le véhicule. **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. **Ovx + PS 100**, **Ovx + PS 200**, **Ovx + PS 300**, = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* à la dose de 100, 200 et 300 mg/kg.

III.1.5.3.1.3- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur les troubles de la mémoire épisodique provoqués par l'ovariectomie

La figure 52 présente les effets du traitement à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* sur le temps passé dans le cadran cible qui abritait la plateforme au cours du test du labyrinthe aquatique de Morris.

Il ressort de cette figure que le temps passé dans le cadran cible a été significativement réduit de 29,16% ($p < 0,01$) chez les animaux ovariectomisés ayant reçu de l'eau distillée après 112 jours par rapport aux animaux *Sham-operated*. L'extrait de plante aux doses de 200 et de 300 mg/kg a entraîné une augmentation significative de ce temps ($p < 0,01$) en comparaison aux rates ovariectomisées recevant de l'eau distillée respectivement de 43,97% et de 47,66%.

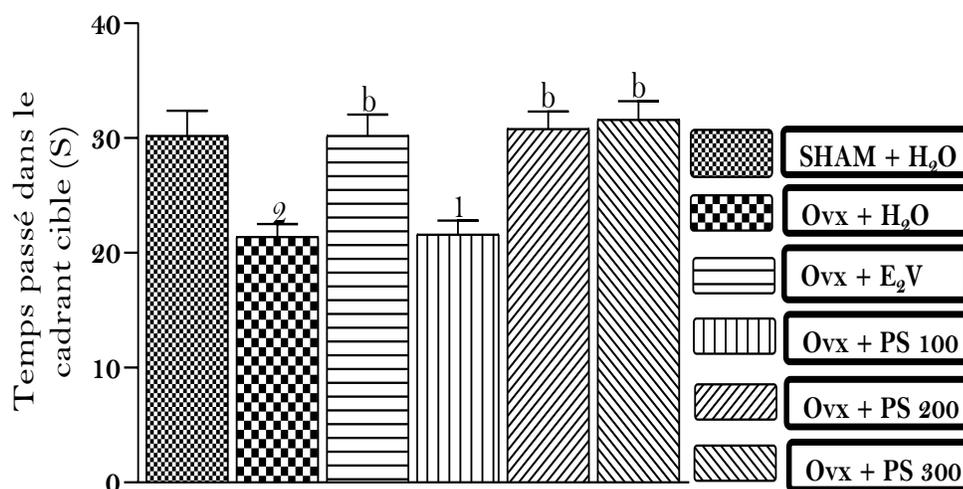


Figure 52: Effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii* sur le temps passé dans le cadran cible au cours du test du labyrinthe aquatique de Morris après 28 jours de traitement chez les rates ovariectomisées.

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM ; n = 5 ; ¹p < 0,05 ; ²p < 0,01, différence significative par rapport au témoin *Sham-operated* ; ^bp < 0,01, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin *Sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant le véhicule. **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. **Ovx + PS 100**, **Ovx + PS 200**, **Ovx + PS 300**, = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* à la dose de 100, 200 et 300 mg/kg.

III.1.5.3.1.4- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur les troubles de la mémoire à long-terme provoqués par l'ovariectomie

La figure 53 présente les effets du traitement à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* sur le temps d'exploration de l'objet familier (A), du nouvel objet (B) et l'index de reconnaissance (C) au cours du test de reconnaissance du nouvel objet. Il ressort de la figure 53A que le temps passé à explorer l'objet familier a significativement augmenté (p < 0,001) chez les animaux ovariectomisés ayant reçu de l'eau distillée après 112 jours par rapport aux témoins *Sham-operated*.

Sur les figures 53B et 53C, il a été noté après 112 jours, une diminution significative (p < 0,001) du temps passé à explorer le nouvel objet et de l'index de reconnaissance du nouvel objet chez les animaux ovariectomisés comparativement aux animaux *Sham-operated*. L'extrait de plante à la dose de 200 mg/kg a entraîné une augmentation significative (p < 0,05) de ce temps d'exploration ainsi que de l'index de reconnaissance du nouvel objet en comparaison aux animaux ovariectomisés traités à l'eau distillée. A la dose de 300 mg/kg, il a été observé une augmentation significative du

temps d'exploration ainsi que de l'index de reconnaissance du nouvel objet en comparaison animaux ovariectomisés traités à l'eau distillée ($p < 0,01$).

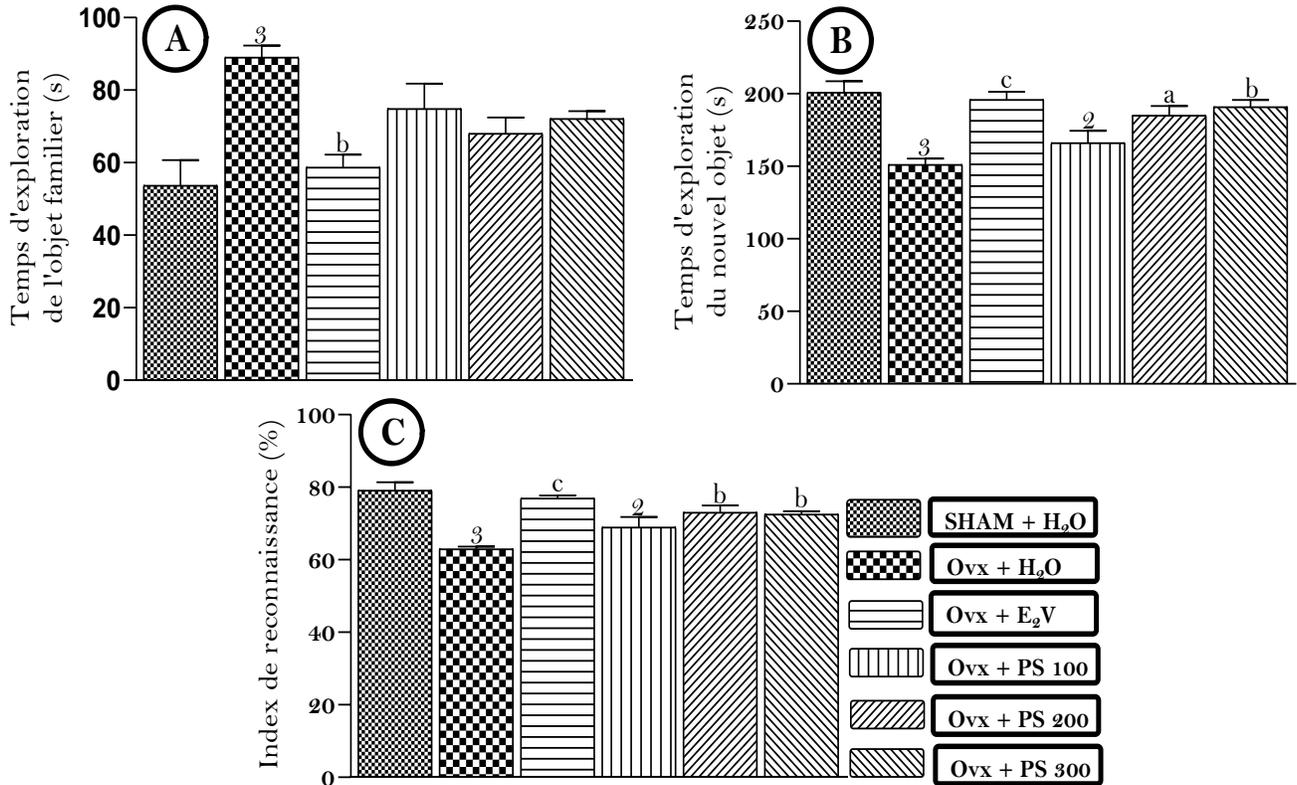


Figure 53: Effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii* sur le temps d'exploration de l'objet familier (A), du nouvel objet (B) et l'index de reconnaissance au cours du test de reconnaissance du nouvel objet (C) après 28 jours de traitement chez les rates ovariectomisées.

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM ; $n = 5$; ² $p < 0,01$; ³ $p < 0,001$, différence significative par rapport au témoin *Sham-operated* ; ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin *Sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant le véhicule. **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. **Ovx + PS 100**, **Ovx + PS 200**, **Ovx + PS 300**, = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* à la dose de 100, 200 et 300 mg/kg.

III.1.5.3.2- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur quelques paramètres biochimiques cérébraux chez les rates ovariectomisées

III.1.5.3.2.1- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur le taux de protéines cérébrales chez les rates ovariectomisées

La figure 54 présente les effets du traitement à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* sur le taux de protéines cérébrales. Il ressort de cette figure que l'ovariectomie après 112 jours a entraîné une diminution significative de 23,92% ($p < 0,05$) du taux de protéines cérébrales comparativement aux animaux *sham-operated*.

L'extrait de plante aux doses de 200 et de 300 mg/kg a augmenté de façon significative de 44,97% ($p < 0,001$) et de 34,87% ($p < 0,01$) respectivement cette baisse du taux de protéines en comparaison animaux ovariectomisés recevant de l'eau distillée.

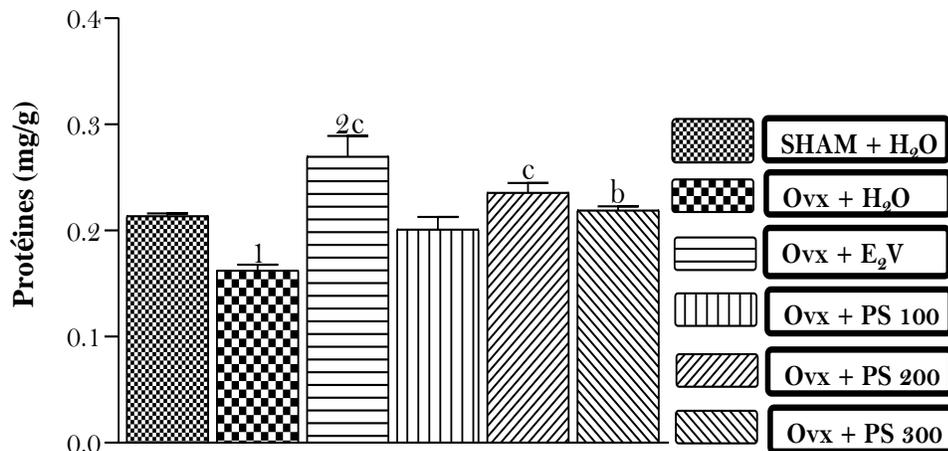


Figure 54: Effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii* sur le taux de protéines cérébrales, 84 jours postovariectomie suivi du traitement de 28 jours.

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM ; $n = 5$; ¹ $p < 0,05$; ² $p < 0,01$, différence significative par rapport au contrôle *Sham-operated* ; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin *Sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant le véhicule. **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. **Ovx + PS 100**, **Ovx + PS 200**, **Ovx + PS 300**, = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* à la dose de 100, 200 et 300 mg/kg.

III.1.5.3.2.2- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur le taux de calcium et de magnésium cérébral chez les rates ovariectomisées

La figure 55 est une représentation des effets de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur la concentration cérébrale en calcium et en magnésium.

Il ressort de la figure 55A que l'ovariectomie après 112 jours a entraîné une augmentation significative ($p < 0,01$) de 16,86% de la concentration cérébrale de calcium comparativement aux animaux *Sham-operated*. Le traitement à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* à la dose de 200 mg/kg a entraîné une diminution significative de 10,52% ($p < 0,05$) de la concentration de calcium comparativement aux animaux ovariectomisés ayant reçu de l'eau distillée. La figure 55B montre que l'ovariectomie a entraîné une diminution significative ($p < 0,01$) de 11,47 % du taux de magnésium cérébral comparativement aux animaux *Sham-operated*. L'administration de l'extrait de plante à la dose de 200 mg/kg a augmenté de manière significative de 11,16% ($p < 0,01$) ce taux de magnésium comparativement aux animaux ovariectomisés ayant reçu de l'eau distillée. Le traitement au valérate d'œstradiol à la dose de 1 mg/kg a réduit de manière significative de 12,44% ($p < 0,01$) le taux de calcium cérébral et augmenté significativement de 17,74% ($p < 0,001$) celui du magnésium en comparaison aux animaux ovariectomisés ayant reçu de l'eau distillée.

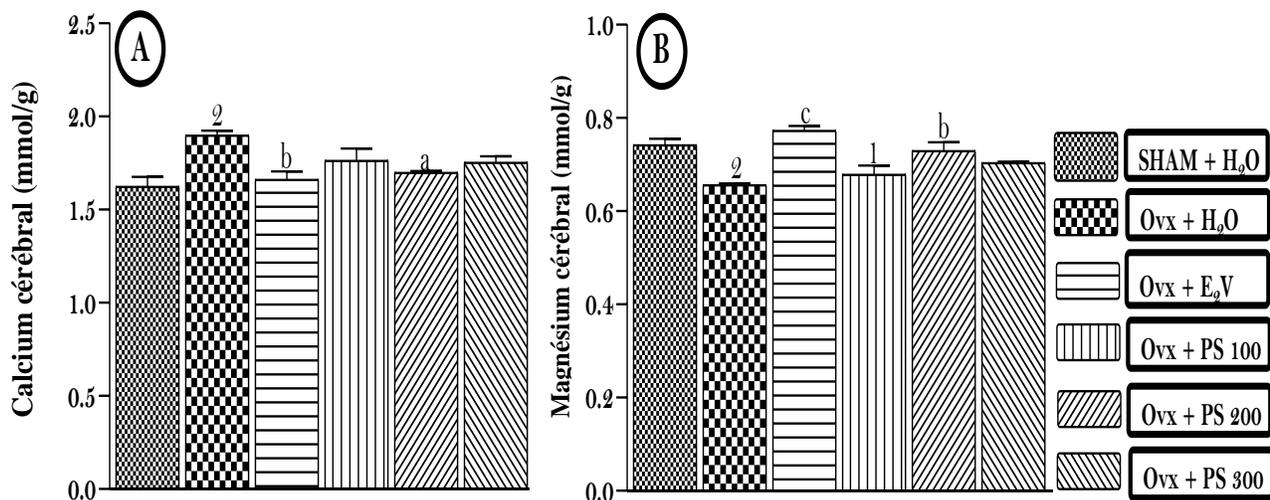


Figure 55: Effets du traitement de 28 jours à l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii* sur le taux de calcium (A) et de magnésium (B) cérébral, 84 jours postovariectomie suivi du traitement de 28 jours.

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM ; $n = 5$; ¹ $p < 0,05$; ² $p < 0,01$, différence significative par rapport au contrôle *Sham-operated* ; ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin *Sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant le véhicule. **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. **Ovx + PS 100**, **Ovx + PS 200**, **Ovx + PS 300**, = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* à la dose de 100, 200 et 300 mg/kg.

III.1.5.3.2.3- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur le taux hippocampique du GABA et de GABA-transaminase chez les rates ovariectomisées

La figure 56 illustre les effets de *P. soyauxii* sur le taux de GABA-transaminase (GABA-T) (Figure 56A) et de GABA (Figure 56B) dans l'hippocampe. L'ovariectomie, 112 jours après a entraîné une augmentation significative ($p < 0,01$) de l'activité de la GABA-T et une baisse significative du taux de GABA ($p < 0,001$) respectivement de 60,34 % et de 22,07% comparativement aux animaux *Sham-operated*. *P. soyauxii* aux doses de 200 et de 300 mg/kg a diminué de manière significative ($p < 0,001$) le taux de GABA-T en comparaison aux rats Ovx respectivement de 29,39% et de 28,28%.

L'extrait de plante a également augmenté le taux de GABA de manière significative aux doses de 200 et de 300 mg/kg respectivement de 23,37% ($p < 0,01$) et de 19,55% ($p < 0,05$) en comparaison aux animaux Ovx recevant de l'eau distillée.

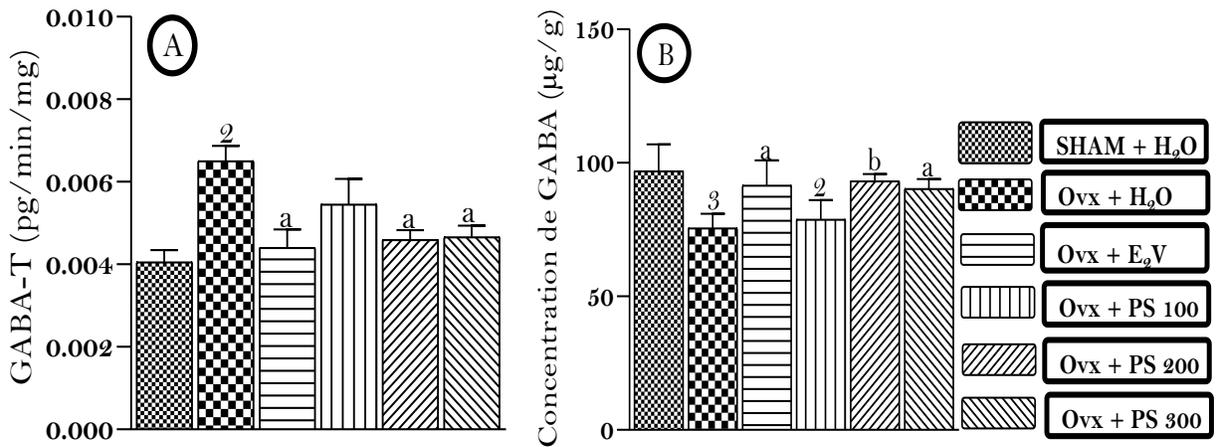


Figure 56: Effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii* sur le taux de GABA-T (A) et de GABA (B) au niveau de l'hippocampe chez les rates ménopausées après un traitement de 28 jours.

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM ; $n = 5$; ² $p < 0,01$; ³ $p < 0,001$, différence significative par rapport au contrôle *Sham-operated* ; ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin *Sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **OVX + H₂O** = Témoin négatif recevant le véhicule. **OVX + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. **OVX + PS 100**, **OVX + PS 200**, **OVX + PS 300** = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* à la dose de 100, 200 et 300 mg/kg.

III.1.5.3.2.4- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur le taux hippocampique de sérotonine chez les rates ovariectomisées

La figure 57 illustre les effets de *P. soyauxii* sur le taux de sérotonine dans l'hippocampe. L'ovariectomie a entraîné une diminution significative du taux de sérotonine de 27,91% ($p < 0,001$) comparativement aux animaux *Sham-operated*. L'extrait aux doses de 200 mg/kg au même titre que le valérate d'oestradiol a augmenté de manière significative ($p < 0,05$) le taux de sérotonine en comparaison aux rats Ovx respectivement de 27,40% et de 26,96%.

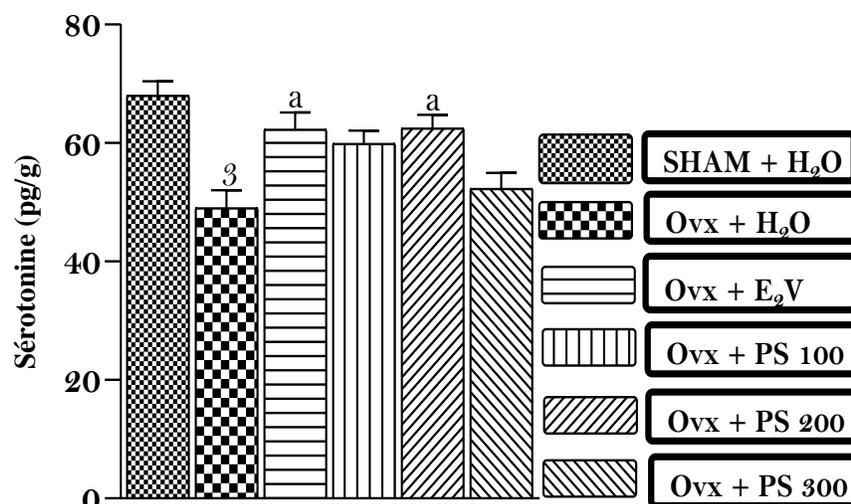


Figure 57: Effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii* sur le taux sérotonine au niveau de l'hippocampe, 84 jours postovariectomie suivi de 28 jours de traitement.

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM ; $n = 5$, $^3p < 0,001$, différence significative par rapport au contrôle *Sham-operated* ; $^ap < 0,05$, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin *Sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **OvX + H₂O** = Témoin négatif recevant le véhicule. **OvX + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. **OvX + PS 100**, **OvX + PS 200**, **OvX + PS 300** = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* à la dose de 100, 200 et 300 mg/kg.

III.1.5.3.3- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur quelques paramètres du statut oxydant cérébral chez les rates ménopausées

La figure 58 présente les effets de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur quelques paramètres du statut oxydant dans le cerveau.

Il ressort de la figure 58A que l'ovariectomie a entraîné 112 jours après une diminution significative de 29,01% ($p < 0,001$) du taux de GSH dans le cerveau comparativement aux animaux *Sham-operated*. Le traitement à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* aux doses de 200 et de 300 mg/kg a entraîné une augmentation significative de taux de GSH comparativement aux animaux ovariectomisés ayant reçu de l'eau distillée respectivement de 41,42% ($p < 0,001$) et de 25,97% ($p < 0,05$).

La figure 58B montre que l'ovariectomie a entraîné une diminution significative de 38,01% ($p < 0,05$) du taux de nitrites dans le cerveau comparativement aux animaux *Sham-operated*. Le traitement à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* aux doses de 100, 200 et de 300 mg/kg a entraîné une augmentation significative de ce taux de nitrites comparativement aux animaux ovariectomisés

ayant reçu de l'eau distillée respectivement de 74,21% ($p < 0,05$), de 85,20% ($p < 0,01$) et 63,02% ($p < 0,05$).

S'agissant de la figure 58C, il a été noté une augmentation significative de 34,30% ($p < 0,001$) du taux de MDA dans le cerveau comparativement aux animaux *Sham-operated*. Le traitement à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* aux doses de 200 et de 300 mg/kg a entraîné une diminution significative ($p < 0,01$, $p < 0,001$ respectivement) du taux de MDA comparativement aux animaux ovariectomisés ayant reçu de l'eau distillée.

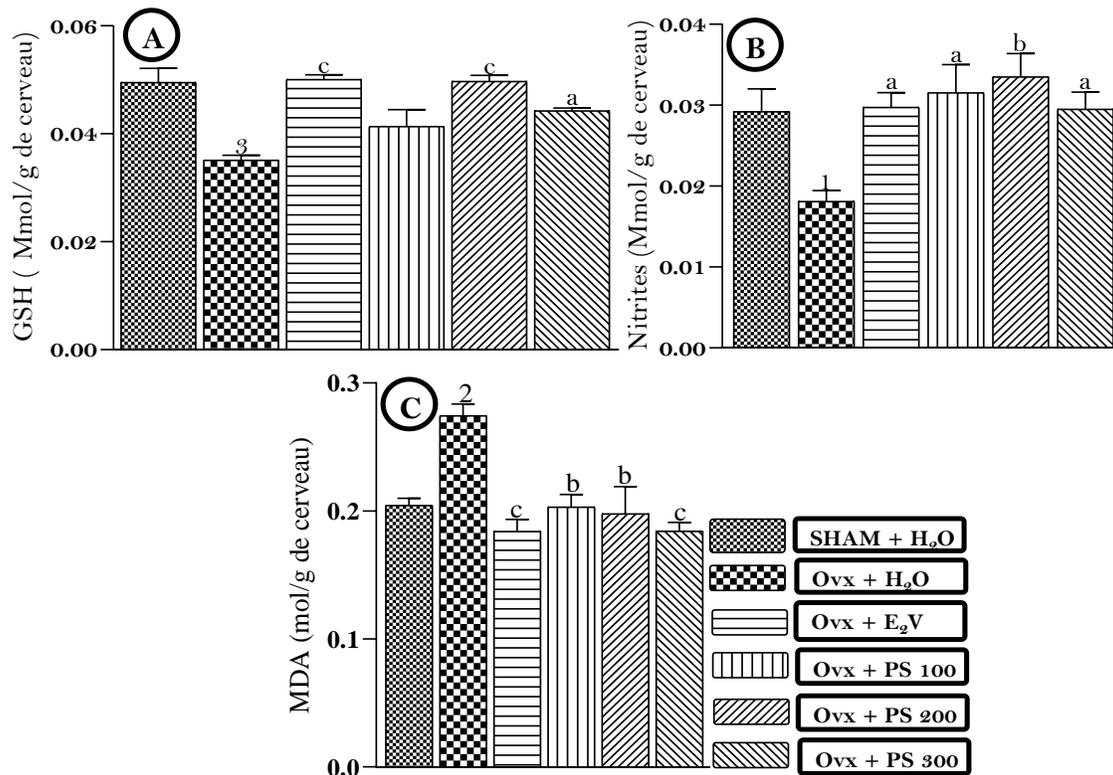


Figure 58: Effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii* sur le taux de glutathion réduit (A), de nitrites (B) et de MDA (C) au niveau du cerveau après 28 jours de traitement chez les rates ovariectomisées.

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM ; $n = 5$; $^2p < 0,01$; $^3p < 0,001$, différence significative par rapport au contrôle *Sham-operated* ; $^ap < 0,05$; $^bp < 0,01$; $^cp < 0,001$, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin *Sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **OvX + H₂O** = Témoin négatif recevant le véhicule. **OvX + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. **OvX + PS 100**, **OvX + PS 200**, **OvX + PS 300** = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* à la dose de 100, 200 et 300 mg/kg.

III.1.5.3.4- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur la structure de l'hippocampe et du cortex chez les rates ovariectomisées

La figure 59 présente les effets du traitement de 28 jours à l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur la structure de l'hippocampe et du cortex cérébral. Il ressort de cette figure que l'ovariectomie a entraînée après 112 jours comparativement aux *Sham-operated* une dispersion des neurones hippocampiques de la région CA1. Dans la région CA3, l'ovariectomie a entraîné une dégénérescence des neurones, la formation des noyaux hyperchromatiques avec une légère chromatolyse et une vacuolisation des neurocytes. L'ablation chirurgicale des ovaires a également entraîné au niveau du gyrus denté une dégénérescence des neurones granulaires et la formation des noyaux hyperchromatiques sans chromatolyse au niveau du cortex.

L'extrait de plante aux doses de 200 et de 300 mg/kg ainsi que le valérate d'œstradiol a corrigé ces altérations en réduisant la dispersion des neurones au niveau CA1 et en empêchant la vacuolisation neurocytaire et la formation des noyaux hyperchromatiques au niveau de la région CA3 comparativement aux animaux Ovx recevant de l'eau distillée. L'extrait a par ailleurs prévenu la dégénérescence des neurones de la couche granulaire de l'hippocampe et l'apparition des noyaux hyperchromatiques au niveau du cortex.

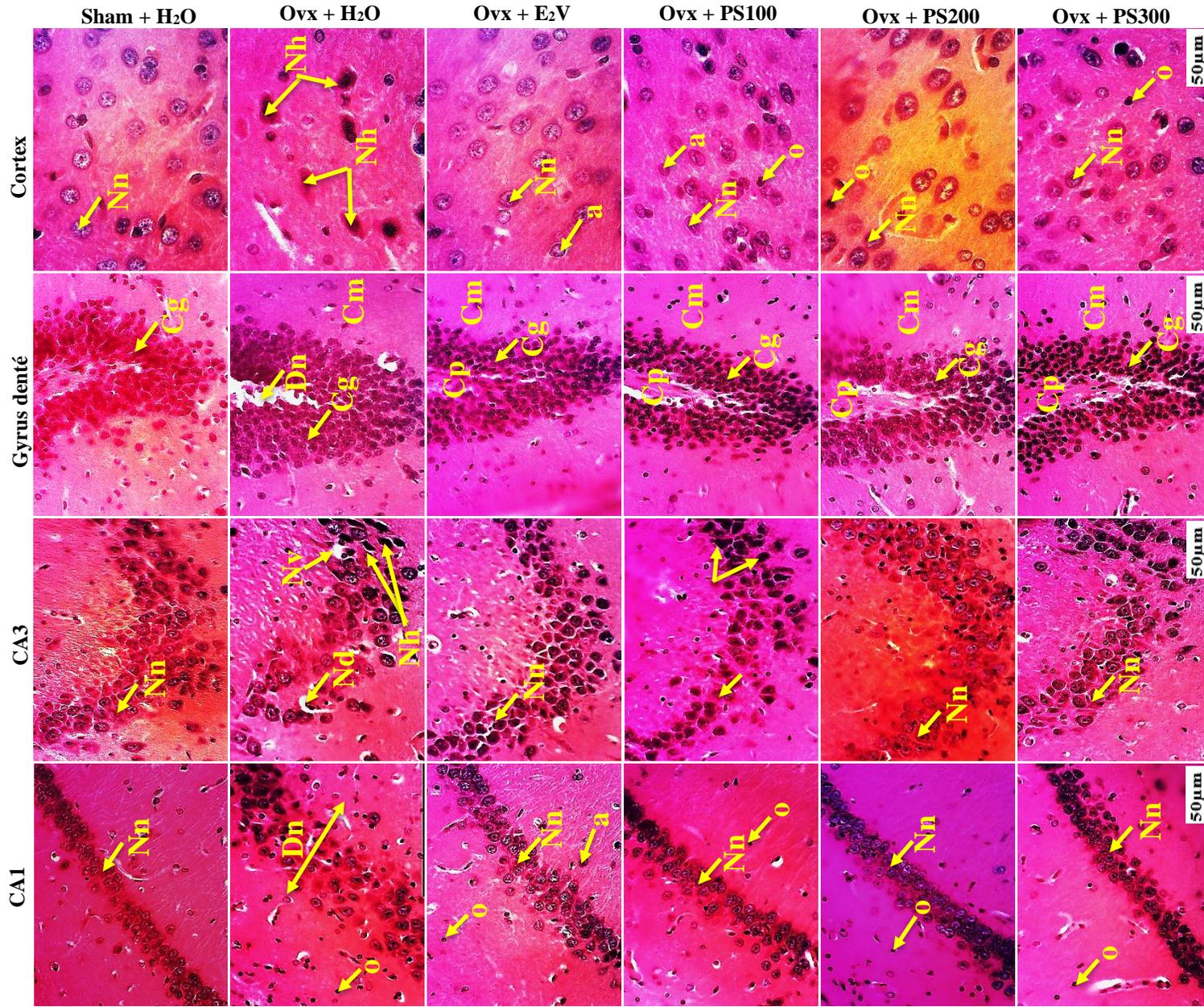


Figure 59: Photographies des régions hippocampiques (200X, H-E) et du cortex cérébral (400X, H-E) montrant l'effet de *Pterocarpus soyauxii* sur la structure du cerveau.

SHAM + H₂O = Témoin *Sham operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant le véhicule. **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. **Ovx + PS 100, Ovx + PS 200, Ovx + PS 300** = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* à la dose de 100, 200 et 300 mg/kg. **CA1** ; **Nn** = Neurone normal, **O** = Oligodendrocyte, **Dn** = Désorganisation neuronale ; **CA3** : **Nn** = Neurone normal, **O** = Oligodendrocyte, **Nv** = Neurone vacuolisé, **Nh** = Noyau hyperchromatique ; **Gyrus denté** : **Cg** = couche de cellule granuleuse, **Cp** = couche de cellules polymorphes, **Cm** = couche moléculaire ; **Dn** = Dégénérescence neuronale ; **Cortex** ; **Nn** = Neurone normal, **Nh** = noyau hyperchromatique, **O** = Oligodendrocyte, **a** = Astrocyte.

III.1.5.3.5- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur la densité des neurones dans les régions de l'hippocampe chez les rates ovariectomisées

La figure 60 démontre les effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur la densité des neurones dans les régions hippocampiques. L'ovariectomie a entraîné après 112 jours, une diminution significative ($p < 0,01$) du nombre de neurones au niveau des régions CA1 et CA3. L'extrait de plante mieux que le valérate d'œstradiol a augmenté significativement ($p < 0,01$) le nombre de neurones au niveau CA1 de l'hippocampe en comparaison aux animaux Ovx. Au niveau CA3, seule la dose d'extrait de 200 mg/kg a augmenté de façon significative ($p < 0,05$) le nombre de neurones au même titre que le valérate d'œstradiol en comparaison aux animaux Ovx recevant de l'eau distillée.

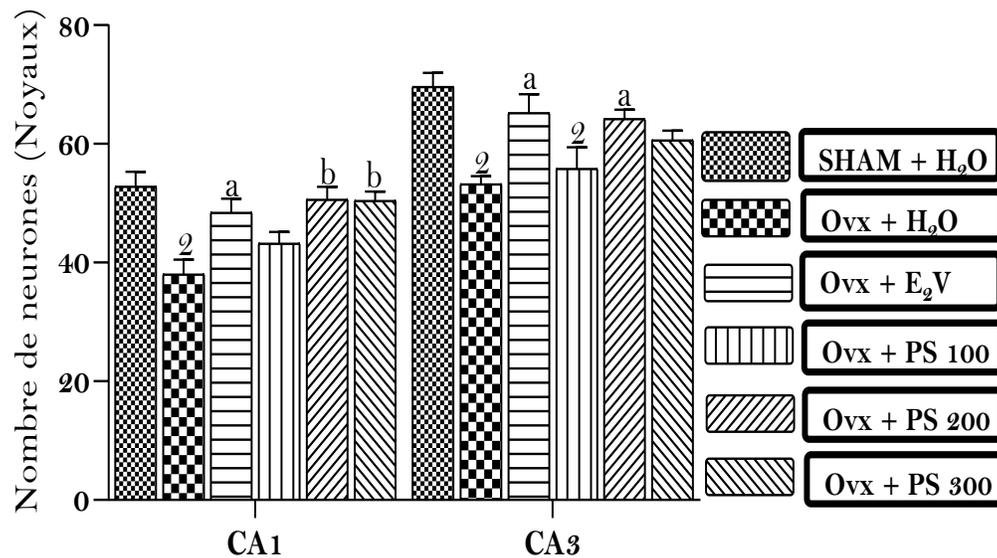


Figure 60: Effet de l'extrait de *Pterocarpus soyauxii* sur la densité neuronale des régions CA1 et CA3 chez les rates ovariectomisées.

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM ; $n = 5$; ¹ $p < 0,05$; ² $p < 0,01$; ³ $p < 0,001$, différence significative par rapport au contrôle *Sham-operated* ; ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée. **SHAM + H₂O** = Témoin *Sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant le véhicule. **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. **Ovx + PS 100**, **Ovx + PS 200**, **Ovx + PS 300** = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* à la dose de 100, 200 et 300 mg/kg.

III.1.5.4- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur l'ostéoporose liée à l'ovariectomie

III.1.5.4.1- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur la masse relative du fémur et du tibia et sur le taux de protéines totales fémorales chez les rates ovariectomisées

La figure 61 présente les effets du traitement curatif de 28 jours à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* sur la masse relative du fémur et du tibia (61A) et sur le taux de protéines fémorales (61B) chez les rates ovariectomisées. Il ressort de cette figure que l'ovariectomie après 112 jours a entraîné une diminution significative de la masse relative du fémur ($p < 0,01$) ainsi que du taux de protéines fémorales ($p < 0,001$) comparativement aux animaux témoins *Sham-operated*. L'administration de l'extrait de *P. soyauxii* aux doses de 200 et de 300 mg/kg comparativement aux animaux Ovx a augmenté de manière significative ($p < 0,05$) la masse relative du fémur. Le traitement aux doses de 200 et de 300 mg/kg a entraîné de manière significative une augmentation du taux de protéines fémorales respectivement de $p < 0,01$ et de $p < 0,001$ comparativement aux animaux Ovx.

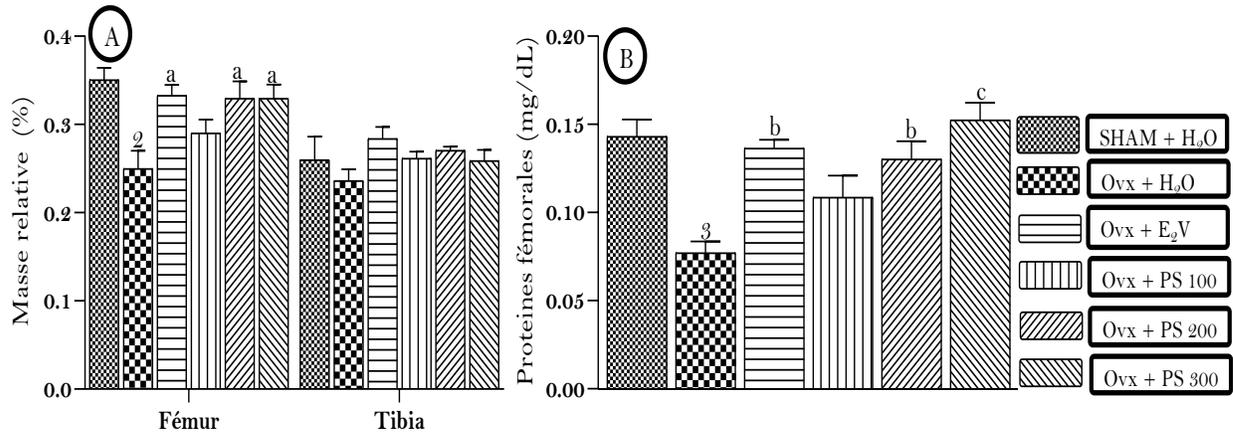


Figure 61: Effets du traitement de 28 jours à l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii* sur la masse relative du fémur (A) et du tibia et le taux de protéines fémorales (B) chez les rates ovariectomisées.

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM ; $n = 5$; $^2p < 0,01$; $^3p < 0,001$, différence significative par rapport au contrôle *Sham-operated* ; $^ap < 0,05$; $^bp < 0,01$; $^cp < 0,001$, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin *Sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant le véhicule. **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. **Ovx + PS 100**, **Ovx + PS 200**, **Ovx + PS 300** = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* à la dose de 100, 200 et 300 mg/kg.

III.1.5.4.2- Effets de *P. soyauxii* sur la densité du fémur chez les rates ovariectomisées

La figure 62 présente les effets du traitement de 28 jours à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* sur la densité du fémur chez les rates ovariectomisées. Il ressort de cette figure que la suppression des ovaires a entraîné 112 jours après, une diminution significative de la densité du fémur ($p < 0,001$) comparativement aux animaux témoins *Sham-operated*. L'administration de l'extrait de plante a comparativement aux animaux Ovx recevant de l'eau distillée augmenté de manière significative la densité du fémur à la dose de 200 ($p < 0,001$) et de 300 ($p < 0,01$) mg/kg.

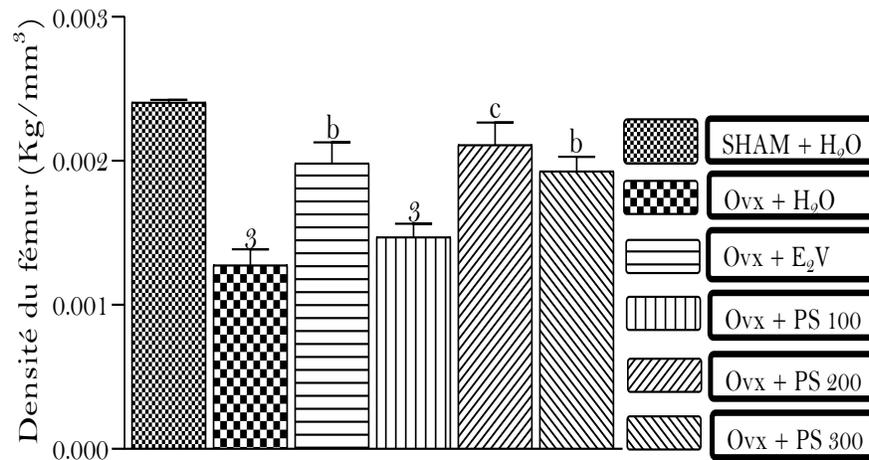


Figure 62: Effets du traitement de 28 jours à l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur la densité du fémur chez les rates ovariectomisées.

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM ; $n = 5$; ³ $p < 0,001$, différence significative par rapport au contrôle *Sham-operated* ; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée. **SHAM + H₂O** = Témoin *Sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant le véhicule. **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. **Ovx + PS 100**, **Ovx + PS 200**, **Ovx + PS 300** = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* à la dose de 100, 200 et 300 mg/kg.

III.1.5.4.3- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur quelques éléments figurés du sang chez les rates ovariectomisées

Les effets de l'extrait aqueux de *P. soyauxii* sur quelques éléments figurés du sang chez les rates ovariectomisées sont consignés dans le tableau XXXI. Ce tableau montre que l'ovariectomie a entraîné 112 jours après, une augmentation significative ($p < 0,01$) du nombre de globules blancs (GB) et non significative du nombre de monocytes par rapport aux animaux *Sham-operated*. L'extrait aqueux de *P. soyauxii* a réduit de manière non significative ces différents paramètres comparativement aux témoins Ovx.

Tableau XXXI: Effets de *Pterocarpus soyauxii* sur quelques éléments figurés du sang chez les rates ménopausées

Paramètres	GB (10 ⁹ /L)	GR (10 ¹² /L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	MO (10 ⁹ /L)
Groupes					
SHAM + H₂O	6,43 ± 0,73	8,26 ± 0,22	13,95 ± 0,26	45,00 ± 0,77	0,18 ± 0,01
Ovx + H₂O	10,14 ± 0,71 ²	8,21 ± 0,22	13,57 ± 0,35	43,62 ± 0,88	0,24 ± 0,01
Ovx + E₂V	6,73 ± 0,60 ^a	8,73 ± 0,06	14,12 ± 0,17	46,47 ± 0,33	0,18 ± 0,02
Ovx + PS 100	8,05 ± 0,70	8,81 ± 0,35	14,07 ± 0,48	47,27 ± 1,73	0,20 ± 0,02
Ovx + PS 200	8,75 ± 0,40	8,83 ± 0,08	14,65 ± 0,16	48,05 ± 0,45	0,17 ± 0,02
Ovx + PS 300	9,45 ± 0,79 ¹	8,77 ± 0,17	14,52 ± 0,33	47,67 ± 1,35	0,17 ± 0,02

Les valeurs représentent la moyenne ± ESM (n = 5). ¹p < 0,05, différence significative par rapport au contrôle *Sham-operated* ; ^ap < 0,05 ; différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée, **SHAM + H₂O** = Témoin *Sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant le véhicule. **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg. **Ovx + PS 100, Ovx + PS 200, Ovx + PS 300** = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* à la dose de 100, 200 et 300 mg/kg. **GB** = Globules blancs ; **GR** = Globules rouges ; **HGB** = Hémoglobine ; **HCT** = hématocrite ; **MO** = Monocytes.

III.1.5.4.4- Effets curatifs de l'extrait aqueux du duramen sur le taux sérique, urinaire et osseux de calcium, phosphore et de magnésium chez les rates ovariectomisées

Le tableau XXXII présente les effets du traitement à l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur le taux sérique, urinaire et osseux de calcium, de phosphore et de magnésium chez les rates ovariectomisées après 112 jours. L'ovariectomie a induit comparativement aux rats *Sham-operated*, une diminution significative du taux de calcium au niveau sérique ($p < 0,001$) et fémoral ($p < 0,05$) et une augmentation significative ($p < 0,001$) au niveau urinaire. L'extrait de plante en comparaison aux rates Ovx à la dose de 100 mg/kg a de manière significative ($p < 0,05$) augmenté le taux de calcium fémoral et diminué celui urinaire. A la dose de 200 mg/kg, l'extrait de plante a augmenté significativement ($p < 0,05$) le taux de calcium sérique et a baissé toujours de manière significative ($p < 0,01$) la concentration de calcium urinaire par rapport aux animaux ovariectomisés recevant de l'eau distillée. L'extrait à la dose de 300 mg/kg a diminué de manière significative ($p < 0,05$) le taux de calcium urinaire rapport aux animaux ovariectomisés recevant de l'eau distillée.

Concernant le phosphore, l'ovariectomie a entraîné une diminution significative du taux de phosphore sérique ($p < 0,01$) et fémoral ($p < 0,05$) comparativement aux animaux *sham-operated* recevant de l'eau distillée. L'extrait de plante aux doses de 200 et de 300 mg/kg comparativement aux animaux ovariectomisés recevant de l'eau distillée a augmenté significativement ($p < 0,01$) le taux de phosphore sérique à la dose de 300 mg/kg a augmenté significativement ($p < 0,05$) le taux de phosphore osseux en comparaison aux animaux Ovx ayant reçu de l'eau distillée.

Tableau XXXII: Effets de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur le taux sérique, urinaire et osseux de calcium, phosphore et de magnésium chez les rates ovariectomisées

Paramètres	Calcium (mmol/L)			Phosphore (mmol/L)		Magnésium (mmol/L)		
	Sérum	Fémur	Urine	Sérum	Fémur	Sérum	Fémur	Urine
SHAM + H₂O	2,23 ± 0,05	3,18 ± 0,33	7,72 ± 0,34	2,73 ± 0,02	10,74 ± 0,25	0,45 ± 0,01	0,32 ± 0,05	2,32 ± 0,10
Ovx + H₂O	1,82 ± 0,04 ³	1,88 ± 0,23 ¹	11,07 ± 0,13 ³	2,44 ± 0,05 ²	8,89 ± 0,57 ¹	0,44 ± 0,00	0,20 ± 0,01	2,68 ± 0,23
Ovx + E₂V	2,13 ± 0,04 ^a	2,61 ± 0,27	8,33 ± 0,28 ^b	2,69 ± 0,07 ^b	10,54 ± 0,20 ^a	0,45 ± 0,01	0,32 ± 0,05	2,14 ± 0,10
Ovx + PS 100	1,96 ± 0,06 ¹	3,09 ± 0,22 ^a	9,17 ± 0,78 ^a	2,63 ± 0,02	9,73 ± 0,27	0,47 ± 0,00	0,34 ± 0,04	2,25 ± 0,10
Ovx + PS 200	2,09 ± 0,01 ^a	2,94 ± 0,24	8,71 ± 0,23 ^b	2,73 ± 0,01 ^b	10,40 ± 0,49	0,50 ± 0,02	0,25 ± 0,04	2,47 ± 0,17
Ovx + PS 300	1,93 ± 0,04 ¹	2,33 ± 0,24	8,94 ± 0,48 ^a	2,69 ± 0,03 ^b	10,62 ± 0,13 ^a	0,45 ± 0,03	0,26 ± 0,04	2,51 ± 0,49

Chaque valeur représente la moyenne ± ESM ; n = 5 ; ¹p < 0,05 ; ²p < 0,01 ; ³p < 0,001, différence significative par rapport au contrôle *Sham-operated* ; ^ap < 0,05 ; ^bp < 0,01 ; ^cp < 0,001, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin *Sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant de l'eau distillée (10 mL/kg), **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg PC. **Ovx + PS 100, Ovx + PS 200, Ovx + PS 300,** = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* à la dose de 100, 200 et de 300 mg/kg.

III.1.5.4.5- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur l'activité osseuse et sérique de la phosphatase alcaline, sur la créatinine urinaire et sur quelques index d'ostéolyse chez les rates ovariectomisées

Le tableau XXXIII présente les effets du traitement des rates Ovx à l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur l'activité de la phosphatase alcaline (PAL) fémorale et sérique, le taux de créatinine sérique et urinaire et sur les indexes d'ostéolyse. Il ressort de ce tableau que l'ovariectomie a entraîné au bout de 112 jours, une diminution significative ($p < 0,001$) de l'activité de la PAL au niveau fémoral comparativement aux control *Sham-operated*. Il a été également observé après ovariectomie une élévation significative ($p < 0,01$) du rapport calcium urinaire sur créatinine urinaire. L'extrait de plante à la dose de 200 mg/kg a réduit significativement ($p < 0,05$) l'activité de la PAL en comparaison au control Ovx.

Tableau XXXIII: Effets de *Pterocarpus soyauxii* sur l'activité de la PAL sérique et osseuse, la créatinine urinaires et quelques index d'ostéolyse chez les rates ovariectomisées

Paramètres	Créatinine (mg/dL)		PAL (UI/L)		Ca ²⁺ _{uri} /Créa _{uri}	Mg ²⁺ _{uri} /Créa _{uri}
	Sérum	Urine	Fémur	Sérum		
SHAM + H₂O	1,02 ± 0,03	15,19 ± 0,19	545,66 ± 8,41	232,05 ± 6,56	0,50 ± 0,02	0,15 ± 0,01
Ovx + H₂O	0,99 ± 0,02	16,10 ± 0,54	397,24 ± 15,59 ³	185,15 ± 4,46 ³	0,69 ± 0,02 ²	0,16 ± 0,01
Ovx + E₂V	0,99 ± 0,02	15,40 ± 0,24	549,20 ± 16,09 ^{3c}	197,45 ± 2,65 ^c	0,54 ± 0,01 ^a	0,13 ± 0,01
Ovx + PS 100	0,98 ± 0,02	14,83 ± 0,55	398,39 ± 15,73 ³	215,12 ± 4,61 ²	0,62 ± 0,05	0,15 ± 0,03
Ovx + PS 200	0,96 ± 0,01	15,28 ± 0,10	474,71 ± 7,27 ^{1a}	206,55 ± 3,62 ^{1b}	0,57 ± 0,01	0,16 ± 0,01
Ovx + PS 300	0,95 ± 0,01	15,56 ± 0,34	454,33 ± 11,01 ²	211,32 ± 5,06 ^{2a}	0,57 ± 0,02	0,16 ± 0,03

Chaque valeur représente la moyenne ± ESM ; n = 5 ; ¹p < 0,05 ; ²p < 0,01 ; ³p < 0,001, différence significative par rapport au Témoin *Sham-operated* ; ^ap < 0,05 ; ^bp < 0,01 ; ^cp < 0,001, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin sham-operated recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant de l'eau distillée (10 mL/kg), **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant le valérate d'oestradiol à la dose de 1 mg/kg, **Ovx + PS 100**, **Ovx + PS 200**, **Ovx + PS 300** = Rates ovariectomisées et recevant l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* aux doses de 100, 200 et de 300 mg/kg. **Ca²⁺ uri** = Calcium urinaire, **Mg²⁺ uri** = Magnésium urinaire.

III.1.5.4.6- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur quelques marqueurs du statut oxydant fémoral chez les rates ovariectomisées

Les effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur le taux de GSH (Figure 63A), de nitrites (Figure 63 B) et de MDA (Figure 63C) au niveau fémoral sont résumés sur la figure 63.

Les animaux du groupe Ovx recevant de l'eau distillée comparativement au groupe *sham-operated* ont présentés après 112 jours une diminution significative du taux de GSH ($p < 0,01$) et une augmentation significative du taux de nitrites ($p < 0,001$) et de MDA ($p < 0,01$).

L'extrait de *P. soyauxii* aux doses de 200 et de 300 mg/kg et en comparaison aux animaux Ovx recevant de l'eau distillée a augmenté significativement le taux de GSH ($p < 0,05$) et de MDA ($p < 0,01$) respectivement.

A toutes les doses d'extrait, il a été observé une baisse significative ($p < 0,001$) du taux de nitrites dans le fémur par rapport aux animaux Ovx. Le taux de MDA a diminué ($p < 0,01$) de manière significative suite au traitement à l'extrait de *P. soyauxii* à la dose de 300 mg/kg comparativement aux rates Ovx recevant de l'eau distillée.

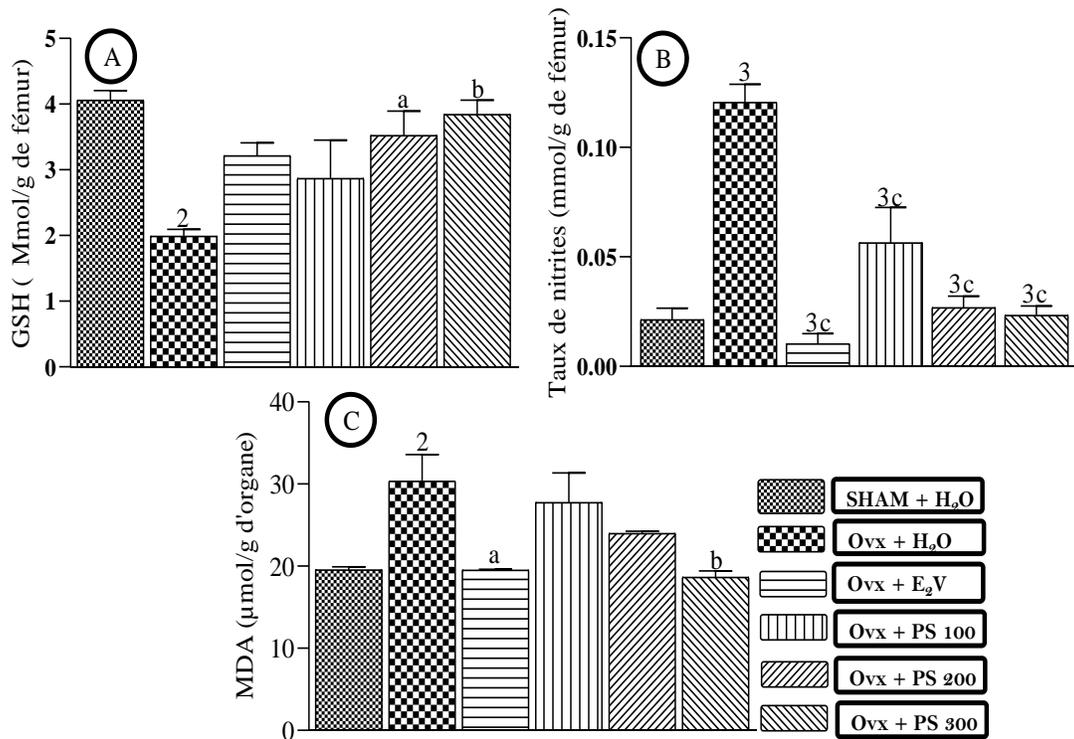


Figure 63: Effets de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur le taux de glutathion réduit (A), de nitrites (B) et de MDA (C) au niveau fémoral après un traitement de 28 jours chez les rates ovariectomisées.

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM ; $n = 5$; $^2p < 0,01$; $^3p < 0,001$, différence significative par rapport au contrôle *Sham-operated* ; $^ap < 0,05$; $^bp < 0,01$; $^cp < 0,001$, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin sham-operated recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant de l'eau distillée (10 mL/kg), **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant le valérate d'oestradiol à la dose de 1 mg/kg, **Ovx + PS 100**, **Ovx + PS 200**, **Ovx + PS 300** = Rates ovariectomisées et recevant l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* aux doses de 100, 200 et de 300 mg/kg.

III.1.5.4.7- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur la microarchitecture du fémur et du tibia chez les rates ovariectomisées

La figure 64 montre les effets de *Pterocarpus soyauxii* sur la structure du fémur et du tibia. Cette figure laisse voir que l'ablation chirurgicale des ovaires a entraîné après 112 jours une augmentation du nombre de lacunes de résorption et au niveau du tibia et du fémur ainsi qu'une désorganisation de l'os trabéculaire du tibia en comparaison aux animaux *sham-operated*. L'extrait a corrigé ces altérations comparativement aux animaux Ovx aux doses de 200 et de 300 mg/kg.

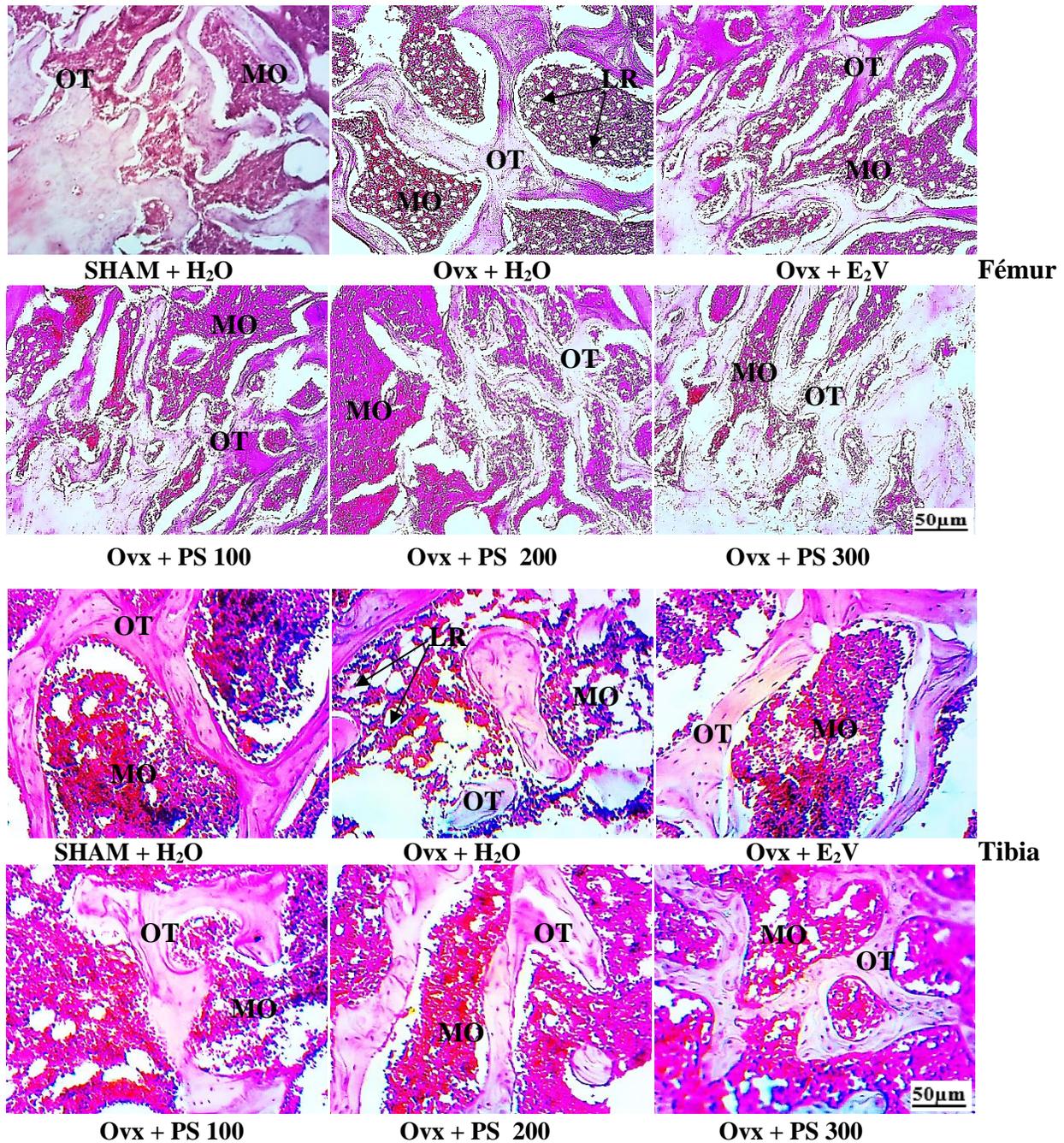


Figure 64: Photographies montrant les effets de *Pterocarpus soyauxii* suite à un traitement de 28 jours sur la structure du fémur (100X, H-E) et du tibia (200X, H-E) chez les rates ovariectomisées.

SHAM + H₂O = Témoin sham-operated recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant de l'eau distillée (10 mL/kg), **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant le valérate d'oestradiol a la dose de 1 mg/kg, Ovx + PS 100, Ovx + PS 200, Ovx + PS 300 = Rates ovariectomisées et recevant l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* aux doses de 100, 200 et de 300 mg/kg. **LR** = Lacune de résorption, **MO** = Moelle osseuse, **OT** = Os trabéculaire.

III.1.5.5- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur les troubles hépatiques et rénaux chez les rates ovariectomisées

III.1.5.5.1- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur quelques marqueurs biochimiques de la fonction hépatique chez les rates ovariectomisées

Le tableau XXXIV présente les effets du traitement de 28 jours à l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur l'activité sérique de l'ALAT et de l'ASAT et le taux de protéines hépatiques. Il ressort de cette figure que l'ovariectomie a entraîné après 112 jours, une augmentation significative de l'activité de l'ALAT et de l'ASAT ($p < 0,05$) et une baisse significative du taux de protéines hépatiques ($p < 0,001$) comparativement au témoin *sham-operated*. L'administration de l'extrait de *P. soyauxii* à la dose de 200 mg/kg pendant 28 jours a entraîné en comparaison au témoin Ovx ayant reçu de l'eau distillée, une diminution significative de l'activité de l'ALAT ($p < 0,01$) et de l'ASAT ($p < 0,05$) et une augmentation significative du taux de protéines hépatiques ($p < 0,05$).

Tableau XXXIV: Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur quelques marqueurs biochimiques de la fonction hépatique chez les rates ovariectomisées

Paramètres Groupes	ALAT (UI/L)	ASAT (UI/L)	Protéines (mg/g)
SHAM + H ₂ O	174,30 ± 6,88	246,58 ± 10,68	0,32 ± 0,02
Ovx + H ₂ O	223,34 ± 13,20 ¹	302,23 ± 3,95 ¹	0,14 ± 0,01 ³
Ovx + E ₂ V	165,94 ± 9,10 ^b	254,81 ± 4,27 ^a	0,29 ± 0,03 ^b
Ovx + PS 100	196,23 ± 9,10	273,47 ± 8,27	0,23 ± 0,05
Ovx + PS 200	167,18 ± 9,56 ^b	247,63 ± 5,79 ^a	0,25 ± 0,02 ^a
Ovx + PS 300	190,71 ± 12,29	259,70 ± 11,78	0,23 ± 0,02

Chaque valeur représente la moyenne ± ESM ; n = 5 ; ¹p < 0,05, ³p < 0,001 ; différence significative par rapport au témoin *Sham-operated*; ^ap < 0,05 ; ^bp < 0,01 ; différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; SHAM + H₂O = Témoin sham-operated recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; Ovx + H₂O = Témoin négatif recevant de l'eau distillée (10 mL/kg), Ovx + E₂V = Témoin positif recevant le valérate d'oestradiol à la dose de 1 mg/kg, Ovx + PS 100, Ovx + PS 200, Ovx + PS 300 = Rates ovariectomisées et recevant l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* aux doses de 100, 200 et de 300 mg/kg. ALAT = Alanine amino transférase, ASAT = Aspartate amino transférase.

III.1.5.5.2- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur quelques marqueurs biochimiques de la fonction rénale chez les rates ovariectomisées

Le tableau XXXV présente les effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur quelques marqueurs biochimiques de la fonction rénale chez les rates ovariectomisées. Il ressort de ce tableau que, l'ablation chirurgicale des ovaires a entraîné au bout de 112 jours et par rapport aux rates *Sham-operated*, une diminution significative de la concentration des protéines rénales, d'acide urique sérique ($p < 0,01$) mais n'a pas fait varier de manière significative le taux de créatinine sérique. L'extrait de *P. soyauxii* à la dose de 200 mg/kg au même titre que le valérate d'oestradiol a induit une augmentation du taux de protéines rénales de manière significative ($p < 0,05$) par rapport aux rates Ovx recevant de l'eau distillée. S'agissant du taux d'acide urique, l'extrait de *P. soyauxii* à 200 mg/kg et à 300 mg/kg a réduit le taux d'acide urique sérique de manière significative ($p < 0,05$) par rapport aux rates Ovx recevant de l'eau distillée.

Tableau XXXV: Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur quelques marqueurs biochimiques de la fonction rénale chez les rates ovariectomisées

Paramètres Groupes	Protéines (mg/g)	Créatinine (mg/dL)	Acide urique (mg/dL)
SHAM + H ₂ O	0,28 ± 0,01	1,02 ± 0,03	1,49 ± 0,02
Ovx + H ₂ O	0,16 ± 0,07 ²	0,99 ± 0,02	1,66 ± 0,02 ²
Ovx + E ₂ V	0,23 ± 0,00 ^a	0,99 ± 0,02	1,50 ± 0,03 ^a
Ovx + PS 100	0,17 ± 0,01	0,98 ± 0,02	1,55 ± 0,04
Ovx + PS 200	0,20 ± 0,06 ^a	0,96 ± 0,01	1,50 ± 0,03 ^a
Ovx + PS 300	0,17 ± 0,02	0,95 ± 0,01	1,52 ± 0,02 ^a

Chaque valeur représente la moyenne ± ESM ; n = 5 ; ²p < 0,01 ; différence significative par rapport au témoin *Sham-operated*; ^ap < 0,05; différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin *sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant de l'eau distillée (10 mL/kg), **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant le valérate d'oestradiol à la dose de 1 mg/kg, **Ovx + PS 100**, **Ovx + PS 200**, **Ovx + PS 300** = Rates ovariectomisées et recevant l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* aux doses de 100, 200 et de 300 mg/kg.

III.1.5.5.3- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *p. soyauxii* sur quelques marqueurs du statut oxydant rénale et hépatique chez les rates ovariectomisées

La figure 65 est une représentation des effets de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur quelques paramètres du statut oxydant dans le rein et le foie des rates ovariectomisées. Il ressort de la figure 66A que l'ovariectomie a entraîné au bout de 112 jours, une diminution significative ($p < 0,01$) du taux de GSH dans le foie et le rein comparativement aux animaux *sham-operated*. Le traitement à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* à la dose de 200 mg/kg a entraîné une augmentation significative ($p < 0,05$) du taux de GSH dans le foie comparativement aux animaux ovariectomisés ayant reçu de l'eau distillée.

Concernant la figure 65B, l'ovariectomie a entraîné après 112 jours une diminution significative du taux de nitrites dans le rein ($p < 0,01$) et le foie ($p < 0,001$) comparativement aux animaux *Sham-operated*. Le traitement à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* à la dose de 200 mg/kg a entraîné une augmentation significative ($p < 0,05$) de ce taux de nitrites comparativement aux animaux ovariectomisés ayant reçu de l'eau distillée.

S'agissant de la figure 65C, il a été noté une augmentation significative du taux de MDA dans le rein ($p < 0,01$) et le foie ($p < 0,001$) des animaux ayant subi une ablation chirurgicale des ovaires et ayant reçu de l'eau distillée comparativement aux animaux *sham-operated*. Le traitement à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* a entraîné une diminution significative du taux de MDA aux doses de 100 ($p < 0,05$), de 200 ($p < 0,01$) et de 300 mg/kg ($p < 0,05$) dans le foie comparativement aux animaux ovariectomisés ayant reçu de l'eau distillée. Seule la dose de 200 mg/kg a entraîné une baisse significative du taux de MDA dans le rein de manière significative ($p < 0,05$) en comparaison aux animaux ovariectomisés ayant reçu de l'eau distillée.

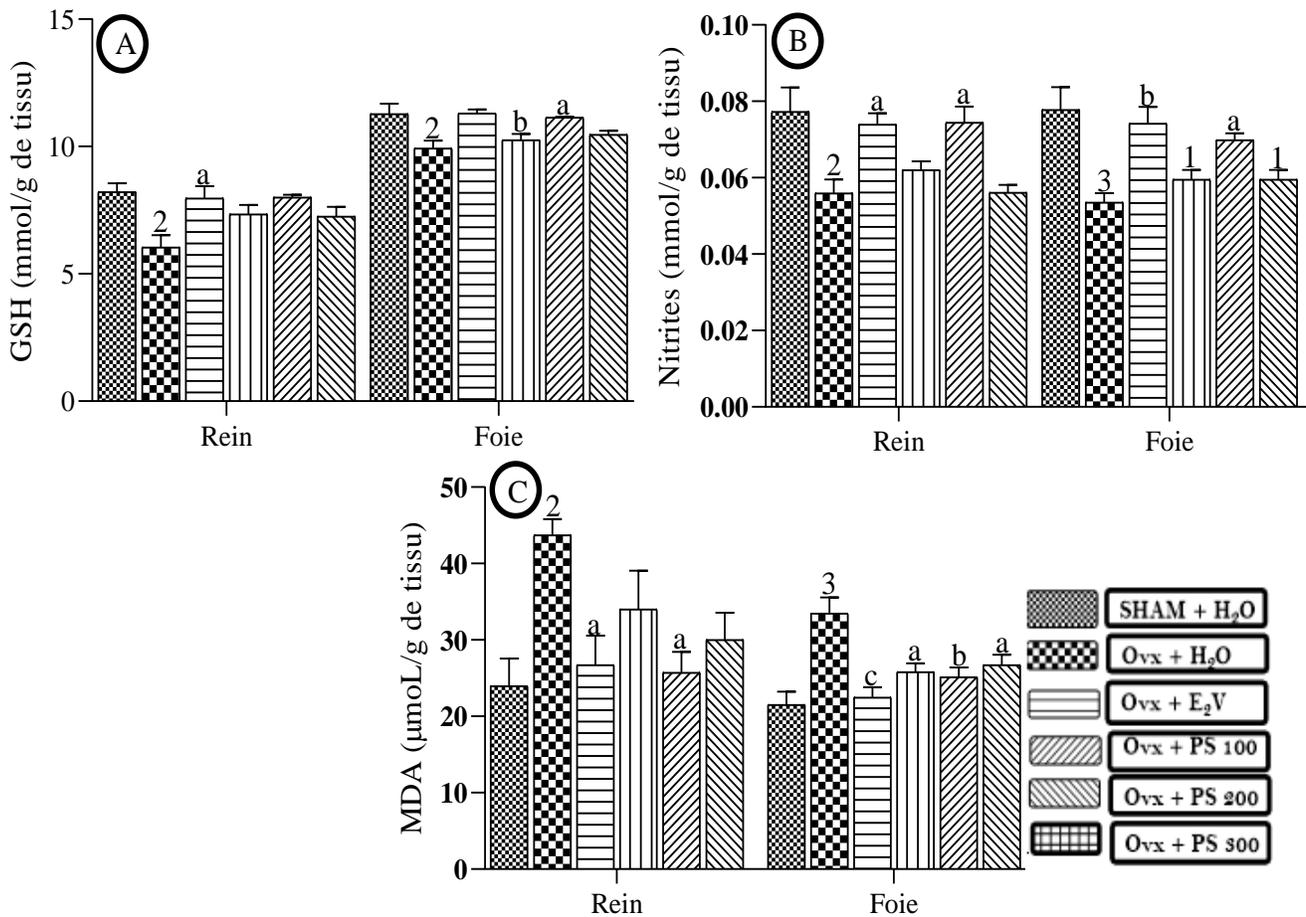


Figure 65: Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur quelques marqueurs du statut oxydant rénale et hépatique chez les rates ovariectomisées.

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM ; $n = 5$; $^2p < 0,01$; $^3p < 0,001$, différence significative par rapport au contrôle *Sham-operated* ; $^ap < 0,05$; $^bp < 0,01$; $^cp < 0,001$, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin sham-operated recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant de l'eau distillée (10 mL/kg), **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant le valérate d'oestradiol à la dose de 1 mg/kg, **Ovx + PS 100**, **Ovx + PS 200**, **Ovx + PS 300** = Rates ovariectomisées et recevant l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* aux doses de 100, 200 et de 300 mg/kg.

III.1.5.5.4- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur la structure du foie et du rein chez les rates ovariectomisées

La figure 66 montre les effets de *Pterocarpus soyauxii* sur la structure du foie et du rein chez les rates ovariectomisées. Il s'avère que l'ovariectomie après 112 jours et en comparaison aux animaux *sham-operated* a entraîné une infiltration leucocytaire hépatique mais n'a pas modifié la structure du rein. L'extrait après 28 jours de traitement a corrigé ces altérations comparativement aux animaux Ovx.

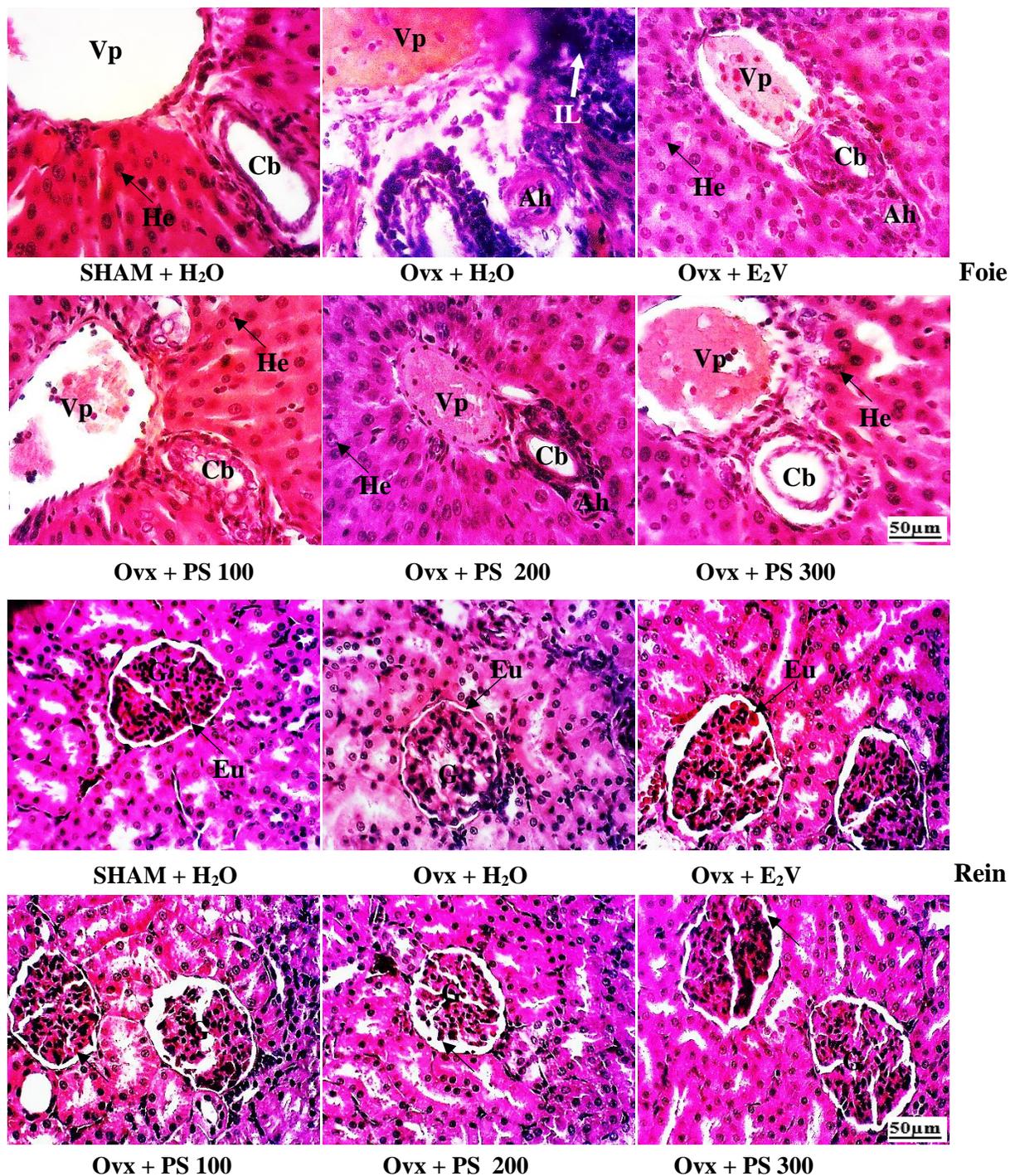


Figure 66: Photographie de la structure du foie et du rein (X200, H-E) chez les rates ovariectomisées et traitées à l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii* pendant 28 jours.

SHAM + H₂O = Témoin sham-operated recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant de l'eau distillée (10 mL/kg), **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant le valérate d'oestradiol a la dose de 1 mg/kg, **Ovx + PS 100**, **Ovx + PS 200**, **Ovx + PS 300** = Rates ovariectomisées et recevant l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* aux doses de 100, 200 et de 300 mg/kg. **Foie** ; **Vp** = Veine porte, **He** = Hépatocyte, **Cb** = Canalicule biliaire, **IL** = Infiltration leucocytaire, **Ah** = Artère hépatique ; **Rein** : **G** = Glomérule, **Eu** = Espace urinaire.

III.1.6- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur quelques paramètres de la fonction de reproduction chez les rates normales

III.1.6.1- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur l'évolution pondérale chez les rates normales

La figure 67 présente les effets de l'administration de l'extrait aqueux de *P. soyauxii* sur l'évolution pondérale des rates normales pendant 28 jours. On observe aucune différence significative de l'évolution de la masse pondérale entre les animaux témoins et les animaux recevant l'extrait aqueux de *P. soyauxii* aux doses de 200 et de 300 mg/kg pendant cette période expérimentale comparativement aux rats normaux ayant reçu de l'eau distillée.

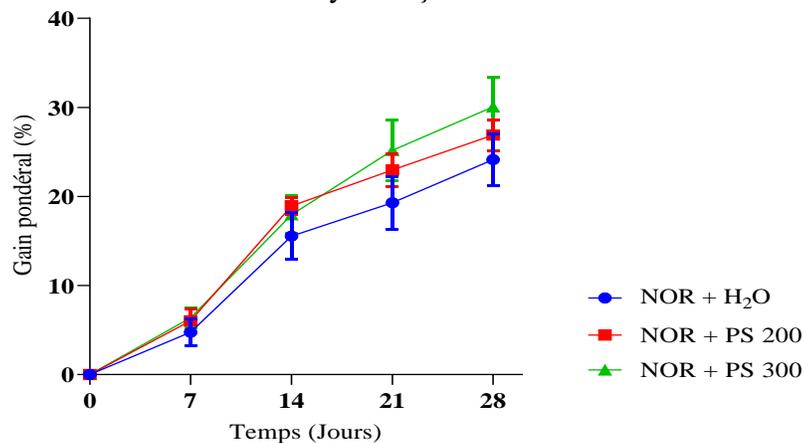


Figure 67: Effets de de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii* sur l'évolution pondérale des rates normales.

Chaque point représente la moyenne \pm ESM ; n = 5 ; différence significative par rapport au contrôle normal traité à l'eau distillée ; **NOR + H₂O** = contrôle normal recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **NOR + PS 200** = Animaux normaux traités à l'extrait de *P. soyauxii* à la dose de 200 mg/kg, **NOR + PS 300** = Animaux normaux traités à l'extrait de *P. soyauxii* à la dose de 300 mg/kg.

III.1.6.2- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur la concentration sérique, utérine et ovarienne de protéines chez les rates normales

La figure 68 résume les effets de l'administration de l'extrait aqueux de *P. soyauxii* sur le taux sérique, utérin et ovarien de protéines chez les rates normales. Il ressort que l'extrait a entraîné une diminution significative du taux de protéines comparativement aux animaux normaux recevant de l'eau distillée aux doses de 200 ($p < 0,01$) et de 300 mg/kg ($p < 0,05$).

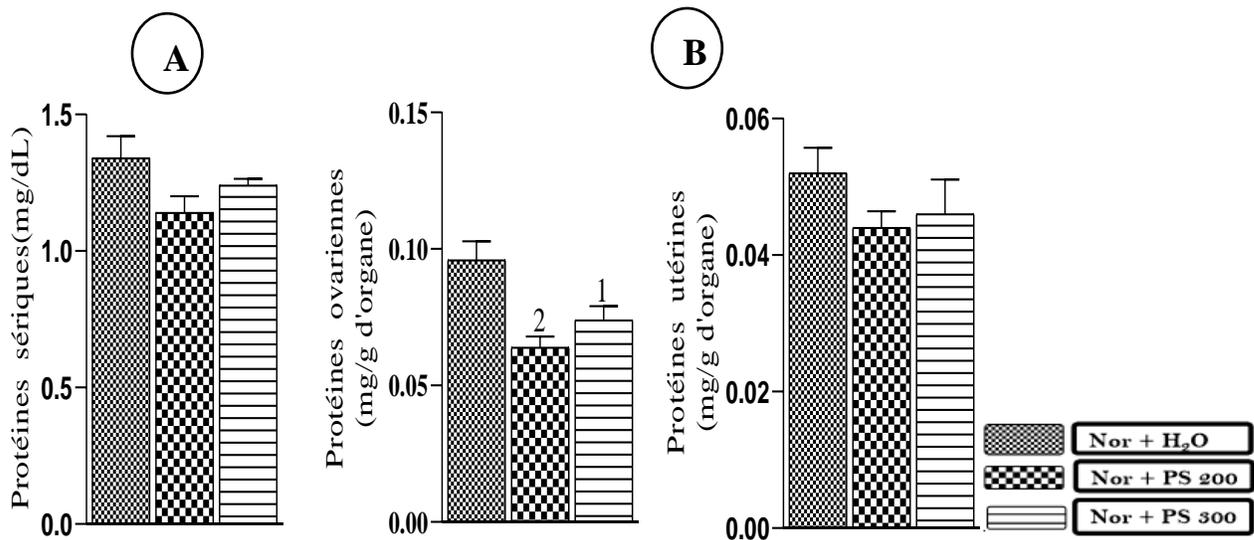


Figure 68: Effets de de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii* sur la concentration de protéines sérique (A), utérine et ovarienne (B) chez les normales.

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM ; (n = 5) ; ²p < 0,01, différence significative par rapport au contrôle normal traité à l'eau distillée ; **NOR + H₂O** = Témoin normal recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **NOR + PS 200** = Animaux normaux traités à l'extrait de *P. soyauxii* à la dose de 200 mg/kg, **NOR + PS 300** = Animaux normaux traités à l'extrait de *P. soyauxii* à la dose de 300 mg/kg.

III.1.6.3- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur la concentration sérique et ovarienne de cholestérol chez les rates normales

La figure 69 montre le taux sérique et ovarien de cholestérol chez les rates normales recevant l'extrait de *P. soyauxii* aux doses de 200 et de 300 mg/kg. On note par rapport aux rates normales recevant de l'eau distillée, une diminution significative du taux de cholestérol sérique a la dose de 200 (p < 0,01) et de 300 mg/kg (p < 0,05).

Au niveau ovarien, l'extrait aux deux doses testées a entraîné une augmentation significative (p < 0,01) du taux de cholestérol comparativement aux animaux normaux ayant reçu de l'eau distillée.

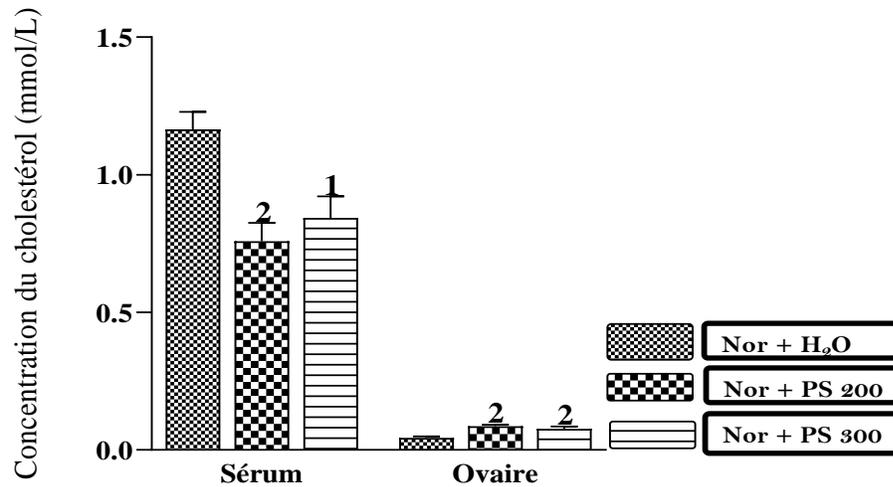


Figure 69: Effets de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur la concentration sérique (A) et ovarienne (B) en cholestérol chez les normales.

Les valeurs représentent la moyenne \pm ESM (n = 5) ; ¹p < 0,05 ; ²p < 0,01, différence significative par rapport au Témoin normal traité à l'eau distillée ; **NOR + H₂O** = Témoin normal recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **NOR + PS 200** = Animaux normaux traités à l'extrait de *P. soyauxii* à la dose de 200 mg/kg, **NOR + PS 300** = Animaux normaux traités à l'extrait de *P. soyauxii* à la dose de 300 mg/kg.

III.1.6.4- Effets de *P. soyauxii* sur la concentration sérique d'œstradiol chez les rates normales

La figure 70 présente les effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur la concentration sérique de l'œstradiol chez les rates normales. Il ressort de cette figure que, l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* aux doses de 200 et de 300 mg/kg par rapport aux rates normales ayant reçu de l'eau distillée a diminué significativement (p < 0,001) la concentration d'œstradiol sérique.

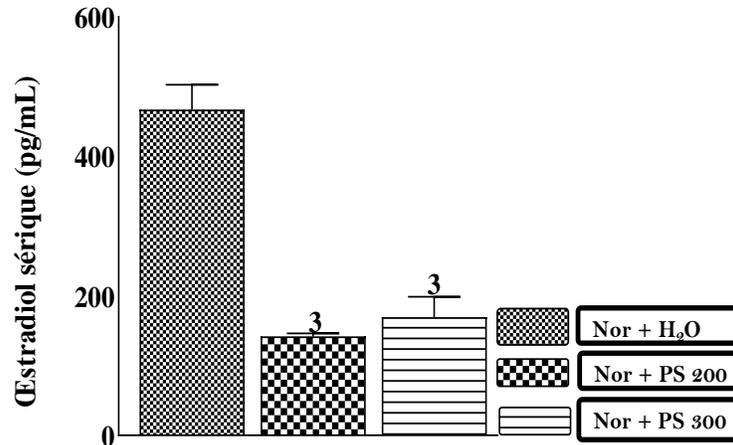


Figure 70: Effets de de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur la concentration sérique d'œstradiol chez les normales.

Les valeurs représentent la moyenne \pm ESM (n = 5) ; ³p < 0,001, différence significative par rapport au témoin normal traité à l'eau distillée ; **NOR + H₂O** = Témoin normal recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **NOR + PS 200** = Animaux normaux traités à l'extrait de *P. soyauxii* à la dose de 200 mg/kg, **NOR + PS 300** = Animaux normaux traités à l'extrait de *P. soyauxii* à la dose de 300 mg/kg.

III.1.6.5- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur la concentration sérique de FSH et de LH chez les rates normales

Les effets de *P. soyauxii* sur le taux sérique de FSH et de LH chez les rates normales pendant 28 jours aux doses de 200 et de 300 mg/kg sont consignés sur la figure 71. Il ressort de cette figure que l'extrait aqueux de *P. soyauxii* a entraîné une diminution significative (p < 0,01) du taux de LH sérique aux doses de 200 et de 300 mg/kg. La dose de 200 mg/kg a entraîné une diminution significative du taux de FSH sérique comparativement aux animaux normaux ayant reçu de l'eau distillée.

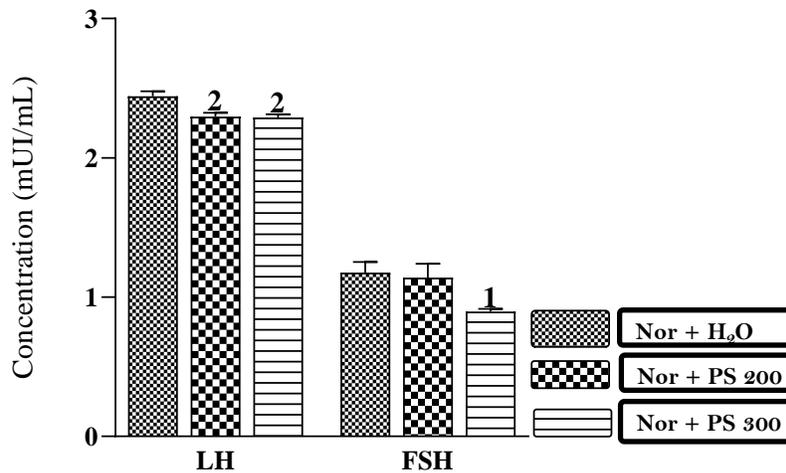


Figure 71: Effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii* sur le taux sérique de LH et de FSH chez les rates normales.

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM ($n = 5$) ; $^2p < 0,01$, différence significative par rapport au Témoin normal traité à l'eau distillée ; **NOR + H₂O** = Témoin normal recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **NOR + PS 200** = Animaux normaux traités à l'extrait de *P. soyauxii* à la dose de 200 mg/kg, **NOR + PS 300** = Animaux normaux traités à l'extrait de *P. soyauxii* à la dose de 300 mg/kg.

III.1.6.6- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur la structure du vagin, de l'utérus et sur la cytologie vaginale chez les rates normales

La figure 72 présente les effets de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* aux doses de 200 et de 300 mg/kg sur la structure de l'utérus et du vagin et sur la cytologie vaginale ainsi que sur l'histomorphométrie du vagin et de l'utérus chez les rates normales. Cette figure présente une structure normale de l'utérus, un épithélium vaginal présentant des couches germinatives, granuleuses et cornées dans tous les lots et un frottis vaginal présentant des cellules kératinisées. L'extrait à la dose de 200 mg/kg a entraîné de façon significative ($p < 0,05$) une diminution de la taille de l'épithélium vaginal et utérin comparativement aux animaux normaux ayant reçu de l'eau distillée.

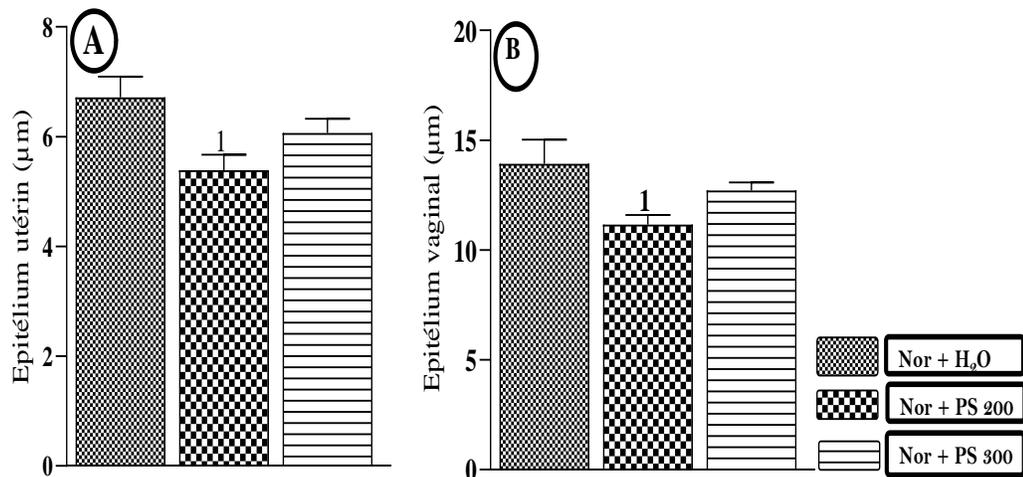
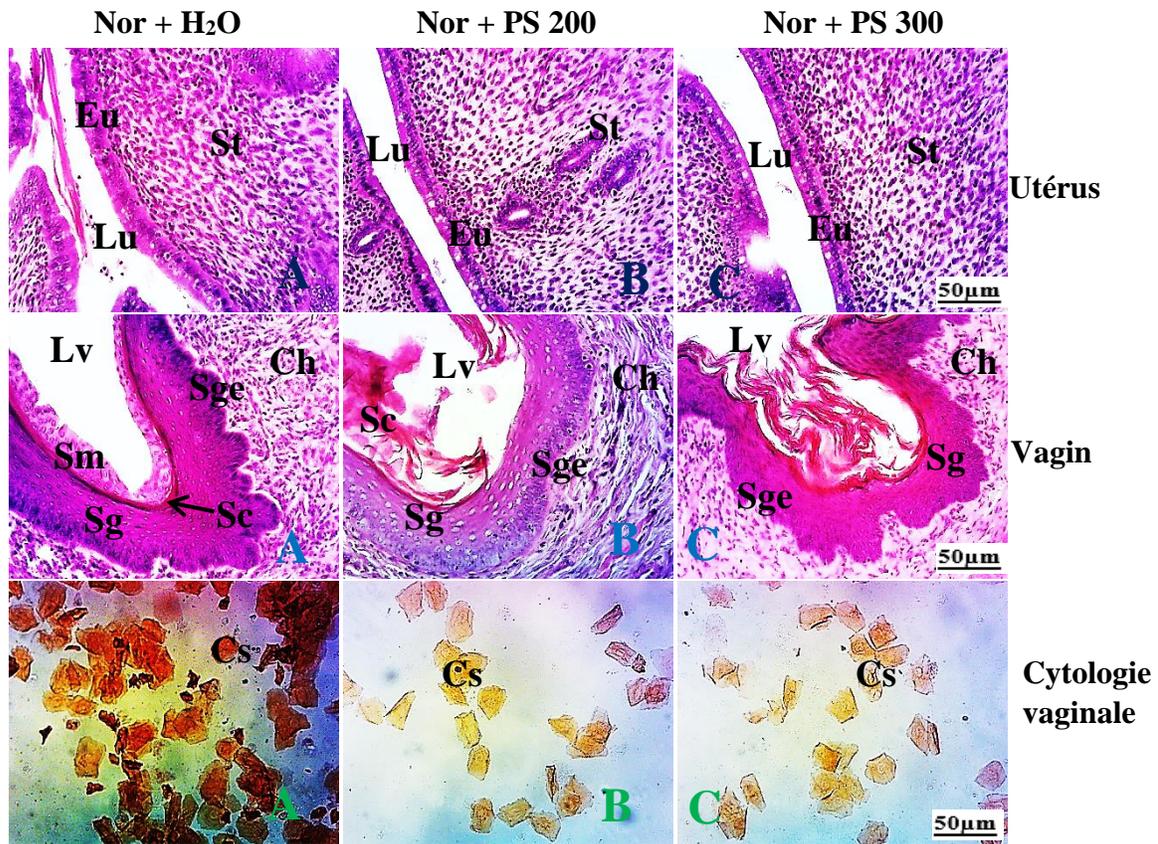


Figure 72: Effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii* sur la structure de l'utérus, du vagin (100X, H-E) et sur la cytologie vaginale (100X, Papanicolaou) chez les rates normales.

Les valeurs représentent la moyenne \pm ESM (n = 5). ¹p < 0,05, différence significative par rapport au témoin normal traité à l'eau distillée ; **NOR + H₂O** = Témoin normal recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **NOR + PS 200** = Animaux normaux ayant reçu l'extrait de *P. soyauxii* à la dose de 200 mg/kg, **NOR + PS 300** = Animaux normaux ayant reçu l'extrait de *P. soyauxii* à la dose de 300 mg/kg. **Utérus** : **Eu** = Epithélium utérin, **Lu** = Lumière utérine, **St** = Stroma ; **Vagin** : **Sc** = *Stratum corneum*, **Sg** = *Stratum granulosum*, **Ch** = Chorion, **Lv** = Lumière vaginale, **Sm** = *Statum mucosum* ; **Cytologie vaginale** : **Cs** = Cellules superficielles.

III.1.6.8- Effets de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur le nombre de follicules ovariens et la structure de l'ovaire chez les rates normales

La figure 73 montre les effets de l'administration de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur le nombre des différents types de follicules ovariens et la structure de l'ovaire. Il ressort de cette représentation que l'extrait de *P. soyauxii* a induit une diminution significative du nombre de corps jaunes chez les animaux recevant l'extrait à la dose de 200 mg/kg ($p < 0,01$) et de 300 mg/kg ($p < 0,05$) comparativement aux animaux normaux recevant de l'eau distillée.

Aux différentes doses d'extrait et en comparaison aux rates normales recevant de l'eau distillée, il a été observé une diminution significative du nombre de follicules secondaires ($p < 0,05$) et tertiaires ($p < 0,01$). L'extrait à la dose de 200 mg/kg a entraîné une diminution significative du nombre de follicules totaux ($p < 0,05$) en comparaison aux animaux normaux ayant reçu de l'eau distillée. La figure 73 montre une augmentation non significative du nombre de follicules primaires et atrésiques avec les différentes doses d'extrait.

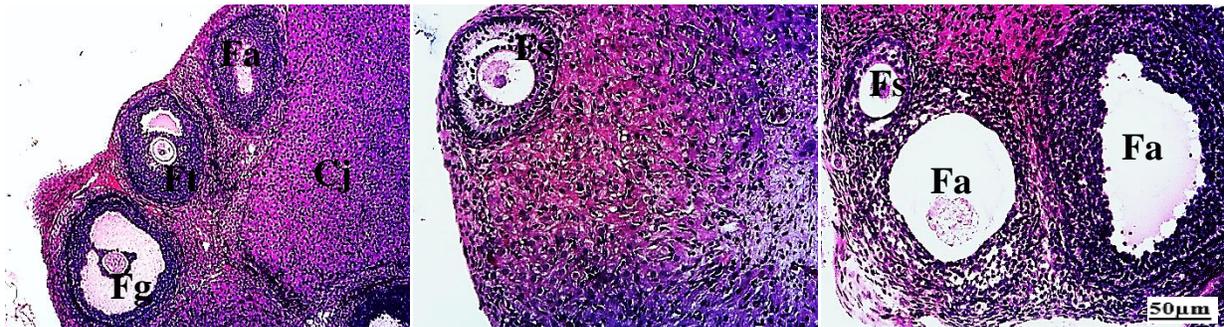
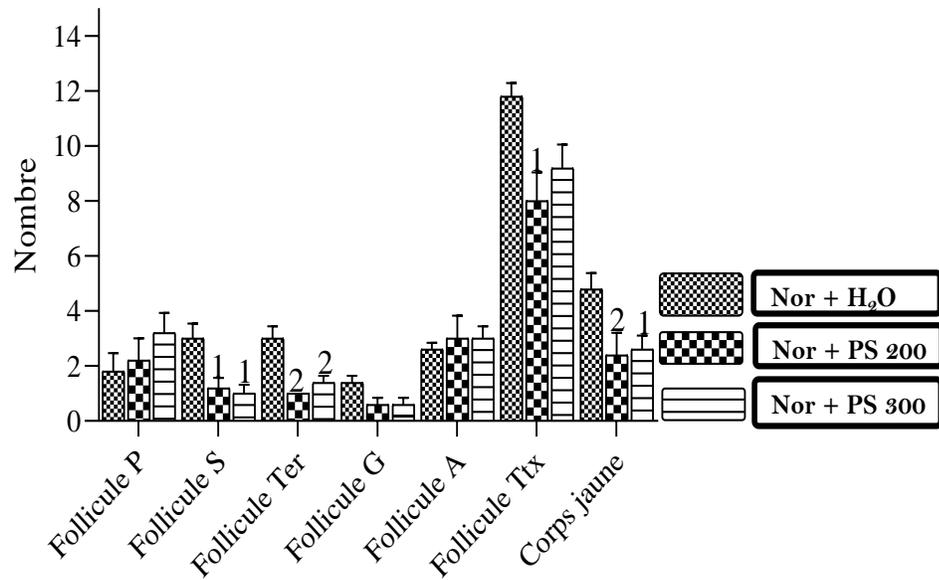


Figure 73: Effet de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii* sur le nombre de follicules ovariens et la structure de l'ovaire (100X, H-E) chez les rates normales.

Les valeurs représentent la moyenne \pm ESM (n = 5) ; ¹p < 0,05 ; ²p < 0,01, différence significative par rapport au témoin normal traité à l'eau distillée ; **NOR + H₂O** = Témoin normal recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **NOR + PS 200** = Animaux normaux ayant reçu l'extrait de *P. soyauxii* à la dose de 200 mg/kg, **NOR + PS 300** = Animaux normaux ayant reçu l'extrait de *P. soyauxii* à la dose de 300 mg/kg. **Cj** = corps jaune, **Ft** = follicule tertiaire, **Fa** = follicules atrésiques, **Fpd** = follicule primordiaux, **Fp** = follicule primaire, **Fs** = follicule secondaire, **Fg** = follicule de Degraaf, **Ftx** = follicules totaux, **P** = Primaire, **S** = Secondaire, **Ter** = tertiaire, **G** = Degraaf, **A** = Atrésiques, **Ttx** = Totaux.

III.1.7- Toxicité aiguë et subchronique de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii*

III.1.7.1- Toxicité aiguë de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii*

Le tableau XXXVI présente les effets de l'extrait aqueux de *P. soyauxii* aux doses de 2000 et de 5000 mg/kg sur quelques paramètres comportementaux. On note que l'extrait de plante à la dose de 2000 mg/kg n'a présenté aucun signe de toxicité au regard des paramètres cliniques évalués. À 5000 mg/kg, l'extrait a entraîné 1h après administration une réduction de la sensibilité aux bruits, au toucher et une apparition des selles liquides. Ces modifications comportementales ont disparu après 24h.

Tableau XXXVI: Effets de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur quelques paramètres comportementaux

Groupes		Locomotion	Sensibilité			Aspect des selles	Etat du Pelage	Taille de l'échantillon	
			Bruits	Toucher	Agressivité			Nombre initial	Nombre final
Nor + H₂O	1h	N	N	N	N	G	N	5	5
	2h	N	N	N	N	G	N	5	5
	24h	N	N	N	N	G	N	5	5
	14 jours	N	N	N	N	G	N	5	5
Nor + PS 2000	1h	N	N	N	N	G	N	5	5
	2h	N	N	N	N	G	N	5	5
	24h	N	N	N	N	G	N	5	5
	14 jours	N	N	N	N	G	N	5	5
Nor + PS 5000	1h	D	N-	N-	N-	G	L	5	5
	2h	D	N-	N	N	G	N	5	5
	24h	N	N	N	N	G	N	5	5
	14 jours	N	N	N	N	G	N	5	5

Nor + H₂O = rats normaux ayant reçu de l'eau distillée, **Nor + PS 2000** et **Nor + PS 5000** = rats normaux ayant reçu l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* aux doses respectives de 2000 et de 5000 mg/kg ; Réaction : Normale (N) ; Peu normale (N-) ; Diminué (D) ; Aspect des selles : Granuleux (G), Liquide (L).

III.1.7.2- Toxicité subchronique de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii*

III.1.7.2.1- Effets de l'extrait aqueux de *P. soyauxii* sur les paramètres anthropométriques

III.1.7.2.1.1- Effets sur l'évolution pondérale

La figure 74 présente la variation du gain pondéral hebdomadaire chez les animaux recevant l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii*. Cette figure montre que l'extrait aqueux de *P. soyauxii* aux doses de 200, 400 et de 800 mg/kg n'a entraîné aucune variation significative du poids corporel des animaux comparativement aux rates normales recevant de l'eau distillée.

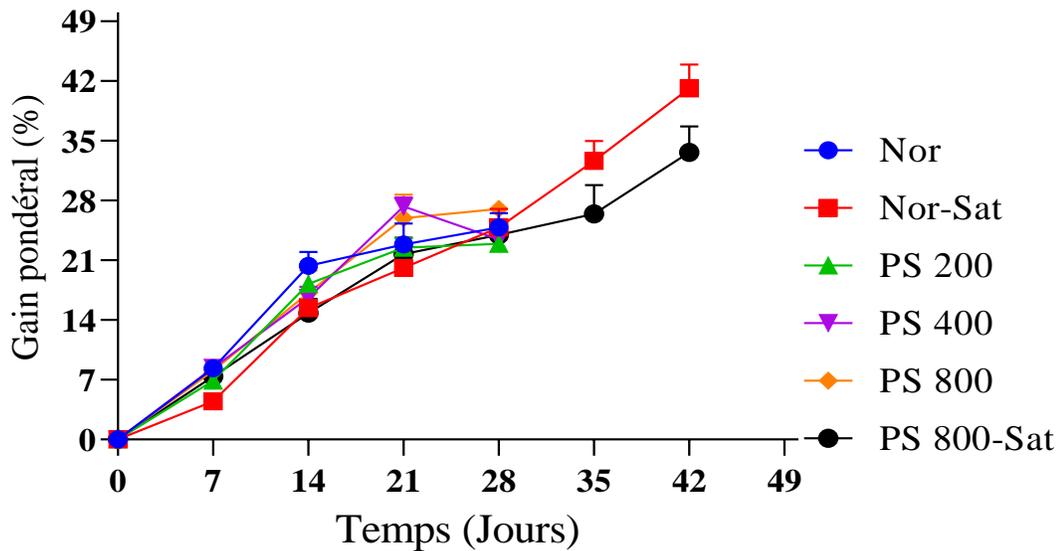


Figure 74: Effets de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur l'évolution pondérale .

Chaque point représente la moyenne \pm ESM (n = 5). **Nor** = animaux normaux recevant de l'eau distillée, **PS 200**, **PS 400** et **PS 800** = Animaux normaux recevant l'extrait du duramen de *P. soyauxii* aux doses de 200, 400 et 800 mg/kg, **Nor-sat** et **SAT** = Animaux normaux recevant respectivement de l'eau distillée et l'extrait de *P. soyauxii* à la dose de 800 mg/kg et privé de traitement pendant 14 jours après le traitement de 28 jours.

III.1.7.2.1.2- Effets de *Pterocarpus soyauxii* sur la masse relative de quelques organes au terme de l'administration en étude de toxicité subaiguë

La figure 75 présente les effets de l'administration de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur la masse relative du foie, rein, poumon et de la rate. Chez les animaux recevant l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* aux doses de 200, 400 et de 800 mg/kg, il n'a été noté aucune variation significative de la masse relative du foie, du rein, du poumon et de la rate.

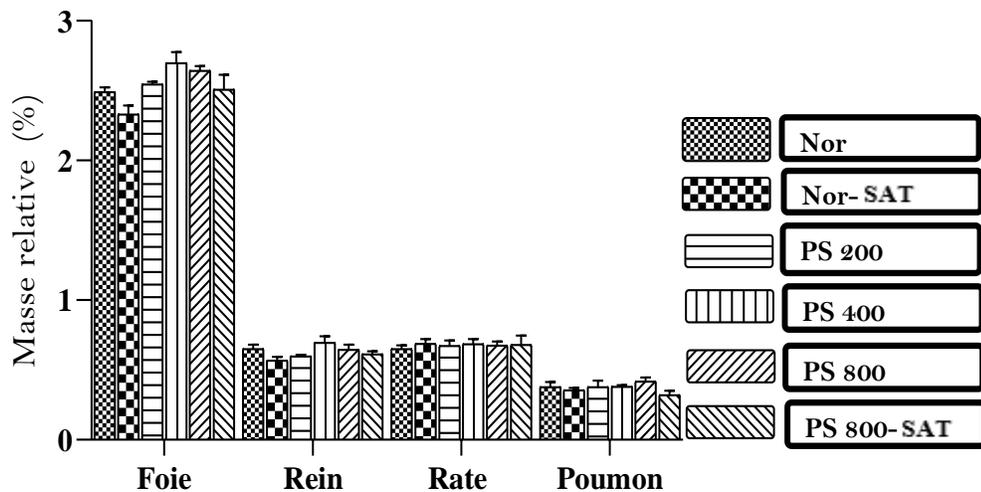


Figure 75: Effets de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur la masse relative du foie, du rein, du poumon et de la rate au terme de l'administration en étude de toxicité subaiguë.

Les valeurs représentent la moyenne \pm ESM (n = 5). **Nor** = animaux normaux recevant de l'eau distillée, **PS 200**, **PS 400** et **PS 800** = Animaux normaux recevant l'extrait du duramen de *P. soyauxii* aux doses de 200, 400 et 800 mg/kg, **Nor-Sat** et **PS 800-Sat** = Animaux normaux recevant respectivement de l'eau distillée et l'extrait de *P. soyauxii* à la dose de 800 mg/kg et privé de traitement pendant 14 jours après le traitement de 28 jours.

III.1.7.2.2- Effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus soyauxii* sur quelques paramètres hématologiques au terme de l'administration en étude de toxicité subaiguë

Le tableau XXXVII traduit les effets de l'administration subchronique de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur quelques paramètres hématologiques.

Suivant ce tableau, l'extrait de plante en comparaison aux animaux ayant reçu de l'eau distillée a entraîné à la dose de 200 mg/kg une baisse significative du taux de globules blancs ($p < 0,05$). Il a également été noté une diminution significative du nombre de globules rouges ($p < 0,05$) et globules blancs ($p < 0,01$) à la dose de 800 mg/kg en comparaison aux animaux normaux recevant de l'eau distillée. Il n'a été noté aucune variation significative des paramètres hématologiques entre les animaux du lot satellite recevant l'extrait de plante à la dose de 800 mg/kg et les animaux témoins satellites.

Tableau XXXVII: Effets de l'administration de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur quelques paramètres hématologiques au terme de l'administration en étude de toxicité subaiguë

Paramètres						
Groupes	GB (10 ⁹ /L)	GR (10 ¹² /L)	PLT (10 ⁹ /L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)
Nor	7,35 ± 0,18	7,22 ± 0,13	466,01 ± 41,31	12,75 ± 0,59	49,13 ± 1,13	65,82 ± 2,05
Nor-Sat	7,52 ± 0,12	7,28 ± 0,34	548,01 ± 26,86 ¹	13,15 ± 0,52	48,05 ± 1,95	66,15 ± 1,02
PS 200	6,36 ± 0,06 ¹	7,26 ± 0,22	584,53 ± 42,58	13,53 ± 0,42	52,10 ± 1,34	65,98 ± 1,05
PS 400	6,10 ± 1,86 ¹	6,77 ± 0,19	463,10 ± 30,36	12,63 ± 0,46	48,10 ± 1,91	66,15 ± 1,03
PS 800	5,86 ± 0,11 ²	5,81 ± 0,49 ¹	442,15 ± 66,94	11,76 ± 0,57	46,70 ± 1,74	64,65 ± 1,19
PS800-SAT	7,63 ± 0,10	7,14 ± 0,11	445,47 ± 38,92	12,85 ± 0,45	50,27 ± 1,28	64,01 ± 1,05

Les valeurs représentent la moyenne ± ESM (n = 5). ¹p < 0,05 : différence significative par rapport au témoin normal ; ²p < 0,05 différence significative par rapport au témoin normal-satellite. **Nor** = animaux normaux recevant de l'eau distillée, **PS 200, PS 400 et PS 800** = Animaux normaux recevant l'extrait du duramen de *P. soyauxii* aux doses de 200, 400 et 800 mg/kg, **Nor-sat et PS 800-Sat** = Animaux normaux recevant respectivement de l'eau distillée et l'extrait de *P. soyauxii* à la dose de 800 mg/kg et privé de traitement pendant 14 jours après le traitement de 28 jours. **GB** = nombre de globules blancs par volume de sang ; **GR** = nombre de globules rouges ; **HGB** = Hémoglobine ; **HCT** = hématocrite ; **HCT** = Hématocrite ; **MCV** = Volume corpusculaire moyen, **PLT** = Nombre de plaquettes sanguines.

III.1.7.2.3- Effets de l'extrait aqueux de *P. soyauxii* sur quelques marqueurs sériques de la fonction hépatique et rénale au terme de l'administration en étude de toxicité subaiguë

Le tableau XXXVIII traduit les effets de l'administration subchronique de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* sur quelques marqueurs de la fonction hépatique et rénale. L'extrait de plante en comparaison aux animaux ayant reçu de l'eau distillée a entraîné à la dose de 800 mg/kg une augmentation significative de l'activité de l'ASAT ($p < 0,01$) et de l'ALAT ($p < 0,05$). Il a été noté aucune variation significative du taux de créatinine, d'acide urique, de la bilirubine totale et directe en comparaison aux animaux normaux recevant de l'eau distillée. Il n'a été noté aucune variation significative de la fonction hépatique et rénale évalués entre les animaux du lot satellite recevant l'extrait de plante à la dose de 800 mg/kg et les animaux normaux satellites.

Tableau XXXVIII: Effets de l'administration de l'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* sur quelques paramètres sériques de la fonction hépatique et rénale au terme de l'administration en étude de toxicité subaiguë

Paramètres Groupes	ASAT (UI/L)	ALAT (UI/L)	BIL-T (µmol/L)	BIL-D (µmol/L)	Créatinine (mg/dL)	Acide urique (mg/dL)
Nor	275,45 ± 6,05	177,92 ± 3,87	17,53 ± 0,67	4,65 ± 0,07	1,016 ± 0,021	1,45 ± 0,10
Nor-Sat	252,58 ± 13,20	166,36 ± 3,83	18,25 ± 0,37	4,43 ± 0,13	1,007 ± 0,011	1,43 ± 0,05
PS 200	287,35 ± 13,26	159,60 ± 2,52	18,33 ± 0,80	4,01 ± 0,06	0,934 ± 0,030	1,40 ± 0,03
PS 400	294,53 ± 9,85	185,15 ± 4,29	20,60 ± 0,44 ¹	4,96 ± 0,36	1,158 ± 0,051	1,42 ± 0,03
PS 800	340,08 ± 9,88 ²	194,76 ± 4,29 ¹	21,75 ± 0,46 ²	5,80 ± 0,26 ²	0,195 ± 0,025	1,62 ± 0,08
PS 800-Sat	294,01 ± 8,69	173,19 ± 4,30	19,69 ± 0,95	4,71 ± 0,10	0,996 ± 0,083	1,46 ± 0,02

Les valeurs représentent la moyenne ± ESM (n = 5). ²p < 0,01 : différence significative par rapport au contrôle Sham-operated ; ^ap < 0,05 différence significative par rapport au contrôle Ovx. **Nor** = animaux normaux recevant de l'eau distillée, **PS 200, PS 400 et PS 800** = Animaux normaux recevant l'extrait du duramen de *P. soyauxii* aux doses de 200, 400 et 800 mg/kg, **Nor-Sat et PS 800-Sat** = Animaux normaux recevant respectivement de l'eau distillée et l'extrait de *P. soyauxii* à la dose de 800 mg/kg et privé de traitement pendant 14 jours après le traitement de 28 jours. **ALAT** = Alanine aminotransférase, **ASAT** = Aspartate aminotransférase, **BIL-T** = Bilirubine totale, **BIL-D** = Bilirubine directe.

III.1.7.2.4- Effets de l'extrait aqueux de *P. soyauxii* sur la structure du rein, du poumon, de la rate et du foie au terme de l'administration en étude de toxicité subaiguë

La figure 76 présente les effets de l'extrait aqueux de *P. soyauxii* sur la structure du rein, de la rate, du poumon et du foie des rates normales. Les coupes histologiques du rein, du poumon, de la rate et du foie des animaux du groupe témoin normal et des animaux traités à l'extrait aqueux de *P. soyauxii* aux doses de 200, 400 et 800 mg/kg montrent une structure normale foie (parenchyme hépatique avec une veine centrolobulaire et des hépatocytes bien distincts), du rein (parenchyme normal avec un glomérule et un espace urinaire bien distincts), du poumon (Epithélium pulmonaire, sac alvéolaire et paroi musculaire bien distincts) et de la rate avec une pulpe blanche et une pulpe rouge.

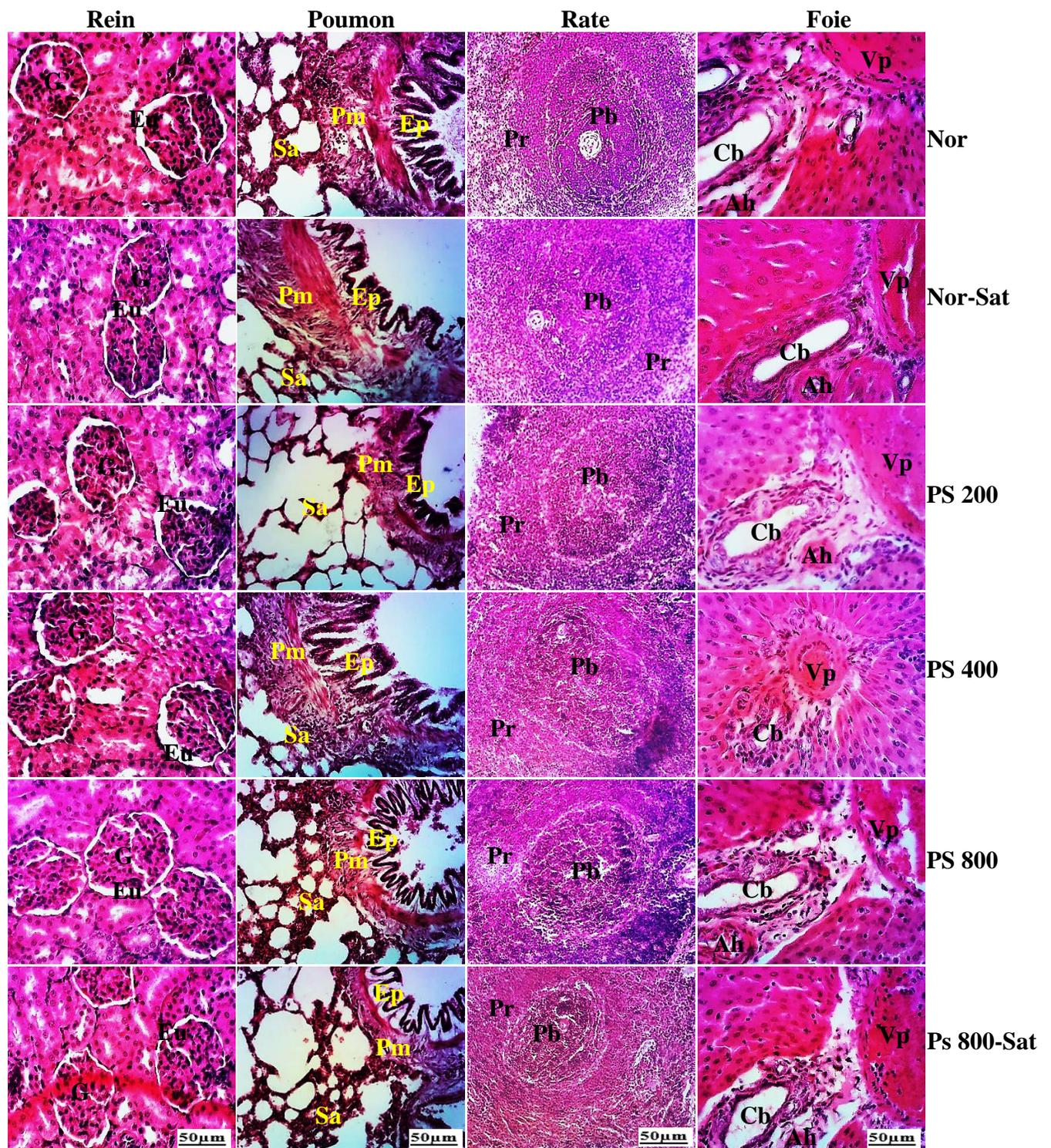


Figure 76: Effets de *Pterocarpus soyauxii* sur la structure du rein, du poumon, de la rate et foie (100X, H-E) et du rein (200X, H-E) au terme de l'administration en étude de toxicité subaiguë.

Nor = animaux normaux recevant de l'eau distillée, PS 200, PS 400 et PS 800 = Animaux normaux recevant l'extrait du duramen de *P. soyauxii* aux doses de 200, 400 et 800 mg/kg, Nor-sat et PS 800-sat = Animaux normaux recevant respectivement de l'eau distillée et l'extrait de *P. soyauxii* à la dose de 800 mg/kg et privé de traitement pendant 14 jours après le traitement de 28 jours.; Foie ; Vp = Veine porte ; He = Hépatocyte ; Cb = canalicule biliaire ; Rein ; G = Glomérule ; Eu = Espace urinaire; Poumon ; Pm = Paroi musculaire; Sa = sac alvéolaire ; Ep = épithélium pulmonaire; Rate ; Cg = centre germinal; Pb = pulpe blanche; Pr = pulpe rouge.

III.2- Discussion

La présente étude a eu pour objectif principal l'évaluation des effets des phyto-œstrogènes du duramen de *P. soyauxii* chez le rat *Wistar* sur quelques symptômes de la ménopause chez la rate *Wistar*.

L'appareil reproducteur féminin est la principale cible des œstrogènes. Leurs actions sont principalement médiées par leurs récepteurs intracellulaires spécifiques au niveau des cellules cibles (Gronemeyer, 1992). La diminution du taux de protéines utérines, de la masse relative de l'utérus et de l'épithélium utérin tant dans le test utérotrophique classique que dans le model ménopausique de 84 jours serait attribuable à la déficience œstrogénique due à la suppression des ovaires. Ces résultats sont similaires à ceux de Zingue *et al.* (2017), Oumarou *et al.* (2017) et à ceux de Mengue *et al.*, (2023) qui ont montré tour à tour une variation similaire des paramètres susmentionnés chez les rates ovariectomisées. En effet, il est bien connu que l'ovariectomie induit une diminution de l'expression de divers facteurs de croissance (EGF et IGF-1) nécessaires à la différenciation des cellules utérines (Westwood, 2008). L'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* aux doses de 200 et de 300 mg/kg a induit une augmentation de la taille de l'épithélium utérin, une augmentation de la masse relative de l'utérus ainsi que du taux de protéines utérines après trois jours de traitement dans le test utérotrophique classique. Ces effets sur l'utérus ont disparu dans le model ménopausique de 84 jours après un traitement de 28 jours à l'extrait de plante. *P. soyauxii* mimerait les effets des œstrogènes au niveau de l'utérus à court terme. Wang *et al.* (2000) ont établi que les RE α sont les plus exprimés au niveau de l'utérus. Mohamed et Abdel-Rahman. (2000) ont par contre montré une augmentation de l'expression des RE α suite à une ovariectomie à long terme. Ces données permettraient d'indiquer que l'action utérotrophique notée dans le test utérotrophique classique ne serait pas due préférentiellement à la liaison des molécules bioactives de *P. soyauxii* aux RE α de l'utérus. *P. soyauxii* augmenterait la masse relative de l'utérus en induisant une rétention d'eau au niveau de l'utérus comme il a été suggéré dans les travaux de Oumarou *et al.* (2017) et dans ceux de Zingue *et al.* (2014) qui ont montré que des plantes présentant une activité œstrogénique pouvaient induire une imbibition d'eau au niveau de l'utérus augmentant ainsi sa masse relative.

Outre l'utérus, le vagin constitue une autre cible primaire sur laquelle les œstrogènes agissent via leurs récepteurs. La prédominance des leucocytes et des cellules parabasales sur le frotti

vaginal, la diminution de la taille de l'épithélium vaginal, la suppression de la stratification et de la cornification de l'épithélium vaginal sont la résultante de la déplétion œstrogénique postovariectomie (Gallo *et al.*, 2005). En effet, il est connu que la suppression des ovaires chez les rates entraîne des modifications histo-morphologiques susmentionnées (Njamen *et al.*, 2008, Ngoungouré *et al.*, 2019, Mengue *et al.*, 2023). La déplétion œstrogénique serait responsable de la sécheresse vaginale et d'une atrophie vaginale ; ceci due à l'arrêt de la prolifération et de la maturation de l'épithélium vaginal. La cornification, la stratification du vagin, l'augmentation de la taille de l'épithélium vaginal et de la densité des cellules foliacées sur les frottis vaginaux tant dans le test utéro-trophique classique que dans le modèle ménopausique après traitement à l'extrait de plante traduiraient une activité vaginotrophique de *P. soyauxii* suite à un traitement aigu et chronique. Les travaux de Wang *et al.* (2000) ont montré que les RE β sont prédominant au niveau de l'épithélium vaginal. Les PE α auraient cependant une forte affinité de 30 fois supérieure pour les RE β que pour les RE α (Turner *et al.*, 2007). *P. soyauxii* au travers de ses métabolites bioactifs agirait via les RE β pour induire ses activités vaginotrophiques. L'analyse LC-MS a révélé la présence dans l'extrait de plante de l'acide linoléique qui est connu pour sa capacité à entraîner une cornification et une stratification du vagin (Saadat et Latiffah, 2013). Les flavonoïdes dont la concentration par gramme d'extrait selon l'analyse quantitative était de $63,42 \pm 2,16$ équivalent de quercétine et qui représentent la famille des phyto-œstrogènes les plus puissants (Choi *et al.*, 2008) seraient capables de se lier aux RE β induisant ainsi une activité vaginotrophique. Cette activité vaginotrophique RE β -dépendante des flavonoïdes a été confirmée dans les travaux de Guillermo *et al.* (2008).

Comme l'utérus et le vagin, la glande mammaire constitue une cible préférentielle des œstrogènes (Wayne *et al.*, 2000). Ils agiraient préférentiellement par les RE α qui induisent la prolifération des cellules épithéliales mammaires et le développement de la glande mammaire (Wayne *et al.*, 2000, Berry *et al.*, 2003, Feng *et al.*, 2007) mais moins sur les RE β qui régulent négativement l'action prolifératrice des œstrogènes au niveau mammaire (Cotrim *et al.*, 2013). La diminution du diamètre des acini mammaires ainsi que l'absence des sécrétions dans la lumière acinaire seraient donc liées à la déplétion œstrogénique. Ces résultats sont semblables à ceux de Zingue *et al.* (2017) et de Mengue *et al.* (2023) qui ont montré que l'ovariectomie entraînait chez les rates des modifications morphogéniques de la glande mammaire similaires à celles du présent travail. Il est clairement établi depuis des années que l'ovariectomie inhibe la prolifération des

cellules épithéliales mammaires et leur fonction sécrétoire (Berry *et al.*, 2003), ceci expliquerait l'absence des sécrétions colorables par l'éosine dans la lumière des acinis mammaires chez nos rates. L'induction des sécrétions éosinophiles dans la lumière des acinis mammaires dans le test utérotrophique classique et pas dans le modèle ménopausique suite au traitement traduirait que *P. soyauxii* aurait des effets mammothrophiques lors d'un traitement aigu et antiœstrogéniques sur la glande mammaire à la suite d'un traitement chronique. Les travaux de Berry *et al.* (2003) ont montré que l'ovariectomie augmente la proportion de cellules présentant des RE α au niveau de l'épithélium mammaire. Helguero *et al.* (2005) montrent par contre que les RE β une fois activés par un ligand inhibent la prolifération des cellules épithéliales de la glande mammaire et médient les effets des substances à activité anti-mammothrophiques. Les composés bioactifs de *P. soyauxii* auraient plus d'affinité avec les RE β à long terme expliquant la non variation de la taille des acinis mammaires chez les animaux traités à *P. soyauxii* par rapport au groupe Ovx dans le modèle ménopausique. L'analyse LC-MS a révélé la présence dans l'extrait de plante du mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) et des ptérostilbènes qui ont montré *in vitro* une activité antiœstrogéniques par inhibition de la prolifération des cellules MCF-7 via les RE α (Chi *et al.*, 2014, Da-Hye Kim *et al.*, 2019). L'acide linoléique, métabolite identifié dans l'extrait de plante, aurait aussi également une activité antiœstrogéniques en inhibant l'activation transcriptionnelle médiée par les éléments de réponse aux œstrogènes (ERE) et en régulant négativement l'expression des RE α (Jingbo et Neil, 2005). A court terme, *P. soyauxii* par ses métabolites bioactifs aurait induit la prolifération et l'activité sécrétoire des cellules épithéliales mammaires probablement par une voie parallèle aux RE α . Ces actions de *P. soyauxii* sur le vagin, l'utérus et la glande mammaire soulèveraient le caractère modulateur sélectif des métabolites de *P. soyauxii* vis-à-vis des REs ; avec une prédominance pour les RE β (Diel *et al.*, en 2004). Le type de récepteurs des œstrogènes prépondérants au niveau utérin et mammaire étant plutôt l'isotype α (Velders *et al.*, 2012). Cette sélectivité réceptorielle offrirait de ce fait une sécurité pour les femmes ménopausées qui n'ont pas subi d'hystérectomie et prédisposées au cancer du sein et de l'utérus vis-à-vis du THM (Grosse *et al.*, 2009).

Outre l'atrophie des organes génitaux, l'ovariectomie a entraîné à long terme, l'augmentation de la masse relative de la graisse abdominale, du gain pondéral et une dyslipidémie qui s'est accompagné d'une augmentation de l'index athérogénique. Ces résultats sont similaires avec ceux de Dzeufiet *et al.* (2015), Ngoungouré *et al.* (2017) et de Somayeh *et al.* (2018) qui ont

montré que l'ovariectomie comme modèle de ménopause chez les rongeurs était associée à une prise de poids, à une augmentation de la graisse viscérale, à une dyslipidémie ainsi qu'à une augmentation de l'index athérogénique. En effet, la déficience œstrogénique augmente l'activité de la lipoprotéine lipase, action qui est à l'origine d'une accumulation des acides gras dans le sang et donc d'une dyslipidémie (Park *et al.*, 2008). Durant le cycle œstral, on note une augmentation de la prise alimentaire et de la masse corporelle pendant l'ovulation, période durant laquelle le taux d'œstrogènes est très faible (Wade, 1976). Cette observation permet de montrer que les œstrogènes régulent négativement la prise alimentaire et le gain pondéral associé. Cela étant, l'augmentation de la masse corporelle et de la graisse abdominale chez les rates ovariectomisées seraient la résultante d'une augmentation d'une prise alimentaire et d'une accumulation des graisses au niveau du tissu adipeux (Roy et Wade, 1977, McElroy et Wade, 1987, Dzeufiet *et al.*, 2015). Il est par ailleurs établi que l'oxydation par les radicaux libres du LDL-Cholestérol serait à l'origine d'une athérosclérose (Kailash *et al.*, 1994). Ce mécanisme expliquerait l'élévation de l'index athérogène dans la présente étude où il a été noté chez les rates ovariectomisées une élévation du taux de MDA et une baisse du taux de GSH caractéristique d'un stress oxydant et une élévation du taux de LDL-Cholestérol. L'administration de l'extrait de plante a corrigé de manière significative en comparaison au témoin Ovx l'élévation de la graisse abdominale, de la masse corporelle ainsi que la dyslipidémie. Ces effets de l'extrait de plante pourraient être attribués au 3',5'-dimethoxy-4-Stilbenol encore appelé ptérostilbène dont la présence a été révélée dans l'extrait à l'aide de l'analyse LC-MS. En effet, les ptérostilbènes qui constituent une classe de PEs sont connus pour leurs effets antiadipogénique et hypotriglycéridémiant en inhibant la prolifération et la différenciation des cellules 3T3-L1 en adipocytes, l'accumulation des acides gras et l'expression de la Diacylglycerol O-acyltransferase 1 (DGAT1) qui est une enzyme responsable de la synthèse des triglycérides (Seo *et al.*, 2017). Par ailleurs, les ptérostilbènes sont connus pour entraîner une réduction de l'expression du "Peroxisome proliferator activated receptors γ " (PPAR γ) (Seo *et al.*, 2017) qui est incriminé dans les processus d'installation de la dyslipidémie (Barry et Gerald, 2010).

L'analyse des paramètres du statut oxydant a montré que 16 semaines après ovariectomie, les animaux présentaient une augmentation du taux de Malondialdéhyde (MDA), une diminution du taux de nitrites et du taux de glutathion réduit (GSH) dans l'aorte. En effet, l'ovariectomie est associée à une augmentation de l'activité de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

(NADPH) oxydase qui est une enzyme responsable de la formation des radicaux libres dans la mitochondrie (Alyson *et al.*, 2007). Cette production excessive des radicaux libres contribue fortement dans la pathogenèse de l'athérosclérose par oxydation des LDL-C (Kailash *et al.*, 1994), processus initiateur de la dysfonction endothéliale ; phénomène responsable de la baisse du taux de monoxyde d'azote (NO) dans l'aorte. Ce processus athérogénique constitue un état inflammatoire qui se matérialise dans le présent travail par des infiltrations leucocytaires sur les coupes de l'aorte chez les animaux Ovx. L'extrait aqueux du duramen de *Pterocarpus soyauxii* a inversé cette variation des paramètres du statut oxydant évalués ainsi que l'infiltration leucocytaire dans l'aorte aux doses de 100, 200 et de 300 mg/kg. Les ptérostilbènes et les flavonoïdes contenus dans cet extrait possèdent une activité antioxydante par réduction de l'expression de la NADPH oxydase et antiinflammatoire en inactivant le NF- κ B via une régulation à la baisse de l'expression du récepteur Toll like 5 (Zhang et Zhang, 2016). Ces activités expliqueraient l'absence sur les coupes de l'aorte des infiltrations leucocytaires et la réduction des taux de MDA et dont l'activité antioxydante de *P. soyauxii*. Les activités antioxydantes et antiinflammatoires de *P. soyauxii* réduiraient l'incidence de l'athérosclérose chez les femmes ménopausées. Selon plusieurs auteurs, les troubles du profil lipidique observés chez les femmes ménopausées ou chez les rates rendues ménopausées seraient la résultante des dommages hépatiques (Paquette *et al.*, 2007 ; Carla, 2015) induits par l'hypoestrogenie.

Il est bien connu que les femmes ménopausées qui ont des taux d'œstrogènes faibles en circulation manifestent des dysfonctionnements au niveau de certains organes comme le foie (Chen *et al.*, 2018). Le foie est l'organe central du métabolisme des hydrates de carbonnes, des protéines, des transaminases et des acides gras (Perla *et al.*, 2017). Ces fonctions sont assurées grâce à l'interaction de plusieurs facteurs comme les œstrogènes (Arrese et Soulages, 2010 ; Brian *et al.*, 2017). La hausse dans ce travail chez les rates Ovx par rapport aux rates *sham-operated* du taux de MDA hépatique et la baisse du taux de GSH traduisent un stress oxydant hépatique. L'augmentation de l'activité des transaminases au niveau sérique traduirait une cytolysse ou des nécroses hépatiques comme il a été suggéré par Limdiand et Hyde. (2003). Les transaminases sont de manière clinique, des bons marqueurs biochimiques pour déceler une dysfonction hépatique lorsque leurs taux sont élevés (Reham et Mohammad, 2015). Ces différentes altérations pourraient être attribuées à la déficience œstrogénique post-ovariectomie. En effet, il a été démontré dans plusieurs travaux expérimentaux que la ménopause induite par une ablation bilatérale et

chirurgicale des ovaires entraînait des dysfonctions hépatiques pouvant se traduire par un stress oxydant et une élévation de la concentration des transaminases sériques (Yeon *et al.*, 2018). Les travaux de Hamden *et al.* (2009) ont montré que la déficience œstrogénique induisait une perturbation du statut oxydant hépatique induisant ainsi la production des espèces réactives oxygénées. Ces dommages oxydatifs ont été confirmés sur le plan histologique avec la présence des infiltrations leucocytaires hépatique ; signe d'une inflammation sur les coupes histologiques des animaux ovariectomisés recevant de l'eau distillée. *Pterocarpus soyauxii* a réduit le stress oxydant hépatique, l'augmentation du taux de transaminase et a prévenu contre les infiltrations leucocytaires hépatiques chez les rates ovariectomisées. L'extrait de plante aurait des effets hépatoprotecteurs par son pouvoir antioxydant et ou phyto-œstrogénique. L'analyse LCMS et phytochimique quantitative ont montré que *P. soyauxii* possède des composés phénoliques comme le pterostilbene et des flavonoïdes qui sont doués d'activité antioxydante par réduction de l'expression de la NADPH oxydase (Zhang, 2016). Il est établi que certains PEs de la classe des flavonoïdes peuvent activer les récepteurs spécifiques des œstrogènes ; stimulant de ce fait l'expression des gènes impliqués dans la défense antioxydante au niveau hépatique (Pilšáková *et al.*, 2010).

La déficience œstrogénique se manifeste par des troubles mnésiques, anxieux, dépressif et un stress oxydant cérébral (Singh *et al.*, 1994, Ngoungoure *et al.*, 2019). La perte de la mémoire à long et à court terme matérialisé respectivement par la diminution de l'index de reconnaissance dans le test de reconnaissance du nouvel objet et l'augmentation du temps à retrouver le cadran cible dans le "Water Morris Maze" seraient attribués à la perte œstrogénique due à l'ovariectomie. Ces résultats sont similaires à ceux de Julio *et al.* (2008). En effet, les œstrogènes sont connus pour avoir un effet neuromodulateur et neuroprotecteur au niveau de l'hippocampe (Suzuki *et al.*, 2006, Saravia *et al.*, 2007). La chute drastique du taux d'œstrogène par l'ovariectomie dans la présente étude serait à l'origine des troubles mnésiques observés. L'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* aux doses de 200 et de 300 mg/kg a corrigé ces troubles mnésiques. *P. soyauxii* aurait une activité mnésique. Cette propriété serait attribuée à son activité œstrogénique car certains PEs corrigeraient les troubles mnésiques (File *et al.*, 2002). Le potentiel antioxydant cérébral de *P. soyauxii* pourrait contribuer à inverser la diminution des neurones aux niveaux CA1 et CA3. Les travaux de Jamiyu *et al.* (2016) ont mis en lumière le pouvoir antioxydant cérébral et anticholinestérasiques des feuilles de *Pterocarpus soyauxii* ce qui expliquerait le pouvoir

antiamnésique de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* compte tenu de l'ubiquité des métabolites secondaires actifs dans les différentes parties de la plante.

Outre les troubles mnésiques, l'ovariectomie a entraîné une augmentation du temps de latence à mordre l'aliment dans un environnement aversif dans le test d'alimentation supprimé par la nouveauté et a également entraîné une diminution du temps de nage et d'escalade ainsi qu'une augmentation du temps d'immobilité dans le test de nage forcée chez les animaux Ovx en comparaison au contrôle "Sham-operated". Cette variation des paramètres comportementaux évalués dans le test de la nage forcée et de l'alimentation supprimée par la nouveauté traduit un état d'anxiété et de dépression chez les animaux Ovx. Les travaux de Maryvonne le saux. (2007) ont montré que l'ovariectomie entraîne une anxiété à travers la diminution du taux de GABA et une augmentation de la neurotransmission glutamatergique. Cynthia *et al.* (2011) ont révélé que l'ovariectomie entraînait une dépression en diminuant le nombre de neurones sérotoninergiques ainsi que la concentration cérébrale de sérotonine. L'extrait de *P. soyauxii* a diminué le temps d'immobilité et le temps de latence à mordre l'aliment dans l'environnement aversif et a par ailleurs diminué le taux de calcium dans le cerveau et augmenté celle du magnésium. Cette variation des paramètres comportementaux et des taux de calcium et de magnésium cérébral suggérerait un effet anxiolytique et antidépresseur de *P. soyauxii*. Ces effets de *P. soyauxii* s'expliqueraient par la capacité de certains phytoestrogènes de la classe des flavonoïdes à réduire les troubles comportementaux chez des rates ovariectomisées (Juan *et al.*, 2017). Le stress oxydant jouerait un rôle majeur dans la physiopathologie des troubles nerveux et dans le processus de mort neuronale (Markesbery, 1997). L'ovariectomie a entraîné dans le présent travail un stress oxydant cérébral marqué par une élévation du taux de MDA et une diminution du taux de GSH et du nombre de neurones aux niveaux CA1 et CA2 de l'hippocampe. Ces résultats sont similaires à ceux de Julio *et al.* (2008) et de Ngoungoure *et al.*, (2019) qui ont montré que l'ovariectomie entraînait une élévation du taux de MDA, une baisse du taux de GSH dans le cerveau et des morts neuronales. La déficience œstrogénique serait à l'origine de cette excitotoxicité et d'une activation de la NADPH oxydase qui sont des processus générateurs des espèces réactives oxygénées dans le cerveau (Alyson *et al.*, 2007). *P. soyauxii* a prévenu la baisse du nombre de neurones hippocampiques, a réduit le taux de MDA et augmenté celui de GSH. Cette inversion du sens de variation du taux de MDA et de GSH suggère un effet antioxydant et neuroprotecteur de l'extrait de plante. Cette activité antioxydante a été confirmée *in vitro* par l'inhibition du radical DPPH et

ABTS avec des IC₅₀ de 730,20 et de 892,90 µg/mL respectivement. Cette activité antioxydante *in vitro* ou *in vivo* et cytoprotecteur cérébral serait lié à la richesse de l'extrait de plante en composés phénoliques qui sont doués d'une activité antioxydante (Quevedo *et al.*, 2002).

L'ovariectomie a entraîné une diminution significative de la masse relative du fémur et de sa densité comparativement aux animaux "sham-operated". En effet, les œstrogènes sont connus pour induire l'apoptose des ostéoclastes et la prolifération des ostéoblastes. Ces actions augmentent la synthèse de la matrice osseuse, sa masse et sa densité (Turner *et al.*, 1990, Kameda *et al.*, 1997, Turner, 1999). Braun *et al.* (2011) ont mentionné qu'une augmentation du stress oxydant en cas d'hypo-œstrogénie était liée à la mort des ostéoblastes. En fait, les espèces réactives de l'oxygène stimulent l'ostéoclastogénèse (Kim *et al.* 2006) favorisant la perte osseuse. La hausse significative du taux de MDA pourrait être considérée comme un indice de stress oxydant et de mort cellulaire. Ce résultat est similaire à ceux d'autres travaux qui ont montré que la carence en œstrogènes chez les rates ovariectomisées entraînait une baisse de la masse relative et la densité du fémur (Patsaki *et al.*, 2016, Oumarou *et al.*, 2017). L'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* a augmenté la densité et la masse relative du fémur. Ce résultat traduirait une activité antirésorptrice de la plante. L'analyse LC-MS a révélé que *P. soyauxii* possède de l'acide linoléique ; molécule capable de prévenir la perte osseuse en stimulant l'expression de l'ostéoprogénine (OGP) et en inhibant celle de la RANKL chez les animaux ovariectomisés (Rahman *et al.*, 2014). La perte osseuse dans de nombreuses études est mise en évidence par une augmentation du calcium, du phosphore, de l'activité de la PAL dans le sang et l'urine et du rapport calcium/créatinine urinaire (Alavizadeh et Hosseinzadeh, 2014). D'autres travaux expliquent également l'installation de l'ostéoporose par une baisse des concentrations osseuses du calcium, du phosphore et de l'activité de la PAL (Chitme *et al.*, 2009, Oumarou *et al.*, 2017). L'ovariectomie a dans le même sens fait varier les marqueurs biochimiques (sériques, osseux et urinaires) du métabolisme osseux dans le présent travail. Ces résultats sont similaires à ceux de Oumarou *et al.* (2017). En effet, l'activité de la phosphatase alcaline osseuse est un marqueur biochimique de l'activité ostéoblastique qui est associée à la formation osseuse (Hewitt *et al.*, 2003). La hausse du taux de calcium et de phosphore sérique traduirait un défaut de minéralisation osseuse dû à l'ostéoporose. Ces résultats sont soutenus dans la présente étude par l'augmentation de l'index d'ostéolyse (calcium urinaire/créatinine urinaire) chez les animaux ovariectomisés. L'extrait de plante a inversé le sens de variation des marqueurs biochimiques du métabolisme osseux

comparativement aux rates ovariectomisées recevant l'eau distillée. En effet, selon les travaux de Rassi *et al.* (2002), les PEs auraient une action positive sur la minéralisation osseuse, la différenciation ostéoblastique, l'inhibition de l'activité ostéoclastique et stimuleraient l'activité de la phosphatase alcaline (Vergne *et al.*, 2008). Ces actions attribuées aux PEs expliqueraient l'activité antiostéoporotiques de *P. soyauxii* du fait de sa richesse en PEs (Bezuidenhoudt *et al.*, 1987, Su *et al.*, 2014) sur le métabolisme phospho-calcique fémoral. La présence de l'acide linoléique dans le duramen de *P. soyauxii* expliquerait mieux cette activité ostéoprotectrice sur les marqueurs du métabolisme osseux. Rahman *et al.* (2014) ont mis en lumière la capacité de l'acide linoléique à diminuer la concentration des marqueurs biochimiques sériques de la résorption osseuse chez les animaux ovariectomisés présentant une ostéoporose ménopausique.

L'inflammation peut contribuer à l'ostéoporose (Yun et Lee, 2004). Les résultats de la présente étude montrent une élévation significative de nitrites osseux ; substitut du NO. L'analyse des paramètres hématologiques a également révélé une augmentation du taux de globules blancs, chez les rates Ovx recevant de l'eau distillée par rapport aux rats *sham-operated*. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Seif. (2014) dans lesquels l'ovariectomie avait entraîné une augmentation du taux de nitrites. Le même travail émettait l'hypothèse selon laquelle les nitrites produits suite à l'ovariectomie proviendraient de l'activité macrophagique et constitueraient un signe de l'inflammation osseuse. En effet, l'inflammation sur le plan humoral se manifeste par une surproduction de cytokines qui peuvent augmenter l'ostéoclastogenèse et la perte osseuse (Nakchbandi et Van der Merwe, 2009). Ces cytokines activeraient la NO synthase inducible (iNOS) qui n'est exprimé qu'en réponse à des stimuli inflammatoires (Van't Hof et Ralston, 2001). Cela pourrait être une explication possible à l'augmentation significative du taux de nitrites détectée chez les rats Ovx dans la présente étude. L'extrait du duramen de *P. soyauxii* à toutes les doses a diminué comparativement aux rates Ovx le taux de nitrites osseux et a diminué de manière non significative le taux de globules blancs. En effet, la richesse de l'extrait de plante en acide linoléique selon l'analyse LC-MS expliquerait mieux ce mécanisme ostéoprotecteur car selon Rahman *et al.* (2006, 2007), l'acide linoléique inhibe dans des modèles murins d'ostéoporose ménopausique, la production des cytokines inflammatoires qui sont cependant des messagers pour le recrutement et la différenciation des ostéoclastes (Barbour *et al.*, 2012).

Outre les processus inflammatoires, le stress oxydant constitue un facteur important dans la pathogenèse de l'ostéoporose ; laquelle se manifeste dans de nombreuses études par des altérations structurales du fémur et du tibia. Dans le présent travail, l'analyse des marqueurs du statut oxydant a révélé dans les homogénats du fémur, une augmentation du taux de MDA et une baisse du taux de GSH chez les animaux Ovx comparativement aux animaux *Sham-operated* ; ce qui traduit un stress oxydant fémoral chez les rates Ovx. Ce stress oxydant était corrélé à une apparition sur les coupes histologiques du fémur et du tibia des lacunes de résorption. Ce stress oxydant osseux serait lié à la déficience œstrogénique post ovariectomie (Das, 2002). Ce résultat est similaire à celui de Oumarou *et al.* (2017) qui ont rapporté que l'ovariectomie entraînait chez les rates, un stress oxydant osseux marqué par une augmentation du taux de MDA et une baisse du taux de GSH mais également une apparition des lacunes de résorption sur les coupes histologiques du fémur. Oumarou *et al.*, (2017) ont rapporté que l'ovariectomie chez les rats entraînait également une discontinuité de l'os trabéculaire du tibia. En effet, les espèces réactives de l'oxygène formées dans des conditions d'hypo-œstrogénie stimuleraient la formation et l'activité des ostéoclastes, une diminution de la fonction ostéoblastique (Ahmad *et al.*, 2005), du recrutement des ostéoblastes et de la synthèse du collagène (Takeuchi *et al.*, 1997). La forte activité ostéoclastique stimulée par les radicaux libres expliquerait les altérations structurales du fémur et du tibia dans la présente étude. L'administration de l'extrait de plante a inversé le sens de variation des taux fémoraux de GSH et de MDA et a prévenu les altérations structurales du fémur par rapport aux rates Ovx. L'extrait aurait donc une activité antioxydante et cytoprotectrice sur les cellules osseuses et protégerait l'os contre les dommages osseux induits par les radicaux libres. En effet, les ptérostilbènes présents dans l'extrait de plante possèdent une activité antioxydante par réduction de l'expression de la NADPH oxydase (Zhang, 2016). Cette activité expliquerait les effets protecteurs de *P. soyauxii* sur l'os. Bien que les plantes aux effets œstrogéniques soient souvent utilisées pour prendre en charge les troubles ménopausiques, il n'en reste pas moins que leur usage chez les femmes préménopausées pourrait impacter négativement la physiologie de leur fonction de reproduction compte tenu du caractère perturbateur endocrinien des PEs.

Les effets de *P. soyauxii* sur quelques paramètres de la fonction de reproduction chez les rates normales ou préménopausées ont également été investigués. La diminution de la taille des différents épithélia vaginal et utérin chez les rates ayant reçu l'extrait de *P. soyauxii* serait liée à la baisse du taux d'œstrogènes ; hormones réputées pour avoir une activité vaginotrophiques par

stratification et cornification de l'épithélium vaginal ; utérotrophique par augmentation de la taille de l'épithélium utérin et du taux de protéines utérines (Boettiger *et al.*, 1946). Cette baisse du taux d'œstrogènes pourrait s'expliquer par un rétrocontrôle négatif induit par les stimuli œstrogéniques sur l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien. En effet, il est établi que les PEs sont capables d'inhiber par leur liaison aux REs hypothalamiques, la production de GnRH, de LH, FSH et par ailleurs d'œstrogènes (Arispe *et al.*, 2013). La diminution dans ce travail du taux de LH, de FSH et d'œstrogènes serait en accord avec ces hypothèses. Ces effets sont similaires à ceux d'autres plantes aux effets œstrogéniques (Devendra *et al.*, 2009) qui ont réduit les taux sériques de FSH, de LH et d'oestradiol par rétrocontrôle négatif au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire chez les rates saines. La diminution du nombre de follicules totaux, de la masse relative de l'ovaire et des protéines ovariennes serait en accord avec la baisse du taux de FSH et d'oestradiol suite à l'exposition à *P. soyauxii*. En effet, le développement folliculaire est un processus complexe et dynamique qui requiert une interaction coordonnée de différents facteurs extra et intraovariens (Richards, 2001, Richards *et al.*, 2002). Les gonadostimulines hypophysaires et principalement la FSH sont connues pour induire la folliculogénèse et la croissance ovarienne avec production des œstrogènes (Hannah et Kenneth, 1980). La baisse de la biodisponibilité des gonadostimulines entraînée par *P. soyauxii* dans ce travail expliquerait les dysfonctionnements ovariens observés. Par ailleurs, l'analyse LCMS rapporte que l'extrait de plante contient le mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP). Les phthalates ainsi que leurs dérivées sont citées pour induire une perturbation de la fonction de reproduction féminine (Hannon *et al.*, 2015). Ils inhibent en effet, la production des stéroïdes dans les follicules ovariens, induisent l'atrésie folliculaire et inhibent l'axe hypothalamo-hypophysaire et par conséquent la libération des gonadostimulines (Liu *et al.*, 2014, Hannon *et al.*, 2015). *P. soyauxii* chez les femmes saines aurait donc une activité perturbatrice endocrinienne qui impacterait négativement la physiologie de la fonction de reproduction et impliquerait de ce fait un control de son usage chez les femmes en âge de procréer.

La dernière partie de ce travail a consisté à évaluer le profil toxicologique aiguë et subchronique de l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* chez les rates. Elle a été faite en deux étapes : l'évaluation des effets toxiques suite à l'administration d'une dose élevée unique de 2000 et de 5000 mg/kg et l'évaluation de la toxicité induite suite à un gavage répété avec l'extrait aux doses de 200, 400 et 800 mg/kg pendant 28 jours. L'administration d'une dose unique de 2000 mg/kg ou de 5000 mg/kg de l'extrait aqueux de *P. soyauxii* n'a causé aucun décès chez les rates.

Ce résultat suggère que la dose létale 50 (DL₅₀) est supérieure à 5000 mg/kg. *P. soyauxii* serait donc selon les recommandations de l'OECD 423 faiblement toxique car sa DL₅₀ est supérieure à la dose de 2000 mg/kg. De manière générale, *P. soyauxii* n'a induit aucune variation significative du poids corporel et du poids relatif des différents organes. L'analyse des paramètres biochimiques révèle une augmentation significative de l'activité de l'ALAT, de l'ASAT, de la bilirubine totale et directe chez les animaux traités avec *P. soyauxii* à la dose 800 mg/Kg. Cette hausse des marqueurs de la fonction hépatique traduirait une possible hépatotoxicité de l'extrait de plante à des doses très élevées car ces paramètres constituent lorsqu'ils sont élevés de manière significative des indicateurs très sensible de l'hépatotoxicité (Al-Habori *et al.*, 2002). *P. soyauxii* a induit une diminution significative des taux de globules rouges et de lymphocytes à 800 mg/kg. Cette baisse pourrait être liée à une possible présence dans cet extrait d'une substance à effet hémolytique et immunosuppresseur (Gomé *et al.*, 2011). L'administration de *P. soyauxii* a induit une augmentation du taux de globules blancs et de lymphocytes ce qui suggère que *P. soyauxii* aurait des effets immunostimulateurs à la dose thérapeutique.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La présente étude a eu pour objectif principal, l'évaluation des effets des phyto-œstrogènes du duramen de *P. soyauxii* sur quelques symptômes de la ménopause chez la rate Wistar. Il y ressort que, *P. soyauxii*, aurait des propriétés œstrogéniques du fait de sa capacité à induire chez les rates ovariectomisées dans un test utérotrophique de 3 jours, une stratification et une cornification de l'épithélium vaginal, augmenter la taille de l'épithélium utérin et les sécrétions éosinophiles au niveau de la glande mammaire. Sur le syndrome ménopausique, *P. soyauxii* a induit une activité vaginotrophique et n'a pas eu des effets utérotrophique et mammothrophique après 28 jours de traitement. Ce qui traduit le caractère tissu sélectif des métabolites secondaires de *P. soyauxii*. L'extrait de *P. soyauxii* aurait un effet neuroprotecteur en induisant des effets anxiolytique, antidépresseur et mnésique, en prévenant les altérations structurales du cortex cérébral et de l'hippocampe et en corrigeant les fluctuations des taux de certains neurotransmetteurs. *P. soyauxii* aurait des effets cardioprotecteurs en corrigeant la dyslipidémie, en protégeant le foie et l'aorte des dommages induits par la carence en œstrogènes. Les effets ostéoprotecteurs de *P. soyauxii* ont été marqués dans ce travail par la capacité de l'extrait de *P. soyauxii* à corriger les altérations du métabolisme phosphocalcique et à prévenir les dommages de la structure du fémur et du tibia. *P. soyauxii* exercerait ces effets chez les rates ovariectomisées via ses composés bioactifs œstrogéniques dont la présence a été mise en évidence par des analyses phytochimiques qualitatives et quantitatives. En outre, les effets protecteurs induits par l'extrait contre les symptômes de la ménopause seraient aussi liés au potentiel antioxydant exercé par *P. soyauxii* tant *in vivo* par la normalisation des taux de certains marqueurs du statut oxydant que *in vitro* vis-à-vis des radicaux DPPH, ABTS et FRAP. Cette propriété serait aussi liée aux PES présents dans l'extrait. Chez les rates normales, l'extrait aqueux du duramen de *P. soyauxii* a réduit les taux des hormones hypophysaires (LH et FSH) et ovariennes (oestradiol) et a perturbé la folliculogénèse en réduisant le nombre de certaines classes de follicules ovariens. Ceci traduisant une activité perturbatrice endocrinienne bien connue des PES.

L'extrait aqueux de *P. soyauxii* semble non toxique en prise unique car l'étude de la toxicité aiguë de cet extrait a montré que sa dose létale 50 était supérieure à 5000 mg/kg. Pour ce qui est de l'étude de la toxicité subchronique, les résultats ont montré que la prise prolongée de l'extrait aqueux de *P. soyauxii* aux doses de 800 mg/kg affecterait l'activité de l'ALAT, d'ASAT, de bilirubine directe et totale. A cette même dose il a été noté une baisse du taux de globules blancs et rouges. Il a aussi été noté qu'à la dose thérapeutique (200 mg/kg), *P. soyauxii* ne présente aucun

effet toxique. Les effets toxiques présentés par *P. soyauxii* à 800 mg/kg sur les taux sériques des marqueurs biochimiques de la fonction hépatique ont disparus deux semaines après le traitement.

Les résultats obtenus justifient l'usage en médecine traditionnelle de *P. soyauxii* pour la prise en charge des aménorrhées et des troubles ménopausiques en tant que plante aux effets œstrogéniques. Cependant *P. soyauxii* devrait être limitée d'usage chez les femmes pré ou non ménopausées présentant un désir de procréer.

Afin d'avoir d'amples informations sur cette plante, nous nous proposons dans l'avenir de :

- ✓ évaluer la sélectivité réceptorielle de l'extrait aqueux de *P. soyauxii* et ses métabolites *in vivo* et *in vitro* par antagonisation des récepteurs aux œstrogènes α et β ;
- ✓ évaluer le profil toxicologique chronique de l'extrait aqueux de *P. soyauxii* ;
- ✓ préparer un Médicament Traditionnel Amélioré (MTA) à partir de l'extrait aqueux.

RÉFÉRENCES

- Abdul R, Bushra H.** (2010). Serum γ -glutamyltransferase as oxidative stress marker in pre-and postmenopausal Iraqi women. *Oman Medical Journal*, 25: 286-288.
- Abraham G, Odell W, Swerdloff R, Hopper K.** (1972). Simultaneous radioimmunoassay of plasma FSH, LH, progesterone, 17-hydroxyprogesterone and estradiol-17 β during the menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolisms*, 34: 312-318.
- Abramson B, Melvin R.** (2014). Cardiovascular risk in women: focus on hypertension. *Canadian Journal of Cardiology*. 30: 553-559.
- Adams N.** (1995). Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *Journal of Animal Science*, 73 : 1509-1515.
- Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA).** (2005). Sécurité et bénéfices des phyto-estrogènes apportés par l'alimentation – Recommandations, 440p.
- Aguiar R, Dickel O, Cunha R, Monserrat J, Barros D, Martinez P.** (2006). Estradiol valerate and tibolone: effects on memory. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 85: 689-696.
- Ahmad N, Khalid B, Luke D, Nirwana S.** (2005). Tocotrienol offers better protection than tocopherol from free radical-induced damage of rat bone. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 32:761-770.
- Al-Anazi A, Qureshi V, Javaid K, Qureshi S.** (2011). Preventive effects of phytoestrogens against postmenopausal osteoporosis as compared to the available therapeutic choices: An overview. *Journal of National Science, Biology and Medicine*. 2: 154-163.
- Alavizadeh H, Hosseinzadeh H.** (2014). Bioactivity assessment and toxicity of crocin: a comprehensive review. *Food and Chemical Toxicology*, 64: 65-80.
- Alena L, Mingming Z, Nathalie C, Mark S, Joshua A, Jasmine H, Maria B, Josko L, Mark D.** (2003). Altered depression-related behaviors and functional changes in the dorsal raphe nucleus of serotonin transporter-deficient mice. *Biological Psychiatry*, 54: 960-971.
- Al-Habori M, Al-Aghbari A, Al-Mamary M, Baker M.** (2002). Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long-term feeding experiment in animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 83:209-217.

- Alyson A, Grant R, Anja E, Harald H, Christopher G.** (2007). Effect of gender on NADPH-oxidase activity, expression, and function in the cerebral circulation role of estrogen. *Stroke*, 38: 2142-2149.
- Amantea D, Russo R, Bagetta G, Corasaniti M.** (2005). From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens. *Pharmacology Research*, 52: 119-132.
- An J, Tzagarakis-Foster C, Scharschmidt T, Lomri N, Leitman D.** (2001). Estrogen receptor b-selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by phytoestrogens. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 17808-17814.
- Andrzej B, Estera K, Alicja R.** (2014). In search of memory tests equivalent for experiments on animals and human. *Medical Science Monitor*, 20: 2733-2739.
- Angiosperm Phylogeny Group (APG).** (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181: 1-20.
- Arispe S, Adams B, Adams T.** (2013). Effect of phytoestrogens on basal and GnRH-induced gonadotropin secretion. *Journal of Endocrinology*, 28: 243-250.
- Arrese E, Soulages J.** (2010). Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology*, 55: 207-225.
- Asenzi D, Boceli A, Marino M.** (2006). Structure-function relationship of estrogen receptor α and β : impact on human health. *Molecular Aspects of Medicine*. 27: 299-402.
- Ayoola G, Coker H, Adesegun S, Adepoju-Bello A, Obaweya K, Ezennia E, Atangbayila T.** (2008). Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in southwestern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7: 1019-1024.
- Balick M, Paul A.** (1996). Plants that heal, in their plants, people, and culture; the Science of ethnobotany. *New York, Scientific American Library*, 1: 25-61.
- Bang O, Hong H, Kim D, Kim H, Boo J, Huh K, Mook-Jung I.** (2004). Neuroprotective effect of genistein against beta amyloid-induced neurotoxicity. *Neurobiology of Disease*, 16: 21-28.

- Bansal R, Aggarwal N.** (2019). Menopausal Hot Flashes: A Concise Review. *Journal of mid-life health*, 10: 6-13.
- Barbour K, Boudreau R, Danielson M, Youk A, Wactawski-Wende J, Greep N, LaCroix A, Jackson R, Wallace R, Bauer D, Allison M, Cauley J.** (2012). Inflammatory markers and the risk of hip fracture: The Women's Health Initiative. *Journal of Bone and Mineral Research*, 27: 1167-1176.
- Barend C, Bezuidenhout E, Vincent B, Daneel F.** (1987). Flavonoid analogues from *Pterocarpus* species. *Phytochemistry*, 26: 531- 535.
- Barry J, Gerald J.** (2010). PPAR- γ agonists, insulin resistance and dyslipidemia: not a simple relationship. *Clinical Lipidology*, 5: 509-525.
- Benzie I, Strain.** (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239 : 70-76.
- Berdah S.** (2010). Freins à l'arrêt du traitement hormonal de la ménopause chez les femmes l'utilisant au-delà de la durée préconisée. *Thèse de doctorat en médecine. Paris 7 : Université de Paris Diderot*, 183 p.
- Berry S, Jobst P, Ellis S, Howard R, Capuco A, Akers R.** (2003). Mammary epithelial proliferation and estrogen receptor α expression in prepubertal heifers: effects of ovariectomy and growth hormone. *American Dairy Science Association*. 86: 2098-2105.
- Betti J, Lejoly J.** (2009). Contribution to the knowledge of medicinal plants of the Dja Biosphere Reserve, Cameroon: Plants used for treating jaundice. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3: 1056-1065.
- Betti J.** (2004). An ethnobotanical study of medicinal plants among the Baka pygmies in the Dja biosphere reserve, Cameroon. *African Study Monographs*, 25: 1-27.
- Bezuidenhout B, Brandt E, Ferreira D.** (1987). Flavonoid analogues from *Pterocarpus* species. *Phytochemistry*, 26:531-535.
- Bhurosy T, Jeewon R.** (2013). Food habits, socioeconomic status and body mass index among premenopausal and post-menopausal women in Mauritius. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 1:114-22.

- Boettiger E.** (1946). Changes in the glycogen and water contents of the rat uterus. *Journal of Cellular Physiology*, 27: 9-13
- Bowers J, Tyulmenkov V, Jernigan S, Klinge C.** (2000). Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors α and β . *Endocrinology*, 141: 3657-3667.
- Brandenberger A, Tee M, Lee J, Chao V, Jaffe R.** (1997). Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the midgestational human fetus. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82: 3509-3512.
- Braun K, Ehnert S, Freude T, Egaña J, Schenck T, Buchholz A, Schmitt A, Siebenlist S, Schyschka, L, Neumaier M, Stöckle U, Nussler A.** (2011). Quercetin protects primary human osteoblasts exposed to cigarette smoke through activation of the antioxidative enzymes HO-1 and SOD-1. *Scientific World Journal*, 11: 2348-2357.
- Brian T, Lin Z, John M.** (2017). Estrogens in the regulation of liver lipid metabolism. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1043: 227-256.
- Brinton R.** (2012). Minireview: translational animal models of human menopause: challenges and emerging opportunities. *Endocrinology*, 153: 3571-3578
- British Menopause Society.** (2020) "HRT: Benefits and risks". *Women's health concern fact sheet. Information for women.* 4p.
- Broadhurst R, Jones W.** (1978). Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*; 48: 788-794.
- Carla W.** (2015). Liver disease in menopause. *World Journal of Gastroenterology*, 21: 7613-7620.
- Cassidy A, Bingham S, Setchell K.** (1995). Biological effects of isoflavones in young women: Importance of the chemical composition of soya bean products. *British Journal of Nutrition*, 74: 587-601.
- Cederroth C, Zimmermann C, Nef S.** (2012). Phytoestrogens and their impact on reproductive health. *Molecular and cellular endocrinology*, 355: 192-200.
- Charkoudian N, Stachenfeld N.** (2016). Sex hormone effects on autonomic mechanisms of thermoregulation in humans. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 196: 75-80.

- Chen G, Oliver R, Leung B, Lin L, Yeh J.** (1999). Estrogen receptor alpha and beta expression in the vaginal walls and uterosacral ligaments of premenopausal and post-menopausal women. *Fertil Steril*, 71: 1099-10102.
- Chen W, Manson J, Hankinson S, Rosner B, Holmes M, Willet W, Colditz G.** (2006). Unopposed estrogen therapy and risk for invasive breast cancer. *Archives Internal Medicine*, 166: 1027-1032.
- Chi P, Yiwang, L, Jun W, Zhaoyi H, Jianjin Z, Suzhan, D.** (2014). Ling, Estrogen receptor- α 36 is involved in pterostilbene induced apoptosis and anti-proliferation in *in vitro* and *in vivo* breast cancer. *PLoS ONE*, 9: 1-8.
- Chiang S-S, Pan T.** (2013). Beneficial effects of phytoestrogens and their metabolites produced by intestinal microflora on bone health. *Applied microbiology and biotechnology*, 97: 1489-1500.
- Chitme H, Muchandi I, Burli S.** (2009). Effect of *Asparagus racemosus* Willd root extract on ovariectomized rats. *The Open Natural Products Journal*, 2: 16-23.
- Choi M, Yang J, Seo J, Kim Y, Kang S.** (2021). Prevalence and diagnosis experience of osteoporosis in postmenopausal women over 50: Focusing on socioeconomic factors. *PLoS ONE*, 16: e02480.
- Choi S, Ha T, Ahn T, Kim S, Kang K, Hwang I, Kim S.** (2008). Estrogenic activities of isoflavones and flavones and their structure-activity relationships. *Planta Medica*, 74: 25-32.
- Chun O, Kim D, Lee C.** (2003). Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:8067-8072.
- Clarck W, Balinski S, Marie S, Zac B.** (1975). Spectrometric study of a direct determination of serum calcium. *Microchemical Journal*, 1: 22-23.
- Conley A, Hinshelwood M.** (2001). Mammalian aromatases. *Reproduction*, 121, 685-695.
- Cornwell T, Cohick W, Raskin I.** (2004). Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry*, 65: 995-1016.

- Cotrim C, Fabris V, Doria M.** (2013). Estrogen receptor beta growth-inhibitory effects are repressed through activation of MAPK and PI3K signaling in mammary epithelial and breast cancer cells. *Oncogene*, 32 : 2390-2402.
- Courbiere B, Carcopino X.** (2010). Gynécologie-Obstétrique. *Paris : Vernazobres-Grego*, 573p.
- Couse F, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson J, Korach K.** (1997). Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- α (ER α) and estrogen receptor- β (ER β) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER α -knockout mouse. *Endocrinology*, 138: 4613-4621.
- Couse J, Korach S.** (1999). Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us. *Endocrine Reviews*, 20: 358-417.
- Cramer H, Lauche R, Langhorst J, Dobos G.** (2012). Effectiveness of yoga for menopausal symptoms: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-11.
- Cui J, Shen Y, Li R.** (2013). Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends in molecular medicine*, 19: 197-209.
- Currie L, Harrison B, Trugman M, Bennett P, Wooten G.** (2004). Postmenopausal estrogen use affects risk for Parkinson disease. *Archives of Neurology*, 61: 886-888.
- Curtis S, Korach S.** (2000). Steroid receptor knockout models: phenotypes and responses illustrate interactions between receptor signaling pathways *in vivo*. *Advances in Pharmacology*, 47: 357-380.
- Cynthia L, Bethea, Arik W, Smith, Maria L, Arubala P.** (2011). Long-term ovariectomy decreases serotonin neuron number and gene expression in free racing macaques. *Neuroscience*, 192: 675-688.
- Da-Hye K, Chang G, Sang K, Young J.** (2019). The effects of mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on human estrogen receptor (her) and androgen receptor (har) by YES/YAS *in vitro* Assay. *Molecules*, 24: 1-10.
- Dalais F, Ebeling P, Kotsopoulos D, McGrath B, Teede H.** (2003). The effects of soy protein containing isoflavones on lipids and indices of bone resorption in postmenopausal women. *Clinical Endocrinology*, 58: 704-709.

- Dalal P, Agarwal M.** (2015). Postmenopausal syndrome. *Indian Journal of Psychiatry*. 57: 222-232.
- Daniel C, Silberstein B, Strickland P.** (1987). Direct action of 17 beta-estradiol on mouse mammary ducts analyzed by sustained release implants and steroid autoradiography. *Cancer Research*, 47: 6052-6057.
- D'Arrigo G, Gianquinto E, Rossetti G, Cruciani G, Lorenzetti S, Spyraakis F.** (2021). Binding of androgen- and estrogen-like flavonoids to their cognate (non) nuclear receptors: a comparison by computational prediction. *Molecules*, 26: 1613-1625.
- Das U.** (2002). Nitric oxide as the mediator of the antiosteoporotic actions of estrogen, statins, and essential fatty acids. *Experimental Biology and Medicine*, 227: 88–93.
- Delamater L, Santoro N.** (2018). Management of the perimenopause. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 61: 419-432.
- Devendra N, Kage, Vijaykumar B, Malashetty Y, Seetharam P, Suresh, Saraswati B.** (2009). Effect of ethanol extract of Whole Plant of *Trichosanthes cucumerina* var. *cucumerina* L. on gonadotropins, ovarian follicular kinetics and estrous cycle for screening of antifertility activity in albino rats. *International Journal of Morphology*, 27: 173-182.
- Di Gioia F, Petropoulos A.** (2019). Phytoestrogens, phytosteroids and saponins in vegetables: Biosynthesis, functions, health effects and practical applications. *Advances in Food and Nutrition Research*, 90: 351-421.
- DiBonaventura M, Luo X, Moffatt M, Bushmakin A, Kumar M, Bobula J.** (2015). The association between vulvovaginal atrophy symptoms and quality of life among postmenopausal women in the united states and western Europe. *Journal of Women's Health*, 24:713-722.
- Diczfalusy E, Mancuso S.** (1965). Steroid biogenesis and metabolism in the fetoplacental unit. *Rivista di Anatomia Patologica e di Oncologia*, 28, 333-353.
- Diel P, Geis R, Caldarelli A, Schmidt S, Leschowsky U, Voss A, Vollmer G.** (2004). The differential ability of the phytoestrogen genistein and of estradiol to induce uterine weight

and proliferation in the rat is associated with a substance specific modulation of uterine gene expression. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 221: 21-32.

Djiogue S, Maria H, Njamen D, Georg K, George L, Josephine H, Francesca R, Emmanuel M, Skaltsounis A, Günter V. (2014). Erythroidine Alkaloids: A novel class of phytoestrogens. *Planta Medica*, 80: 861-869.

Djiogue S, Motoum T, Djikem T, Zemo G, Awounfack C, Seke E, Ketcha W, Njamen D. (2020). Oestrogen-like and anxiolytic properties of *Pueraria phaseoloides* extracts on ovariectomized Wistar rats. *Journal of scientific & technical research*, 28: 21889-21899.

Dobiášová M, Frohlich J. (2001). The plasma parameter log (Try/HDL-C) as anatherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apoB-lipoprotein-depleted plasma (FER (HDL). *Clinical Biochemistry*. 34:583-588.

Domínguez-López, Maria Y, Salas-Huetos A, Tresserra-Rimbau1 A, Hurtado-Barroso S. (2020). Effects of dietary phytoestrogens on hormones through out a human lifespan: A review. *Nutrients* 12: 1-25.

Doshi S, Agarwal A. (2013). The role of oxidative stress in menopause. *Journal of Mid-life Health*, 4:140-146.

Douglas P, Katz S, Weinberg E, Chen M, Bishop S, Lorell B. (1998). Hypertrophic remodeling: gender differences in the early response to left ventricular pressure overload. *Journal of the American College of Cardiology*, 32: 1118-1125.

Drapier-Faure E. (2009). Le traitement hormonal des ménopauses précoces : une véritable substitution. *Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français*, Paris (France), 139- 151.

Drummond A, Fuller P. (2010). The importance of ER β signalling in the ovary. *Journal of Endocrinology* 205: 15-23.

Duncan A, Underhill K, Xu X, LaValleur J, Phipps W, Kurzer M. (1999). Modest hormonal effects of soy isoflavones in postmenopausal women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84: 3479-3484.

Dupont V. (2011). Signalisation par les récepteurs des œstrogènes Mécanismes de reconnaissance de l'ADN et nouvelles approches pharmacologiques d'inhibition. *Thèse de doctorat en*

Biochimie, Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, Université de Montreal,
332 pages.

- Dzeufiet D, Mengue N, Bilanda D, Kameni M, Aboubakar O, Dimo T, Kamtchouing P.** (2015). *In vivo* estrogenic-like activities of *Gouania Longipetala* Hemsl. (Rhamnaceae) bark extracts in a post-menopause-like model of ovariectomized Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 168: 122-128.
- Ebi G, Ofoefule S.** (2000). Antimicrobial activity of *Pterocarpus osun* stems. *Fitoterapia*, 71: 433-435.
- Edeoga H, Okwu D, Mbaebie B.** (2005). Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 4: 685-688.
- Egwurugwu N, Obaji N, Ufearo C, Olorunfemi O, Adienbo O, Uchefuna R, Iwuji S, Chinko B, Akpan E.** (2009). The effects of crude extracts of *Pterocarpus soyauxii* on the hematology of albino wistar rats. *International Journal of Natural and Applied Sciences*, 5: 361-364.
- Ellman G.** (1959). Tissue sulfhydryl group. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 82: 70-77.
- Engel L.** (1957). The biosynthesis of estrogens. *Cancer*, 10: 711-715.
- Erika E, Alonso F, Carolina L.** (2003). Antidepressant-Like Effect of Different Estrogenic Compounds in the Forced Swimming Test. *Neuropsychopharmacology*, 28: 830-838.
- Essama D, Otto G, Enow G, Amang P, Tan P.** (2020). Acute and subacute toxicological study of the aqueous extract of the stem bark of *Khaya grandifoliola* (Meliaceae) in Wistar rats. *Journal of Pharmaceutical and Medicinal Research*. 5: 106-111.
- Etame L, Yinyang J, Okalla E, Makondo B, Ngaba G, Mpondo M, Dibong S.** (2017). Étude de la toxicité aiguë et subaiguë de l'extrait au vin des graines de *Carica papaya* Linn. *Journal of Applied Biosciences*, 120: 12077-12085.
- Ezeja M, Anaga A, Asuzu I.** (2014). Acute and sub-chronic toxicity profile of methanol leaf extract of *Gouania longipetala* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 151: 1155-1164.

- Feng Y, Manka D, Wagner K, Khan S.** (2007). Estrogen receptor- α expression in the mammary epithelium is required for ductal and alveolar morphogenesis in mice. *The journal of PNAS*, 104: 14718-14723.
- File S, Heard J, Rymer J.** (2002). Trough estradiol levels associated with cognitive impairment in post-menopausal women after 10 years of estradiol implants. *Psychopharmacology*, 161: 107-112.
- File S, Jarrett N, Fluck E, Duffy R, Casey K, Wiseman H.** (2001). Eating soya improves human memory. *Psychopharmacology*, 157: 430-436.
- Fisher R, Graves H, Parlow A, Simpson R.** (1998). Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 6965-6970.
- Fortier J, Hould R.** (2003). *Histotechnologie théorie et procédés*. Lavoisier, 718 p.
- Fournier L, Ryan B, Robison L, Wiediger M, Park J, Chew B, McGuire M, Sclar D, Skaer T, Beerman, K.** (2007). The effects of soy milk and isoflavone supplements on cognitive performance in healthy, postmenopausal women. *The Journal of Nutrition, Health and Aging* 11: 155-164.
- Frasor J, Danes J, Komm B, Chang K, Lyttle C, Katzenellenbogen B.** (2003). Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology* 144: 4562-4574.
- Gallo D, Zannoni G, Apollonio P, Martinelli E, Ferlini C, Passetti G, Riva A, Morazzoni P, Bombardelli E, Scambia G.** (2005). Characterization of the pharmacologic profile of a standardized soy extract in the ovariectomized rat model of menopause: effects on bone, uterus, and lipid profile. *Menopause*, 12: 589-600.
- Garcia-Segura L, Azcoitia I, DonCarlos L.** (2001). Neuroprotection by estradiol. *Progress in Neurobiology*, 63: 29-60.
- Gehm B, Levenson A, Liu H, Lee E, Amundsen B, Cushman M, Jordan V, Jameson J.** (2004). Estrogenic effects of resveratrol in breast cancer cells expressing mutant and wild-type

- estrogen receptors: role of AF-1 and AF-2. *Journal Steroid Biochemistry Molecular Biological*, 88: 223-234.
- Gerber M, Berta-Vanrullen I.** (2006). Soja et phyto-œstrogènes. *Archives de Pédiatrie*, 13 : 534- 536.
- Gilligan M, Quyyumi A, Cannon O.** (1994). Effects of physiological levels of estrogen on coronary vasomotor function in postmenopausal women. *Circulation*, 89 : 2545-2551.
- Gindre J.** (2009). Représentations, vécu et information des femmes concernant la ménopause et son traitement hormonal. Thèse de doctorat en médecine. *Lyon-R.T.H. Laennec : Université Claude Bernard - Lyon 1*, 175 p.
- Goldstein S, Siddhanti S, Ciaccia A, Plouffe L.** (2000). A pharmacological review of selective estrogen receptor modulators. *Human Reproduction Update*, 6 : 212-224.
- Gomé B, Kouakou K, Touré A, Traoré F.** (2011). Étude de la toxicité aiguë et subchronique de l'extrait aqueux de *Passiflora foetida* Linn. (Passifloraceae) chez les rats et les souris. *Int J. Biol Chem Sci*, 5 : 1777-1789.
- Gornall A, Bradwill C, David M.** (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of Biology and Chemistry*, 77: 167-182.
- Green L, Wagner D, Godowsky J, Skipper P, Wishnok J.** (1982). Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 126: 131-138.
- Gronemeyer H.** (1992). Control of transcription activation by steroid hormone receptors. *The FASEB Journal*, 6: 2524-2529.
- Grosse Y, Baan R, Straif K, Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Galichet L, Coglianò V.** (2009). A review of human Carcinogens-Part A: pharmaceuticals. *The Lancet Oncology*, 10: 13-14.
- Guillermo R, Julie C, Dana S, Hubertus J, Wolfgang W.** (2008). Effects of Chronic Genistein Treatment in Mammary Gland, Uterus, and Vagina. *Environmental Health Perspective*, 115: 62-68.

- Guzzo J.** (2000). Selective estrogen receptor modulators--a new age of estrogens in cardiovascular disease. *Clinical Cardiology*, 123: 15-17.
- Hall J, McDonnell P.** (1999). The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology*, 140: 5566-5578.
- Hamden K, Carreau S, Ayadi F, Masmoudi H, el Feki A.** (2009). Inhibitory effect of estrogens, phytoestrogens, and caloric restriction on oxidative stress and hepato-toxicity in aged rats. *Biomedical and Environmental Sciences*, 22: 381-387.
- Hanan K, Oliveira J, Guilherme B.** (2021). Isoflavones alter male and female fertility in different development windows. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 140: 111448.
- Hannah P, Kenneth P.** (1980). *The Ovary: A Correlation of Structure and Function in Mammals*. Granada Publishing, London.
- Hannon P, Brannick K, Wang W, Gupta R, Flaws J.** (2015). Di(2-ethylhexyl) phthalate inhibits antral follicle growth, induces atresia, and inhibits steroid hormone production in cultured mouse antral follicles. *Toxicology Applied in Pharmacology*, 284: 42-53.
- Harlow S, Paramsothy P.** (2011). Menstruation and the menopausal transition. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 38: 595-607
- Hawkins M, Thornton J, Crews D, Skipper J, Dotte A, Thomas P.** (2000). Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 10751-10756.
- Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Ström A, Treuter E, Warner M, Gustafsson A.** (2007). Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiological reviews*, 87: 905-931.
- Helguero L, Faulds M, Gustafsson Å.** (2005). Estrogen receptors alfa (ER α) and beta (ER β) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11. *Oncogene*, 24: 6605-6616.

- Hewitt S, Deroo B, Hansenetal K.** (2003). Estrogen Receptor Dependent Genomic Responses in the Uterus Mirror the Biphasic Physiological Response to Estrogen. *Molecular Endocrinology*, 17: 2070-2083.
- Hofbauer L, Khosla S, Dunstand C, Lacey D, Boyle W, Rigg B.** (2000). The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in paracrine regulation of bone resorption. *Journal of Bone Miner Research*, 15: 2-12.
- Howes J, Sullivan D, Lai N, Nestel P, Pomeroy S, West L, Eden J, Howes L.** (2000). The effects of dietary supplementation with isoflavones from red clover on the lipoprotein profiles of postmenopausal women with mild to moderate hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis*, 152: 143-147.
- Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E.** (1998). Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *Journal of the American Medical Association*, 280: 605-613.
- Improta-Brears T, Whorton A., Codazz F, York J, Meyer T, McDonnell D.** (1999). Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 4686-4691.
- Iorga A, Cunningham C, Moazeni C, Ruffenach G, Umar S, Eghbali M.** (2017). The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy. *Biology of Sex Differences*, 24: 33-41.
- Jamiyu S, Elekofehinti O, Komolafe K, Oboh G.** (2012). Effects of some green leafy vegetables on the haematological parameters of diabetic rats. *Journal National Production of Plant Resource*, 2: 482-485.
- Jamiyu S, Maria R, Schetinger, Ganiyu O, Olasunkanmi S, Omojokun, João B, Rocha, Roberta S, Jessie G, Naiara S, Fabiano C, Vera M, Boligon A.** (2016). Effect of dietary supplementation of Padauk (*Pterocarpus soyauxii*) leaf on high fat diet/streptozotocin induced diabetes in rats' brain and platelets. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84: 1194-1201

- Jefferson W, Padilla-Banks E, Newbold R.** (2007). Disruption of the female reproductive system by the phytoestrogen genistein. *Reproductive Toxicology*, 23: 308-316.
- Jefferson W, Williams C.** (2011). Circulating levels of genistein in the neonate, apart from dose and route, predict future adverse female reproductive outcomes. *Reproductive Toxicology*, 31: 272-279.
- Jefferson W.** (2010). Adult ovarian function can be affected by high levels of soy. *Journal of Nutrition*, 140: 2322-2325.
- Jensen E.** (1962). On the mechanism of estrogen action. *Perspectives in Biology and Medicine*, 6: 47-60.
- Jingbo L, Neil S.** (2005). Anti-estrogenic effects of conjugated linoleic acid through modulation of estrogen receptor phosphorylation. *Breast Cancer Research and Treatment*, 94: 161-169.
- Juan F, Jonathan C, Abraham P, Eduardo R, Blandina B, Emma V, Andrea S.** (2017). The phytoestrogen genistein produces similar effect as 17- β estradiol on anxiety-like behavior in rats at 12 weeks after ovariectomy. *Biomed Research International*, 1: 1-11.
- Julio R, Wang, Q, Zhen, J, Haixia, D, Shi-Lin C, Gustavo F.** (2008). Aqueous extract of black Maca (*Lepidium meyenii*) on memory impairment induced by ovariectomy in mice. *eCAM*. 7 pages.
- Kailash K, Jawahar K, Paul L.** (1994). Oxygen free radicals as a mechanism of hypercholesterolemic atherosclerosis: effects of probucol. *International Journal of Angiology*, 3:100-112.
- Kameda T, Hiroshi M, Tatsuhisa Y, Yoshihisa M, Koshi M, Miho S, Yukiya N, Emi H, Kenji H, Akira K, Yang N, Yoshiyuki H, Masayoshi K.** (1997). Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. *Journal of Experimental Medicine*, 186: 489-495.
- Kanis J, Borgstrom F, Johnell O, Oden A, Sykes D, Jonsson B.** (2005). Cost-effectiveness of raloxifene in the UK: an economic evaluation based on the more study. *Osteoporosis International*, 16: 15-25.

- Kappeler C, Hoyer P.** (2012). 4-vinylcyclohexene diepoxide: a model chemical for ovotoxicity. *Systems biology in reproductive medicine*, 58, 57-62.
- Karen F, Bart L.** (2006). Diagnosis, screening, prevention and treatment of osteoporosis. *Mayo Clinic Proceeding*, 81: 662-672
- Karr S, Lampe J, Hutchins A, Slavin J.** (1997). Urinary isoflavonoid excretion in humans is dose dependent at low to moderate levels of soy-protein consumption. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 66: 46-51.
- Karumi Y, Onyeyili P, Ogugbuaja V.** (2004). Identification of active principles of *Momordica balsamina* (Balsam Apple) leaf extract. *The Journal of Medical Sciences*, 4: 179-182.
- Katzenellenbogen B, Katzenellenbogen J.** (2000). Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta: regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer. *Breast Cancer Research*, 2: 335-344.
- Keating N, Cleary P, Rossi A, Zaslavsky A, Ayanian J.** (1999). Use of hormone replacement therapy by postmenopausal women in the United States. *Annals of Internal Medicine*, 130: 545-553.
- Kim H, Chang E, Kim H, Lee S, Kim H., Su Kim G, Kim H.** (2006). Antioxidant alpha-lipoic acid inhibits osteoclast differentiation by reducing nuclear factor kappa B DNA binding and prevents in vivo bone resorption induced by receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and tumor necrosis factor alpha. *Free Radical Biology and Medicine*, 40: 1483-1493.
- Kousteni S, Bellido T, Plotkin L, O'Brien C, Bodenner D, Han L, Han K, DiGregorio G, Katzenellenbogen J, Katzenellenbogen B, Roberson P, Weinstein R, Jilka R, Manolagas S.** (2001). Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell*, 5: 719-730.
- Krege J, Hodgin J, Couse J, Enmark E, Warner M, Mahler J, Sar M, Korach K, Gustafsson J, Smithies O.** (1998). Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 15677-15682.

- Kritz-Silverstein D, Von Muhlen D, Barrett-Connor E, Bressel M.** (2003). Isoflavones and cognitive function in older women: the soy and postmenopausal health in aging (sophia) study. *Menopause*, 10: 196-202.
- Krust A, Green S, Argos P, Kumar V, Walter P, Bornert J, Chambon P.** (1986). The chicken estrogens receptor sequence: homology with v-erbA and the human estrogen and glucocorticoid receptors. *The EMBO journal*, 5: 891-897.
- Kuiper G, Lemmen J, Carlsson B, Corton J, Safe S, van der Saag P, van der Burg B, Gustafsson J.** (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology*, 139: 4252-4263.
- Kurman R, Kaminsky P, Norris H.** (1985). The behaviour of endometrial hyperplasia in 170 patients. *Cancer*, 56: 403-412.
- Lampe J, Gustafson D, Hutchins A, Martini M, Li S, Wahala K, Grandits, Potter G, Slavin J.** (1999). Urinary isoflavonoid and lignan excretion on a Western diet: relation to soy, vegetable, and fruit intake. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 8: 699-707.
- Lantin-Hermoso R, Rosenfeld C, Yuhanna S, German Z, Chen Z, Shaul P.** (1997). Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *The American Journal of Physiology*, 273 : 119-126.
- Lapointe G.,** (2004). Notions de toxicologie. Commission de la santé et de la sécurité du travail du Québec. 69 p.
- Laron Z.** (1989). Clinical evidence on the role of estrogens in the development of the breasts. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, Section B*, 1: 9.
- Le Bars J, Le Bars, P.** (1987). Les moisissures des denrées alimentaires et leurs conséquences. *Bulletin Associate Anc El Inst Pasteur 4ème trimestre*, 3-15.
- Li L, Haynes P, Bender J.** (2003). Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 4807-4812.
- Li R, Shen Y.** (2005). Estrogen and brain: synthesis, function and diseases. *Frontiers in Bioscience*, 10: 257-267.

- Limdiand J, Hyde G.** (2003). Evaluation of abnormal liver function tests. *Postgrad Medicinal Journal*, 79: 307-312.
- Liu D, Homan L, Dillon J.** (2004). Genistein acutely stimulates nitric oxide synthesis in vascular endothelial cells by a cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent mechanism. *Endocrinology*, 145: 5532-5539.
- Liu T, Li N, Zhu J, Yu G, Guo K, Zhou L, Zheng D, Qu X, Huang J, Chen X.** (2014). Effects of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on the hypothalamus-pituitary-ovarian axis in adult female rats. *Reproduction Toxicology*, 46: 141-147.
- Lobo R, Davis S, Villiers T, Gompel A, Henderson V, Hodis H, Baber R.** (2014). Prevention of diseases after menopause. *Climacteric*, 17: 540-556.
- Lovejoy J, Champagne C, de Jonge L, Xie H, Smith S.** (2008). Increased visceral fat and decreased energy expenditure during the menopausal transition. *International Journal of Obesity*, 32: 949-958.
- Lubahn D, Moyer J, Golding T, Couse J, Korach K, Smithies O.** (1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 11162-11166.
- Lund T, Lephart E.** (2001). Dietary soy phytoestrogens produce anxiolytic effects in the elevated plus-maze. *Brain Research*, 913: 180-184.
- Ma C, Dong K, Yu K.** (2000). cDNA cloning and expression of a novel estrogen receptor beta-subtype in goldfish (*Carassius auratus*). *Biochimica et biophysica acta*, 1490: 145-152.
- Maeda S, Lazaretti-Castro M.** (2014). An overview on the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, 58: 161-171
- Manolagas S.** (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Reviews*, 21: 115-137
- Marino M, Ascenzi P, Acconcia F.** (2006). S-palmitoylation modulates estrogen receptor alpha localization and functions. *Steroids*, 71: 298-303.

- Markesbery W.** (1997). Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 23: 134-147.
- Marta T, Karolina M, Grzegorz J.** (2014). Epidemiology of the symptoms of menopause an intercontinental review. *Przegląd Menopauzalny*, 13 : 203-211
- Maryvonne le saux.** (2007). Etude des mécanismes d'action de l'œstradiol au cerveau de rattes Ovariectomisées. Thèse de doctorat en pharmacie, *Université Laval Québec*. 451 p.
- Massacrier N.** (2015). Phytothérapie et ménopause : interactions plantes et médicaments-participation à hedrine. *Thèse de doctorat en pharmacie, Université Joseph Fourier*, 285 p.
- McElroy J, Wade G.** (1987). Short-and long-term effects of ovariectomy on food intake, body weight, carcass composition, and brown adipose tissue in rats. *Physiology and Behavior*, 39: 361-365.
- Mei J, Yeung S, Kung A.** (2001). High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86: 5217-5221.
- Meinhardt U, Mullis P.** (2002). The aromatase cytochrome P-450 and its clinical impact. *Hormone research*, 57: 145-152.
- Mengue N, Mbengono O, Djamen D, Dzeufiet D.** (2021). Menopausal management practices in sub-Saharan Africa: a cross sectional study of Cameroonian Women. *International Journal on Integrated Education*, 4: 358-366.
- Mengue N, Foutse Y, Zang C, Owona P, Mbolang N, Bilanda D, Noubom M, Kouamouo J, Kamtchouing P, Dzeufiet D.** (2023). Ethnobotanical survey of medicinal plants used against infertility in the Nyong and So'o Division (Cameroon) and pro-fertilizing activities of *Mammea africana* (Clusiaceae) aqueous extract rats. *Journal of Complementary and Alternative Medical Research*, 21, 1-15.
- Mensor L, Menezes F, Leitão G, Reis A, Santos T, Coube S.** (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, 15: 127-130.

- Menuet A, Pellegrini E, Anglade I, Blaise O, Laudet V, Kah, O, Pakdel F.** (2002). Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biology of Reproduction*, 66: 1881-1892.
- Métivier R, Stark G, Fluoriot M, Hübner H, Brand G, Penot D, Manu S, Denger G, Reid M, Kos R, Russell O, Kah F, Pakdel F.** (2002). Gannon: A dynamic structural model for estrogen receptor activation by ligands, emphasizing the role of interactions between distant A and E domains. *Molecular Cell*, 10: 1019-1032.
- Mezui C, Longo F, Nkenfou C, Sando Z, Ndeme E, Tan P.** (2015). Effects of the stem barks aqueous extract of *Anthocleista schweinfurthii* Gilg (Loganiaceae) on acute and chronic gastric ulcers rat's models. *Journal of Medicinal Plants Research*, 9: 674-680.
- Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, de Falco A, Bontempo P, Nola E, Auricchio F.** (1996). Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *The EMBO journal*, 15: 1292-1300.
- Miller W, Auchus R.** (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Reviews*, 32: 81-151.
- Mir A, Sawhney S, Jassal M.** (2013). Qualitative and quantitative analysis of phytochemicals of *Taraxacum officinale*. *Wudpecker Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2: 1-5.
- Mitchell J, Cawood E, Kinniburgh D, Provan A, Collins A, Irvine D.** (2001). Effect of a phytoestrogen food supplement on reproductive health in normal males. *Clinical Science*, 100: 613-618.
- Mohamed, Abdel-Rahman A.** (2000). Effect of long-term ovariectomy and estrogen replacement on the expression of estrogen receptor gene in female rats. *European Journal of Endocrinology*, 142: 307-331.
- Monteleone P, Mascagni G, Giannini A, Genazzani A, Simoncini T.** (2018). Symptoms of menopause - global prevalence, physiology and implications. *Nature Reviews Endocrinology*, 14: 199-215.

- Moronkola D, Oladapo T, Adegbenro F, Ogunbanjo D, Olayinka K.** (2019). Chemical constituents in essential oils of *Pterocarpus soyauxii* leaf, leaf stalk and stem bark. *Journal of Drug Discovery and Therapeutics*, 9: 206-211.
- Morris R.** (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. 11: 47-60.
- Mozhgan J, Faranak Z, Somayeh A, Mina E, Mirzae S.** (2020). Investigating the prevalence of menopausal complications and its related factors in women referred to Shahroud Health Centers in 2014. Modoodi. *Revista Latino Americana de Hipertensión*, 15:144-152.
- Mpondo C, Ngene J, Mpounze S, Etame L, Boumsong P, Yinyang J, Dibong S.** (2017). Connaissances et usages traditionnels des plantes médicinales du département du haut Nyong. *Journal of Applied Biosciences*, 113: 11229-11245.
- Muhammad F, Azmeila S, Sitompul A, Siregar A.** (2021). Literature review: menopause and sexual disorders. *Macedonian Journal of Medical Sciences*. 9: 298-304.
- Mvondo M, Njamen D, Tanee F, Wandji J.** (2012). Effects of alpinumisoflavone and abyssinone-4'-methyl ether derived from *Erythrina lysistemon* (Fabaceae) on the genital tract of ovariectomized female Wistar Rat. *Phytotherapy Research*, 26: 1029-1036.
- Nair A, Jacob S.** (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human”, *Journal of basic and clinical pharmacy*, 7: 27-31.
- Nakchbandi I, Van der Merwe S.** (2009). Current understanding of osteoporosis associated with liver disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 6: 660-670.
- Navarro M.** (2005). Mecanismo de acción de las isoflavonas. *Ginecología y Obstetricia Clínica*, 6: 159-165
- Nayak P, Chatterjee A.** (2001). Effects of aluminium exposure on brain glutamate and GABA systems: an experimental study in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 39: 1285-1289.
- Neale W, Roberto P.** (2006). Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *Journal of Clinical Investigation*, 116 :1186-1194.
- Nejat E, Chervenak J.** (2010). The continuum of ovarian aging and clinicopathologies associated with the menopausal transition. *Maturitas*, 66 : 187-190.

- Ngo-Sock E.** (2014). Carence en œstrogènes et bases moléculaires du métabolisme des triglycérides et du cholestérol dans le foie et l'intestin : effet de l'exercice physique. *Thèse de doctorat en Physiologie de l'exercice, Université de Montréal*, 255 p.
- Ngoula F, Wacho P, Dogmo M, Kenfack A, Kamtchouing P, Tchamboué J.** (2007). Effects of Pirimiphos-methyl (an organophosphate insecticide) on the fertility of adult male rats. *African Health Sciences*, 7: 3-9.
- Ngoungouré M, Bilanda D, Dzeufiet D, Mballa M, Mengue N, Kameni P, Mbolang N, Dimo T, Kamtchouing P.** (2017). Oral acute toxicity and estrogenic-like effects of the aqueous extract of *Anthocleista schweinfurthii* Gilg (Loganiaceae). *Pharmacologia*, 8: 9-17.
- Ngoungoure M, Dzeufiet D, Bilanda D, Mengue N, Mbolang N, Mballa M, Dzekui T, Kameni P, Kamtchouing P.** (2019). Neuroprotective effects of the *Anthocleista schweinfurthii* Gilg. (*Loganiaceae*) stem bark extract in postmenopausal-like model of ovariectomized Wistar rats. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*. 2019; 20170137.
- Ngumah C, Umeh S, Chinakwe E, Onyemekara N, Ngumah J, Ngumah M.** (2016). Antibacterial activities of dried leaf extracts of *Carica papaya*, *Pterocarpus soyauxii*, and *Vernonia amygdalina* on clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. *Annals of West University of Timișoara, ser. Biology*, 19: 35-40.
- Nicholls J, Lasley B, Nakajima S, Setchell K, Schneeman B.** (2005). Effects of Soy Consumption on Gonadotropin Secretion and Acute Pituitary Responses to Gonadotropin-Releasing Hormone in Women. *Journal of Nutrition*. 132: 708-714.
- Nijveldt R, van Nood E, van Hoorn D, Boelens P, van Norren K, van Leeuwen P.** (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74: 418-425.
- Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson J.** (2001). Mechanisms of estrogen action. *Physiological Reviews*, 81: 1535-1565.

- Njamen D, Magne Nde C, Tanee F, Vollmer G.** (2008). Effects of the extracts of some tropical medicinal plants on estrogen inducible yeast and Ishikawa screens, and on ovariectomized *Wistar* rats. *Pharmazie*, 63: 164-168.
- Node K, Kitakaze M, Kosaka H, Minamino T, Funaya H, Hori M.** (1997). Amelioration of ischemia and reperfusion-induced myocardial injury by 17beta-estradiol: role of nitric oxide and calcium-activated potassium channels. *Circulation*, 96: 1953-1963.
- North American Menopause Society.** (2007). The role of local vaginal estrogen for treatment of vaginal atrophy in postmenopausal women: 2007 position statement of the North American Menopause Society. *Menopause*; 14:355-369.
- Obaji N, Egwurugwu J, Ifepe I, Dimkpa U.** (2010). Comparative study on the effects of crude extracts of *Pterocarpus soyauxii* and *Telfairia occidentalis* on haematological parameters of albino rats. *International Journal of Tropical Agriculture and Food Systems*, 4: 247-251.
- OCDE (Organization for Economic Co-operation and Development),** (2001). Toxicité orale aiguë, méthode de la dose prédéterminée. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. *Ligne directrice n°423*: 1-15.
- OCDE (Organization for Economic Co-operation and Development).** (2008). Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Toxicité orale à doses répétées - rongeurs : 28 jours. Ligne directive n°407 : 1-14.
- Ojah O, Moronkola D.** (2020). *In-vitro* alpha-amylase and glucosidase inhibitory potential of leaf hexane, ethyl acetate and methanol fractions from *Pterocarpus soyauxii* Taub. *Trends Phytochemistry Research*, 4: 37-44.
- Okezie E, Amadike U, Adaugo U, Sonachi O, Achulonou V.** (2018). A comparative study on micronutrients and antinutrients of leaf extracts of *Pterocarpus soyauxii* and *Pterocarpus santalinoides*. *Journal of Complementary Medicine Research*, 2 :131-137.
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé).** (1992). Research guideline for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. RS/92/CE/15 (PHL), *Manila, Philippines* ; 38.
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé).** (1996). Recherche sur la ménopause : Bilan de la décennie 90. *Rapport d'un Groupe Scientifique de l'OMS, Genève, Suisse*, 124 p.
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé).** (2000). Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle. *Genève, Suisse* ; 87p.

- Oumarou M, Zingue S, Bakam B, Ateba S, Foyet S, Fritz T, Tchaptchet M, Njamen D.** (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*, 16: 7829059.
- Palacios S.** (2009). Managing urogenital atrophy. *Maturitas*, 63: 315-318.
- Pan C, Hu Y, Li J, Wang Z, Huang J, Zhang S, Ding L.** (2014). Estrogen receptor- α 36 is involved in pterostilbene-induced apoptosis and anti-proliferation in *in vitro* and *in vivo* breast cancer. *PLoS One*. 15: e10445.
- Papanicolaou G.** (1942). A new procedure for staining vaginal smears. *Sciences*, 95: 438-439.
- Paquette A, Shinoda R, Lhoret P, Lavoie J.** (2007). Time course of liver lipid infiltration in ovariectomized rats: impact of a high-fat diet. *Maturitas*, 58:182-190.
- Park H, Della-Fera M, Hausman D, Rayalam S, Ambati S, Baile C.** (2008). Genistein inhibits differentiation of primary human adipocytes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20: 140-148, 2008.
- Parkosadze G, Sulakvelidze M, Mizandari M, Ratiani L, Sanikidze T.** (2012). Some aspects of pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease in postmenopausal women. *Georgian Medical News*: 46-51.
- Patsaki A, Tchoumtchoua J, Passali C, Lelovas P, Kourkoulis S, Papaioannou N, Mbanya J, Njamen D, Mitakou S, Halabalaki M, Dontas I.** (2016). The protective effect of *Amphimas pterocarpoides* plant extract on bone mineral density and strength in estrogen deficient ovariectomized Wistar rats. *Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 269: 1-7.
- Perla F, Prelati M, Lavorato M, Visicchio D, Anania C.** (2017). The role of lipid and lipoprotein metabolism in non-alcoholic fatty liver disease. *Children*, 4: 46.
- Petersen L, McCrone S, Keller M, Shores S.** (1995). Effects of estrogen and progesterone on luteinizing hormone-releasing hormone messenger ribonucleic acid levels: consideration of temporal and neuroanatomical variables. *Endocrinology*, 136: 3604-3610.
- Petrine J, Bianco-Borges B.** (2020). The influence of phytoestrogens on different physiological and pathological processes: An overview. *Phytotherapy Research*, 1-18.

- Piegholdt S, Rimbach G, Wargner A.** (2016). The phytoestrogens prunetin affects body composition and improves fitness and lifespan in male *Drosophila melanogaster*. *The FASEB Journal*, 30: 948-458.
- Pighon A, Barsalani R, Yasari S, Prud'homme D, Lavoie J.** (2010). Does exercise training prior to ovariectomy protect against liver and adipocyte fat accumulation in rats? *Climacteric*, 13: 238-248.
- Pighon A, Gutkowska J, Jankowski M, Rabasa-Lhoret R, Lavoie J.** (2011). Exercise training in ovariectomized rats stimulates estrogenic-like effects on expression of genes involved in lipid accumulation and subclinical inflammation in liver. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 60: 629-639.
- Pilšáková L, Riečanský I, Jagla F.** (2010). The physiological actions of isoflavone phytoestrogens. *Physiological Research*, 59: 651-664.
- Poehlman E, Toth M, Gardner A.** (1995). Changes in energy balance and body composition at menopause: a controlled longitudinal study. *Annals of Internal Medicine*, 123: 673-675.
- Portman D, Gass M.** (2014). Vulvovaginal Atrophy Terminology Consensus Conference Panel. Genitourinary syndrome of menopause: new terminology for vulvovaginal atrophy from the International Society for the Study of Women's Sexual Health and the North American Menopause Society. *Menopause*, 21: 1063-1068.
- Potter B, Schrager S, Dalby J, Torell E, Hampton A.** (2018). Primarycare-Clinics in office practice. *Menopause*, 45: 625-641.
- Purohit P, Sassarini J, Lumsden M.** (2019). Management of induced menopause in gynaecological cancers and their challenges. *Current Obstetrics and Gynecology Reports*, 8: 94-102.
- Qiu Q, Kuo A, Todd H, Dias J, Gould J, Overstreet J, Lasley B.** (1998). Enzyme immunoassay method for total urinary follicle-stimulating hormone (FSH) beta subunit and its application for measurement of total urinary FSH. *Fertility and Sterility*, 69: 278-285.
- Quevedo J, De-Paris M, Vianna T, Barichello R, Roesler, Kapczinski F.** (2002). Interaction between midazolam-induced anterograde amnesia and memory enhancement by treatments

given immediately after training on an inhibitory avoidance task in rats. *Behavioural Pharmacology*, 13: 319-322.

Rahman M, Bhattacharya A, Banu J, Fernandes G. (2007). Conjugated linoleic acid protects against age-associated bone loss in C57BL/6 female mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18:467-474.

Rahman M, Bhattacharya A, Fernandes G. (2006). Conjugated linoleic acid inhibits osteoclast differentiation of RAW264.7 cells by modulating RANKL signaling. *Journal of Lipid Research*, 47: 1739-1748.

Rahman M, Fernandes G, Williams P. (2014). Conjugated linoleic Acid prevents ovariectomy-induced bone loss in mice by modulating both osteoclastogenesis and osteoblastogenesis. *Lipids*, 49: 211-224.

Rang H, Dale M, Ritter J, Moore P. (2003). *Pharmacology*, Churchill Livingstone; 5: 724-735.

Rassi C, Lieberherr M, Chaumaz G, Pointillart A, Cournot G. (2002). Down-regulation of osteoclast differentiation by daidzein via caspase 3. *Journal of Bone and Mineral Research*, 17: 630-638.

Re N, Pellegrini A, Proteggente, A, Pannala M, Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26: 1231-1237.

Reham Z, Mohammad S. (2015). Amelioration of paracetamol hepatotoxicity and oxidative stress on mice liver with silymarin and *Nigella sativa* extract supplements. *International Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5: 521-531.

Retana-Márquez S, Hernández H, Flores J, Muñoz-Gutiérrez M, Duarte G, Vielma J, Fitz-Rodríguez G, Fernández I, Keller M, Delgadillo J. (2012). Effects of phytoestrogens on mammalian reproductive physiology. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15: 129-145.

Richards J, Russell D, Ochsner S, Hsieh M, Doyle K, Falender A, Lo Y, Sharma S. (2002). Novel signaling pathways control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Recent Progress in Hormone Research*, 57: 195-220.

- Richards J.** (2001). Perspective: the ovarian follicle-a perspective in 2001. *Endocrinology*, 142: 2184-2193.
- Rietjens I, Louisse J, Beekmann K.** (2017). The potential health effects of dietary phytoestrogens. *The British Journal of Pharmacology*, 174:1263-1268.
- Riggs B, Khosla S, Melton L.** (1998). A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *Journal of Bone and Mineral Research*, 13: 763-773.
- Robin A, Gabrielle H, Bev J, Deborah L.** (2021). Evaluating the effects of symptom monitoring on menopausal health outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Global Women's Health*, 2:757706.
- Robin G, Baffet H, Gatteau-Jonard S, Dewailly D.** (2012). Déficit en 21-Hydroxylase et fertilité féminine. *Médecine Reproduction*. 14, 226-235.
- Robinson D, Cardozo L.** (2003). The role of estrogens in female lower urinary tract dysfunction. *Urology*, 62: 45-51.
- Roy E, Wade G.** (1977). Role of food intake in estradiol-induced body weight changes in female rats. *Hormones and Behavior*, 8: 265-274,
- Ruff M, Gangloff M, Wurtz J, Moras D.** (2000). Estrogen receptor transcription and transactivation: structure-function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors. *Breast Cancer Research*, 2: 353-359.
- Rukhsana S, Allan B.** (2010). Role of Oxidative Stress in the Progression of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease*, 19 : 341-353.
- Runeton J.** (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4eme édition, Paris: Lavoisier, 1269.
- Saadat P, Latiffah A.** (2013). Supplementary health benefits of linoleic acid by improvement of vaginal cornification of ovariectomized rats. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 3: 31-36.
- Saha J, Abia D, Dumarcay S, Ndikontar M, Gerardin P, Ngamveng N, Perrin D.** (2013). Antioxidant activities, total phenolic contents and chemical compositions of extracts from four Cameroonian woods: Padouk (*Pterocarpus soyauxii* Taub), tali (*Erythrophleum*

suaveolens), *moabi* (*Baillonella toxisperma*), and *movingui* (*Distemonanthus benthamianus*). *Industrial Crops and Products*, 41: 71-77.

Saravia F, Beauquis J, Pietranera L, De Nicola A. (2007). Neuroprotective effects of estradiol in hippocampal neurons and glia of middle age mice. *Psychoneuroendocrinology*, 32: 480-492.

Saslis-Lagoudakis C, Klitgaard B, Forest F, Francis L, Savolainen V, Williamson E, Hawkins J. (2011). The use of phylogeny to interpret cross-cultural patterns in plant use and guide medicinal plant discovery: an example from *Pterocarpus* (Leguminosae). *Plos one*, 7: 1-13.

Schreihofe D. (2005). Transcriptional regulation by phytoestrogens in neuronal cell lines. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 231: 13-22.

Seif A. (2014). Nigella Sativa reverses osteoporosis in ovariectomized rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14:22

Seo K, Kim E, Koh J, Choi, Lee B. (2017). Anti-adipogenesis mechanism of pterostilbene through the activation of heme oxygenase-1 in 3T3-L1 cells. *Phytomedicine*, 33 : 7-13.

Serrano J. (1990). Toxicologie expérimentale des plantes médicinales. Actes du premier colloque européen d'ethnopharmacologie. *ORSTOM*; 210-223.

Setchell K, Lawson A, Borriello S, Harkness R, Gordon H, Morgan D, Kirk D, Adlercreutz H, Anderson L, Axelson M. (1981). Lignan formation in man microbial involvement and possible roles in relation to cancer. *The Lancet*, 2: 4-7.

Shanle E, Xu W. (2011). Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signalling: identification and mechanisms of action. *Chemical Research in Toxicology*, 24: 6-19.

Shelnutt S, Cimino C, Wiggins P, Ronis M, Badger T. (2002). Pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in men and women after consumption of a soy beverage. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76: 588-589.

Sherwin B. (2001). Menopause: Myths and realities. Psychological aspects of women's health care. In: Stotland NL, Stewart DE, editors. The interface between psychiatry and obstetrics and gynecology. Arlington. *American Psychiatric Publishing*, 1: 241-59.

- Shuster L, Rhodes D, Gostout S, Grossardt B, Rocca W.** (2010). Premature menopause or early menopause: long-term health consequences. *Maturitas*: 161-166.
- Silberstein G, Van Horn K, Shyamala G, Daniel C.** (1994). Essential role of endogenous estrogen in directly stimulating mammary growth demonstrated by implants containing pure antiestrogens. *Endocrinology*, 134: 84-90.
- Singh M, Dykens J, Simpkins J.** (2006). Novel mechanisms for estrogen-induced neuroprotection. *Experimental Biology and Medicine*, 231: 514-521.
- Singh M, Meyer W, Millard, Simpkins J.** (1994). Ovarian steroid deprivation results in a reversible learning impairment and compromised cholinergic function in female Sprague-Dawley rats. *Brain Research*, 644: 305-312.
- Sofowora A.** (1993). Medicinal plants and traditional medicine in Africa. *Second Spectrum Books, Limited Ibadan, Nigeria*, 289p.
- Somayeh K, Samad Z, Parvin B.** (2018). Flavonoids fraction of *Mespilus germanica* alleviates insulin resistance in metabolic syndrome model of ovariectomized rats via reduction in tumor necrosis factor- α . *Journal of Menopausal Medicine*, 24: 169-175
- Soules M, Sherman S, Parrott E, Rebar R, Santoro N, Utian W, Woods N.** (2001). Executive summary: Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW). *Fertility and sterility*, 76: 874-878.
- Springer L.** (1996). Cellular and molecular mechanisms of 4-vinylcyclohexene-diepoide induced ovotoxicity in rats. *PhD thesis, University of Arizona*, 270p.
- Stamatelopoulos K, Armeni E, Georgiopoulos G, Kazani M, Kyrkou K, Stellos K, Lambrinouadaki I.** (2012). Recently postmenopausal women have the same prevalence of subclinical carotid atherosclerosis as age and traditional risk factor matched men. *Atherosclerosis*, 221: 508-13.
- Stanley E, Lazic1, Elizaveta S, Dominic P.** (2020). Determining organ weight toxicity with Bayesian causal models: improving on the analysis of relative organ weights. *Scientific Reports*, 10: 6625-6631.

- Su Z, Wang P, Yuan W, Li S.** (2013). Flavonoids and 3-aryl coumarin from *Pterocarpus soyauxii*. *Planta Medica*, 79: 487-491.
- Su Z, Wang P, Yuan W, Li S.** (2014). Chemical constituents from *Pterocarpus soyauxii*. *Natural Product Communications*, 9 : 1483-1486.
- Sultan C, Priolet G, Benzard Y, Rosa R, Josso F.** (1982). Techniques en hématologie. *Flammarion Médecine-sciences, 2^e Edition*: pp 15-32.
- Sussman M, Trocio J, Craig B, Mirkin S, Andrew G, Yood R, Friedman M, Menzin J, Louie M.** (2015). Prevalence of menopausal symptoms among mid-life women: findings from electronic medical records. *BMC Women's Health*. 15:58.
- Suzuki S, Brown C, Wise P.** (2006). Mechanisms of neuroprotection by estrogen. *Endocrine*, 29: 209-215.
- Takeuchi K, Okada S, Yukihiko S, Inoue H.** (1997). The inhibitory effects of aluminum and iron on bone formation, *in vivo* and *in vitro* study. *Pathophysiology*, 4: 97-104.
- Tchamadeu M, Dzeufiet D, Blaes, Girolami J, Kamtchouing P, Dimo T.** (2017). Antidiabetic effects of aqueous and dichloromethane/methanol stem bark extracts of *Pterocarpus soyauxii* Taub (Papilionaceae) on streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacognosy Research*, 9: 80-86.
- Tchamadeu M, Dzeufiet D, Nana P, Nouga C, Nguenim T, Allard J, Blaes N, Siagat R, Zapfack L, Girolami J, Kamtchouing P, Dimo T.** (2011). Acute and sub-chronic oral toxicity studies of an aqueous stem bark extract of *Pterocarpus soyauxii* Taub (Papilionaceae) in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 133: 329-335.
- Telefo B, Moundipa F, Tchouanguép F.** (2002). Oestrogenicity and effect on hepatic metabolism of the aqueous extract of the leaf mixture of *Aloe buettneri*, *Dicliptera verticillata*, *Hibiscus macranthus* and *Justicia insularis*. *Fitoterapia*, 73: 472-478.
- Thakur C, Saikia T, Yadav R.** (1997). Total serum levels of triiodothyronine (T3) thyroxine (T4) and thyrotropine (LH) in school going children of Dibrugarh district: an endemic goitre region of Assam. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 41:167-170.
- Thibault C, Levasseur M.** (1988). Ovulation. *Human reproduction*, 3: 513-523.

- Tomkinson A, Gevers E, Wit J, Reeve J, Noble B.** (1998). **The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis.** *Journal of Bone and Mineral Research*, 13: 1243-1250.
- Trease E, Evans C.** (1989). *Pharmacognosy. 13th edition Bailliere Tindall, London*, 844p.
- Treiz N.** (1983). *Clinical guide to laboratory test. W. B. Saunder*, 1: 1-3.
- Turner J, Agatonovic-Kustrin S, Glass B.** (2007). **Molecular aspects of phytoestrogen selective binding at estrogen receptors.** *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96: 1879-1885.
- Turner R, Riggs L, Spelsberg T.** (1994). **Skeletal effects of estrogen.** *Endocrine Reviews*, 15: 275-300.
- Turner R, Wakley G, Hannon K.** (1990). **Differential effects of androgens on cortical bone histomorphometry in gonadectomized male and female rats.** *Journal of Orthopaedic Research*, 8: 612-617.
- Turner R.** (1999). **Mice, estrogen, and postmenopausal osteoporosis.** *Journal of Bone and Mineral Research*, 14: 187-191.
- Van't Hof R, Ralston S.** (2001). **Nitric oxide and bone.** *Immunology*, 103: 255-261.
- Vanharanta M, Voutilainen S, Rissanen T, Adlercreutz H, Salonen, J.** (2003). **Risk of cardiovascular disease-related and all-cause death according to serum concentrations of enterolactone: Kuopio ischaemic heart disease risk factor study.** *Archives of Internal Medicine*, 163: 1099-10104.
- Velders M, Schleipen B, Fritzemeier K, Zierau O, Diel P.** (2012). **Selective estrogen receptor beta activation stimulates skeletal muscle growth and regeneration.** *The FASEB Journal*, 26 : 1909-1920.
- Vergne S, Bennetau-Pelissero C, Lamothe V, Chantre P, Potier M, Asselineau J, Perez P, Durand M., Moore N, Sauvart P.** (2008). **Higher bioavailability of isoflavones after a single ingestion of a soya-based supplement than a soya-based food in young healthy males.** *British Journal of Nutrition*, 99: 333-344.

- Viau C, Tardif R. (2003).** Toxicologie. Gérin M., Gosselin P., Cordier S., Viau C., Quénel P., Déwailly E. Dans Environnement et santé publique – Fondements et pratiques, Edicem / Tec & Doc, Acton Vale / Paris. pp. 119-143.
- Viswanathan V, Eugster E. (2011).** Etiology and treatment of hypogonadism in adolescents. *Pediatric Clinics of North America*. 58: 1181-1903.
- Wade G. (1976).** Sex hormones, regulatory behaviors and body weight. *New York: Academic*, 6: 5-6.
- Wang H, Eriksson H, Sahlin L. (2000).** Estrogen receptors a and b in the female reproductive tract of the rat during the estrous cycle. *Biology of Reproduction*, 63, 1331-1340.
- Wang L, Andersson S, Warner M, Gustafsson J. (2002).** Estrogen actions in the brain. *Science's Signal Transduction Knowledge Environment*, 138: 29-35.
- Warnick G, Knopp R, Fitzpatrick V. (1990).** Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald equation is adequate for classifying patients on the basis of nationally recommended cutpoints. *Clinical and Chemical*, 36: 15-19.
- Wayne P, Bocchinfuso A, Jonathan, Lindzey, Sylvia C, James A, Myers H, Ralph C, Kenneth S, Korach. (2000).** Induction of mammary gland development in estrogen receptor- α Knockout mice. *Endocrinology*, 141: 2982-2994.
- Wellons M, Ouyang P, Schreiner P, Herrington D, Vaidya D. (2012).** Early menopause predicts future coronary heart disease and stroke: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Menopause*, 19: 1081-1087.
- Westwood F. (2008).** The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. *The Society of Toxicologic Pathology*, 36: 375-384.
- White F. (1986).** *La végétation de l'Afrique. Mémoire accompagnant la carte de la végétation de l'Afrique*. Unesco/aetfat/unso, orstom-unesco, 384 p.
- Whitten P, Naftolin F. (1998).** Reproductive actions of phytoestrogens. *Baillieres Clinical Endocrinology and Metabolism*, 12: 667-690.
- WHO. (2019).** WHO global report on traditional and complementary medicine 2019. *Geneva: World health Organisation*. 1-228.

- Wilbur, Bernheim F, Shapiro O.** (1949). The thiobarbituric acid reagent as a test for the oxidation of unsaturated fatty acids by various agents. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 24: 305-313.
- Woods N, Mitchell E.** (2005). Symptoms during the perimenopause: prevalence, severity, trajectory, and significance in women's lives. *The American Journal of Medicine*. 118:14-24.
- Yakubu M, Afolayan A.** (2008). Effect of aqueous extract of *Bulbine natalensis* (Baker) stem on the sexual behaviour of male rats. *International Journal of Andrology*, 32: 629-636.
- Yemele M, Telefo P, Mapon H, Nangue C, Fodouop P, Njina S, Mbemya T, Lienou L, Tagne S, Goka C, Ngoula F, Nguemo F, Moundipa F.** (2016). Acute and sub-acute toxicity of *Sida veronicifolia* aqueous extract in female Wistar rats. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*; 8: 210-218.
- Yeon H, Haeng J, Joo J.** (2018). Improves liver steatosis in ovariectomized mice. *Molecules*, 23, 194-204.
- Yildiz F.** (2005). Phytoestrogens in Functional Foods. *Taylor & Francis. Limited company*, 5: 210-211.
- Yoshitake T, Hitoshi N, Kehr J, Yoshitake S, Fujino K, Yamaguchi M.** (2004). Determination of serotonin, noradrenaline, dopamine and their metabolites in rat brain extracts and microdialysis samples by column liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with benzylamine and 1,2-diphenylethylenediamine. *Journal of Chromatography B*. 807 : 177-183.
- Youmbissi T, Djoumessi S, Nouedoui C, Ndobu P, Meli J.** (2001). Profil lipidique d'un groupe d'hypertendus camerounais noirs africains. *Médecine Afrique Noire*, 48: 305-314.
- Young D.** (1995). Effects of drugs on clinical laboratory tests. *4th edition*, 164p.
- Young D.** (2001). Effects of disease on clinical lab. *Tests, 4th edition*, AACC.
- Yun A, Lee P.** (2004). Maldaptation of the link between inflammation and bone turnover may be a key determinant of osteoporosis. *Medical Hypotheses*, 63: 532-537.

- Zakaria R, Al-Rahbi B, Ahmad A, Othman Z, Azman K, Aziz C.** (2019). Menopause rodent models: suitability for cognitive aging research. *International Medical Journal*, 26: 450-452.
- Zhang Y, Zhang Y.** (2016). Pterostilbene, a novel natural plant product, inhibits high fat-induced atherosclerosis inflammation via NF-kappa B signaling pathway in Toll-like receptor 5 (TLR5) deficient mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 81,345-355.
- Zhao L, Chen Q, Diaz Brinton, R.** (2002). Neuroprotective and neurotrophic efficacy of phytoestrogens in cultured hippocampal neurons. *Experimental Biology and Medicine*, 227: 509-519.
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W.** (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*; 64:555-559.
- Zingue S, Magne N, Clyne C, Njamen D.** (2014). Elucidation of underlying mechanisms by which *Millettia macrophylla* Benth induces its estrogenic activity. *International Scholarly Research Notices*, 2014.
- Zingue S, Magne N, Michel T, Ndinteh D, Tchatchou J, Adamou M, Fernandez X, Tchuenguem F, Clyne C, Njamen D.** (2017). Ethanol-extracted Cameroonian propolis exerts estrogenic effects and alleviates hot flushes in ovariectomized Wistar rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17: 65.
- Zingue S, Magne N, Njamen D.** (2015). The methanol-soluble fraction of *Millettia macrophylla* (Fabaceae) stem bark endowed with estrogenic properties has adverse effects on the male reproductive system of Wistar rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 26: 53-64.

ANNEXES

Annexe 1 : - Préparation des solutions de travail

✓ Préparation de l'extrait

La solution d'extrait de concentration 40 mg/mL a été préparée par solubilisation de 400 mg d'extrait aqueux de *P. soyauxii* dans de l'eau distillée pour un volume final de 10 mL pour une dose de 400 mg/kg. Cette solution a été diluée de moitié permettant d'obtenir une deuxième solution de concentration 20 mg/mL soit une dose de 200 mg/kg. La solution de 20 mg/mL a été diluée successivement par 2 et par 4, ce qui a permis d'obtenir les solutions d'extrait de concentration 10 mg/mL et 5 mg/mL correspondant aux doses de 100 et de 50 mg/kg respectivement. La solution d'extrait de 30 mg/ml correspondant à la dose de 300 mg/kg a été obtenue en faisant solubiliser 300 mg d'extrait de *P. soyauxii* dans 10 mL d'eau distillée. Connaissant la dose **D** (mg/kg), la masse **M** (kg) de l'animal et la concentration **C** (mg/mL) de l'extrait, le volume **V** (mL) à administrer à une rate a été déterminé à partir de la formule suivante :

$$V = M \times D \div C$$

V = volume de la solution à administrer ; **D** = dose de l'extrait à administrer ; **C** = concentration de l'extrait ; **M** = Masse de l'animal. La solution d'extrait était administrée à raison de 1 mL pour 100 g de poids corporel.

✓ Préparation de l'œstradiol valérate

La solution d'œstradiol valérate (E₂V) a été administrée aux rates à la dose de 1 mg/kg. Pour sa préparation, un comprimé comprenant 2 mg de principe actif a été dissout dans de l'eau distillée pour un volume final de 20 mL.

✓ Solution de NaCl 0,9 %

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

✓ Formol à 10 % tamponné

Pour préparer un litre de formol à 10 % tamponné, 6,5 g de phosphate disodique et 4 g de phosphate monosodique ont été dissout dans 100 mL de formol commercial (37 %) à l'aide d'un agitateur magnétique sous hotte ventilée. Par la suite, 900 mL d'eau distillée ont été ajoutées à la solution obtenue.

✓ **Alcool 50 °, 70 °, 80 °**

Les alcools de degré inférieur ont été préparés par dilution de l'éthanol 95 ° à l'eau distillée à l'aide de l'abaque de Gaylussac.

✓ **Solution d'eau gélatinée**

Cette solution permet une bonne adhésion des coupes sur les lames. Pour 100 mL de solution, 5 mg de poudre de gélatine a été dissous dans 100 mL d'eau distillée.

✓ **Solution de dichromate de potassium 5 % et acide acétique glacial**

La solution de dichromate de potassium 5 % a été obtenue en faisant dissoudre 2,5 g de dichromate de potassium dans de l'eau distillée pour un volume final de 50 mL. Par la suite, 150 mL d'acide acétique glacial y ont été ajoutés.

✓ **Solution d'hématoxyline de Mayer**

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

✓ **Solution d'éosine alcoolique**

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

✓ **Solution d'orange G à 10 %**

Dix grammes d'Orange G ont été dissout dans 100 mL d'eau distillée.

✓ **Solution de verte lumière à 0,02 %**

C'est un colorant cytoplasmique. Pour la préparation de 1000 mL de cette solution, 25 mL de solution aqueuse de vert lumière concentrée ont été dilués dans 975 mL d'éthanol à 95%.

✓ **Solution d'EA-65**

Elle est obtenue par 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 %, mélange dans lequel 6 g d'acide phosphotungstique ont été dissouts.

✓ **Solution de peroxyde d'hydrogène 50 mM**

La solution de peroxyde d'hydrogène 50 mM a été obtenue en diluant 243 µL de peroxyde d'hydrogène 35 % dans de l'eau distillée pour un volume final de 50 mL.

✓ **Solution d'adrénaline 0,06 mg/mL**

La solution d'adrénaline à la concentration de 0,06 mg/mL a été obtenue en dissolvant 6 mg d'adrénaline dans de l'eau distillée pour un volume final de 100 mL.

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

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

✓ **Naphtyléthylène diamide 0,1 %**

La solution de Naphtyléthylène diamide (NED) 0,1 % a été préparée par dissolution de 0,1 g de NED dans de l'eau distillée pour un volume final de 100 mL de solution.

✓ **Solution de sulfanilamide 1 %**

Pour préparer cette solution, 1g de sulfanilamide a été dissout dans de l'acide phosphorique à 2,5 % pour un volume final de 100 mL de solution.

✓ **Solution standard de nitrite de sodium**

La solution standard de nitrite de sodium (NaNO_2) a été préparée à une concentration de 1 mM, en dissolvant 0,69 g de NaNO_2 dans de l'eau distillée pour un volume final de 10 mL de solution.

✓ **Solution d'acide trichloroacétique 20 %**

Dans une fiole jaugée de 100 mL, 20 grammes d'acide trichloroacétique (TCA) 20 % ont été dissouts dans de l'eau distillée pour un volume final de 100 mL de solution.

✓ **Réactif de Ellman**

Pour la préparation du réactif de Ellman, 5 mg d'acide 2-dithio bis-nitrobenzène (DTNB) ont été dissouts dans du tampon phosphate (0,1 M ; pH = 6,5) pour un volume final de 250 mL.

✓ **Réactif de Biuret**

Le réactif de Biuret a été préparé en dissolvant 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 dans de l'eau distillée pour un volume total de 100 mL (solution A). Ensuite, 15 g d'hydroxyde de sodium ont été dissouts dans de l'eau distillée pour un volume total de 100 mL (solution B). Les deux solutions A et B ainsi obtenues ont été mélangées et le volume final a été complété à 500 mL avec de l'eau distillée.

✓ **Solution de Mac Even**

Pour la préparation de la solution de Mc Even, 8,6 g de NaCl, 0,42 g de KCl, 0,109 g de NaH_2PO_4 , 1 g de CO_3NaH , 0,03 g de MgCl_2 et 2 g de $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ont été dissous dans 500 mL d'eau distillée (solution A). Par ailleurs, 0,28 g de CaCl_2 ont été dissouts dans 50 mL d'eau distillée (solution B). Après dissolution totale, les solutions A et B ont été mélangées et le volume final complété à 1000 mL par ajout d'eau distillée.

✓ **Solution de sérum albumine bovin (3 mg/mL)**

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

✓ **Tampon tris-HCl 50 mM pH 7,4**

Le tampon Tris-HCl a été préparé en faisant dissoudre 1,21 g de Tris base et 2,79 g de chlorure de potassium dans 250 mL d'eau distillée. Le pH a été ajusté à 7,4 avec du HCl 11,8 N et le volume complété à 500 mL avec de l'eau distillée.

✓ **Tampon phosphate (0,1 M ; pH = 6,5)**

Le tampon phosphate a été préparé en faisant dissoudre 8,9 g de phosphate disodique hydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) dans de l'eau distillée pour un volume total de 500 mL (solution A). 6,5 g de phosphate monosodique hydraté ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ont été dissout dans 250 mL d'eau distillée, puis le volume a été complété à 500 avec de l'eau distillée (solution B). Le pH de la solution B a été ajusté à 6,5 avec la solution A.

✓ **Tampon phosphate (0,1 M ; pH = 7,5)**

Le tampon phosphate (0,1 M ; pH = 7,5) a été préparé en dissolvant 8,9 g de phosphate disodique hydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) dans de l'eau distillée pour un volume total de 500 mL (solution A). Une proportion de 6,5 g de phosphate monosodique hydraté ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ont également été dissous dans de l'eau distillée pour un volume total de 500 mL (solution B). Le pH de la solution A a ensuite été ajusté à 7,5 avec la solution B.

✓ **Tampon carbonate (0,05 M ; pH = 10,2)**

Le tampon carbonate a été préparé en faisant dissoudre 4,5 g de carbonate de sodium ($\text{NaCO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) et 4,2 g de carbonate monosodique (NaCO_3) dans 500 mL d'eau distillée. Le pH de la solution a été ajusté à 10,2 avec de la soude 1 M et le volume complété à 1000 mL avec de l'eau distillée.

✓ **Tampon Phosphate saline**

Le tampon phosphate saline a été obtenu en dissolvant 1g de phosphate saline sous forme de comprimé dans de l'eau distillée de manière à obtenir 100 mL de solution.

PUBLICATIONS

Articles publiés

Mengue, N.Y.S., **Owona, P.E.**, Noubom, M., Mbock, M.A., Mbolang, N.L., Ngoungouré, M.C., Ngapout, F.R., Bidingha, G.R., Kahou, T.R.B., Bilanda, D.C., Kamtchouing, P., Dzeufiet, D.P.D., 2021. Estrogenic and antioxidant activities of *Pterocarpus soyauxii* heartwood aqueous extract in bilateral oophorectomized *Wistar* rat. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 6759000, 18 pages.

Owona, P. E., Mengue, N. Y. S, Mbolang, N. L, Bidingha, A. G. R, Ngoungouré, M.C., Kegne, S, Tcheutchoua, Y. C, Bilanda, D.C, Kamtchouing, P., Dzeufiet, D.P.D., 2021. *Pterocarpus soyauxii* (Fabaceae) heartwood aqueous extract exhibits anti-osteoporotic activities in a postmenopausal-like model. *Journal of Complementary and Alternative Medical Research*, 16(4): 275-285.

Research Article

Estrogenic and Antioxidant Activities of *Pterocarpus soyauxii* (Fabaceae) Heartwood Aqueous Extract in Bilateral Oophorectomized Wistar Rat

Yolande Sandrine Mengue Ngadena,^{1,2} Pascal Emmanuel Owona,² Michel Noubom,³ Michel Arnaud Mbock,² Lohik MbolangNguegan,² Madeleine Chantal Ngougouré,² Rodrigue Ngapout Fifen,² Ronald Bidingha A Goufani,² Rivaldo Bernes Kahou Tadah,² Danielle Claude Bilanda,² Pierre Kamtchouing,² and Paul Désiré Dzeufiet Djomeni ²

¹Department of Psychology, Faculty of Arts, Letters and Social Science, University of Yaoundé 1, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon

²Department of Animal Biology and Physiology, Laboratory of Animal Physiology, Faculty of Science, University of Yaoundé 1, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon

³Department of Biological Sciences, Faculty de Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Dschang, P.O. Box, 67, Dschang, Cameroon

Correspondence should be addressed to Paul Désiré Dzeufiet Djomeni; dzeufiet@yahoo.fr

Received 20 April 2021; Accepted 17 September 2021; Published 30 September 2021

Academic Editor: Antonio Vassallo

Copyright © 2021 Yolande Sandrine Mengue Ngadena 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 are used to ease postmenopausal symptoms, a property probably due to estrogenic and antioxidant effects. *Pterocarpus soyauxii* (*P. soyauxii*) is empirically used in Cameroon to treat among others primary and secondary amenorrhea. The aim of this study is to evaluate estrogenic and antioxidant activities of *P. soyauxii* heartwood aqueous extract in bilateral oophorectomized Wistar rats. Firstly, a characterization of the extract was carried out. For that, flavonoids, phenols, and tannins levels in *P. soyauxii* extract were evaluated by colorimetric assays and UHPLC-MS analysis was realized. *In vitro* antioxidant analysis of *P. soyauxii* was conducted using DPPH, ABTS, and FRAP assays. Secondly, 2 sets of pharmacologic tests were carried out. The results revealed that *P. soyauxii* aqueous extract contains, respectively, 229.42 ± 3.62 mg EAG/g, 63.42 ± 2.16 mg EQ/g, and 27.88 ± 0.23 mg ETA/g of polyphenols, flavonoids, and tannins. UHPLC-MS enabled identifying seven components including mono(2-ethylhexyl) phthalate, cembrene, 3',5'-dimethoxy-4-stilbenol, and linoleic acid. DPPH, ABTS, and FRAP assays revealed that *P. soyauxii* extract possessed a high antioxidant activity with IC₅₀ value of 730.20 µg/mL, 892.90 µg/mL, and 765.75 mEAG/g of extract, respectively. In the uterotrophic assay, *P. soyauxii* extract induced significant increase of fresh uterine weight, uterine and vaginal epithelial size, and mammary glands differentiation compared to Ovx control. In the postmenopausal model, compared to the sham control, vagina and uterine dystrophies were observed in Ovx rats treated with distilled water. *P. soyauxii* aqueous extract expressed estrogenic-like effects on vagina and did not affect uterine epithelial height compared with vehicle groups. On the back of these vaginotrophic effects, the extract displayed antiatherogenic properties by reducing ($p < 0.001$) AI and LDL cholesterol level as compared to Ovx control group. The extract at 200 mg/kg significantly prevented the increase of MDA ($p < 0.01$) level and decreased nitrites ($p < 0.001$) and GSH ($p < 0.01$) levels compared to Ovx rats. These beneficial effects are related at least in part to the presence of compound such as mono(2-ethylhexyl) phthalate, 3',5'-dimethoxy-4-stilbenol, and linoleic acid. Overall, *P. soyauxii* aqueous extract exhibits estrogenic and antioxidant effects which can inhibit postmenopausal symptoms by providing vaginal stratification, improving lipid profile and insulin sensitivity, and reducing oxidative stress without side effects on the endometrium and mammary gland in 84-day Ovx rats.

1. Introduction

Menopause is a physiological state characterized by hypoestrogenism and lead to complications including hot flashes, tachycardia, vaginal dryness, urogenital atrophy, high visceral fat, increase of body weight, cardiovascular diseases, and disruption in sex steroid feedback on gonadotropin secretion [1]. The associated decline in estrogen-related antioxidant power results in the rapid development of menopausal symptoms such as cardiovascular diseases [2]. Oxidative stress is generated by an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant defense system [3]. It is related to many risk factors of cardiovascular diseases such as obesity, atherosclerosis, insulin resistance, hypercholesterolemia, endothelial dysfunction, and vascular inflammation [4–7]. Hormone replacement therapy (HRT) is the main line for prevention and treatment of cardiovascular diseases in postmenopausal women. Despite its many benefits, HRT has adverse side effects such as breast and endometrial cancers [8]. People also use vitamins *E* and *C* to manage oxidative stress in postmenopausal symptoms [9]. Nevertheless, despite their protective effects, they lose their antioxidant power through oxidation [10]. In order to cope with these adverse side effects, research has focused on alternatives to HRT. The use of phytoestrogens attracted researchers over the last few years because of their antioxidant and preventive effects on such chronic diseases like cardiovascular diseases [11]. Indeed, they possess estrogenic-like activity and provide effective and secure alternative to HRT. Several medicinal plants are used empirically to cope with primary health problems and their estrogenic activity. Among them, *Erythrina poeppigiana*, *Rheum rhaponticum*, and *Anthocleista schweinfurthii* are reported to mimic estrogen activities in menopausal conditions [12–14]. Nevertheless, phytoestrogens are reported to induce gastrointestinal and endometrial hyperplasia side effects [15]; thus, additional preclinical and clinical studies are required to establish the safety profiles of plant extract.

Pterocarpus soyauxii Taub which is the subject of this work belongs to Fabaceae known as the African Padauk. Existent in Cameroon, *Pterocarpus soyauxii* (*P. soyauxii*) also returned to Nigeria, Gabon, and the Democratic Republic of Congo [16]. The wood and stem bark of *P. soyauxii* are empirically used to treat hypertension and diabetes. Ethnomedically, *Pterocarpus* species are used to treat urogenital pathologies and infertility. Moreover, pterostilbene identified in the extract of *P. soyauxii* has been reported to exhibit estrogenic activities *in vitro* [17, 18]. Traditional healers of the Center Region of Cameroon assert that heartwood *P. soyauxii* maceration is used to treat primary and secondary amenorrhea and some menopausal symptoms. The main objective of the present study was to evaluate estrogenic and antioxidant activities of the aqueous extract of the heartwood of *P. soyauxii* in bilateral oophorectomized Wistar rats.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals. 2,2'-Azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,4,6-tri (2-pyridyl)-s-triazine, potassium persulfate, and ascorbic acid were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Diazepam (Valium® 10 mg) and 17- β estradiol valerate (Progynova® 2 mg) were purchased from DELPHRAM (Lille, France).

2.2. Plant Material. The leaves and heartwood of *Pterocarpus soyauxii* Taub were harvested in Ngomedzap (Center Region, Cameroon) during the rainy season at 7:30 am on April 21, 2020. These leaves were authenticated at the National Herbarium of Cameroon (HNC-IRA) by comparison with the specimen of Thomas O. W8175 deposited under the voucher number 56984HNC.

2.2.1. Extraction. The collected *Pterocarpus soyauxii* heartwood pieces were air dried at room temperature for 30 days. 70 g of the powder obtained was macerated in 2 L of distilled water for 48 hours at room temperature. The macerate obtained was filtered using Whatman number 3 filter paper and the filtrate obtained was evaporated in a rotary oven at 45°C. This process made it possible to obtain 5.6 g of crude extract with a yield of 8%.

2.2.2. Determination of Study Doses. The recommendations of the traditional healer allowed for obtaining from 400 mL of macerate 1.12 g of crude extract after drying. The dose used in rats was determined by multiplying the HED by 6.2 according to the method described by Nair [19], resulting in a dose of approximately 100 mg/kg. This dose was divided by 2 and then multiplied successively by 2 and 4 to obtain the doses of 50, 200, and 400 mg/kg. The dose of 300 mg/kg was obtained by averaging the doses of 200 and 400 mg/kg.

2.2.3. Phytochemical Analysis. The analysis of the phytochemical composition of the aqueous extract of the heartwood of *P. soyauxii* was carried out by using quantitative assays. Indeed, the levels of flavonoids, polyphenols, and tannins were evaluated according to Broadhurst and Jones [20], Singleton and Rossi [21], and Zhishen et al. [22], respectively.

2.2.4. UHPLC-MS Analysis of *P. soyauxii* Extract. UHPLC-MS analysis was used to identify the phytochemical profile of *P. soyauxii* extract in an attempt of standardization. To obtain high-resolution mass spectra of extract, a spectrometer (QTOF Bruker, Germany) equipped with a Heated Electrospray Ionization (HESI) source was used. The spectrometer operates in positive mode (mass range: 100–1500, with a scan rate of 1.00 Hz) with automatic gain control to provide high-accuracy mass measurements within

0.40 ppm deviation using sodium formate as calibrant. Spray voltage of 4.5 kV and capillary temperature of 200°C were used for assays. Nitrogen was used as sheath gas (10 L/min). The spectrometer was attached to an Ultimate 3000 (Thermo Fisher, Germany) UHPLC system consisting of LC-pump, diode array detector (DAD) (λ : 190–600 nm), autosampler (injection volume 10 μ L), and column oven (40 °C). The separation was performed using a Synergi MAXRP 100A (50 \times 2 mm, 2.5 μ particle size) with a H₂O (+0.1% HCOOH) (A)/acetonitrile (+0.1% HCOOH) (B) gradient (flow rate 500 μ L/min, injection volume 5 μ L). The sample was analyzed using a gradient program as follows: 95% A isocratic for 1.5 min, linear gradient to 100% B over 6 min, after 100% B isocratic for 2 min, the system returned to its initial condition (90% A) within 1 min and was equilibrated for 1 min. Based on the mass of compounds previously identified in *Pterocarpus* genus, identification of compounds was performed.

2.3. Animal Material. Healthy female albino Wistar rats (8–10 weeks old) weighing 120–130 g were supplied by the production facility of the Animal Physiology Laboratory, University of Yaoundé 1 (Cameroon). All rats were housed in clean plastic cages at the room temperature (natural cycle). They had free access to tap water and soy-free rat chow. The composition of animal diet was corn (60%), bone flour (3%), peanuts (5%), wheat (10%), fish flour (20%), salt (1%), and vitamin complex (Olivitazol) (1%). 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. Determination in Vitro of Antioxidant Properties

2.4.1. DPPH Radical Scavenging Assay. The DPPH free radical scavenging assay was carried out for the evaluation of the antioxidant activity. This assay measures the free radical scavenging capacity of the investigated extract. DPPH is a molecule containing a stable free radical. In the presence of an antioxidant, which can donate an electron to DPPH, the purple color typical for free DPPH radical decays and the absorbance change is measured at 517 nm. The antiradical activity of the plant extract was examined based on the scavenging effect of the stable DPPH free radical activity [23]. Briefly, 2 mL of DPPH (0.1 mM prepared in methanol) was introduced into a test tube containing 0.5 mL of extract (0.1 to 1 mg/mL). Then the mixture was stirred well for 5 min and incubated in the dark for 60 min at room temperature (20°C). For the control tube, methanol was used in place of the extract. The reference used was ascorbic acid at concentrations of 0.1 mg/mL to 1 mg/mL. A calibration curve was drawn from this reference. The antioxidant activity of the plant extract was expressed as a percentage inhibition following the relationship:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{OD control} - \text{OD sample})}{\text{OD control}} \times 100. \quad (1)$$

The IC₅₀ value (μ g/mL) is the effective concentration at which DPPH radicals were scavenged by 50% and the value was obtained by interpolation from linear regression analysis.

2.4.2. Determination of Ferric-Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay. The assessment of ferric-reducing antioxidant power (FRAP) was performed based on the ability of the tested substance to reduce ferric tripyridyl triazine (Fe III TPTZ) complex to ferrous form (intense blue color) at low pH by using a modified method of Benzie and Strin [24]. The solution of TPTZ (2,4,6-tri (2-pyridyl)-s-triazine) was obtained by diluting TPTZ (10 mM) in 10 ml of HCl (400 mM diluted with distilled water) and 10 mL of 10 mM iron chloride (FeCl₃) solution was prepared in distilled water. FRAP reagent was obtained by mixing 100 mL of acetate buffer (pH 3.6) with 10 ml of TPTZ solution and 10 ml of iron chloride solution. In test tubes containing 2 mL of FRAP reagent, 75 μ L of sample (extract/catechin) was added and the mixture was stirred and incubated for 15 minutes. Optical densities were read at the wavelength of 593 nm against white.

2.4.3. ABTS Radical Scavenging Assay. To determine ABTS radical scavenging assay, the method described by Re et al. [25] was used. Radical ABTS was obtained as follows: in an Erlenmeyer flask, 0.0384 g of ABTS and 0.00662 g of potassium persulfate (K₂S₂O₈) were weighed and then 10 mL of distilled water was added. The mixture was then solubilized for 5 min and incubated for 16 h at room temperature (20°C) in the dark before use. For the actual analysis, the ABTS solution was diluted with ethanol to an absorbance of 1.3 (\pm 0.02) at 734 nm and stable at 30°C (initial OD). Then in a test tube, 1.8 mL of this diluted ABTS solution and 0.2 mL of extract (1 mg/mL) were introduced and shaken well. The absorbance reading was taken at 734 nm and the values considered were those that remained stable at room temperature for approximately 1 minute. Ascorbic acid was used as the reference antioxidant at the same concentrations as extract. The results were expressed as a percentage of inhibition and calculated according to the following formula:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{OD control} - \text{OD sample})}{\text{OD control}} \times 100. \quad (2)$$

2.5. In Vivo Experimental Design

2.5.1. Effect of 3-Day Treatment with *P. soyauxii*. This test was performed according to the protocol described by the OCDE [26]. Forty 8-to-10-week-old female Wistar rats were used. Thirty-five of these rats were ovariectomized using a dorsal approach and 5 more underwent simulation surgery and formed the sham-operated group. 14 days after ovariectomy, the ovariectomized animals (Ovx) were randomized and then divided into 7 groups of 5 animals each for oral

administration of treatments for 3 days. The aqueous extract of *Pterocarpus soyauxii* heartwood was administered at doses of 50, 100, 200, 300, and 400 mg/kg and estradiol valerate (E₂V) was administered at a dose of 1 mg/kg. A group of Ovx animals and the sham-operated group received distilled water at 10 mL/kg. At the end of the treatments, vaginal smears were carried out, and then the animals were sacrificed by decapitation under anaesthesia with diazepam and ketamine. The estrogen-dependent organs (uterus, vagina, and mammary gland) were removed and then fixed in 10% buffered formaldehyde solution for histological analysis. Before fixation, the uterus was weighed and part of it was homogenized in McEwen's solution for the evaluation of the level of uterine proteins. At last, the fresh uterine weight, uterine protein levels, and uterine and vaginal epithelial size as well as mammary gland alveolar and ductal differentiation were assessed.

2.5.2. Evaluation of *Pterocarpus soyauxii* Activities in a Postmenopausal Model. Thirty-five rats were either sham-operated (sham) or bilaterally ovariectomized (Ovx) like in the first experiment. Eighty-four days later, animals were distributed in seven different groups ($n = 5$) and treated per os once daily for 28 consecutive days as follows: sham and an Ovx group received distilled water, the 4 others batches received, respectively, 1 mg/kg of E₂V, and *P. soyauxii* aqueous extract at 100, 200, and 300 mg/kg. At day 21, insulin tolerance test was realized. Animals were weighted weekly. Twenty-four hours after the last administration (day 29) and following a 12 h of overnight fasting, animals were sacrificed under light anaesthesia. Blood samples were taken and centrifuged at 3500 g (15 min at 4°C) to obtain serum samples which were kept at -15°C for the determination of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), and high-density cholesterol (HDL-C) levels. The concentration of low-density lipoproteins cholesterol (LDL-C) and very-low-density lipoproteins (VLDL) levels was calculated using the Friedewald equation [27]. Uterus, vagina, and aorta were dissected out and cleaned of all soft tissues. Prior to immersion-fixation of organs in the formaldehyde 10% buffered for histological analysis, they were weighted. A portion of aorta was homogenized in Mac even buffer to evaluate antioxidant parameters. Abdominal fat of each animal was weighted.

2.6. Vaginal Cellular Differentiation. Vaginal smears were carried out at the end of the experiment using an eyedropper containing 10 µL of NaCl 0.9%, placed on ringed slides, fixed, and coloured with Papanicolaou method [28]. Cellular differentiation was observed under a light microscope at ×100 magnification.

2.7. Insulin Tolerance Test (ITT) in Ovariectomized Rats. Prior to an ITT test, rats were fasted for 12 h. A single dose of insulin at a dose of 2 UI/kg was injected *i.p.* into each rat. Blood samples were taken from tail veins and the blood sugar levels were measured using the Accu-chek reactive

strips at 0 (just before the insulin injection), 10, 20, 30, and 60 min after injection of insulin.

2.8. Determination of Relative Weight of Organs. The relative fresh weight of uterus, abdominal fat, and aorta was calculated using the following formula according to [29]:

$$\text{Organ weight ratio} = \frac{\text{Uterus Weight (g)}}{\text{Body weight (g)}} \times 100. \quad (3)$$

2.9. Assays for Lipid Profile. Serum total cholesterol (TC), triglycerides (TG), and HDL cholesterol (HDL-C) levels were assessed using commercial diagnostic kits Fortress, UK. The levels of LDL cholesterol (LDL-C) were assessed by using the following formula: LDL-Chol (mg/dL) = Chol - (TG/5) - HDL-Chol. VLDL cholesterol (VLDL-C) level was calculated with the following formula: TG/5 [27]. Atherogenic index (AI) was calculated as TC on HDL-C.

2.10. Oxidative Stress Parameters Investigation. Malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) in aorta homogenate were determined using the methods described by Wilbur et al. [30] and Ellman [31], respectively, while the nitrites content was determined using the method described by Green et al. [32].

2.11. Histomorphometric Analysis of Uterine, Vaginal, and Aorta Tissues. Aortic, uterine, vaginal, and mammary gland tissues after fixation (2 weeks) in formaldehyde 10% buffered were trimmed and dehydrated in alcohol of croissant gradient (70%, 80%, 90%, and 100% (3 baths)). After tissues were clarified in 2 baths of xylene (1h30 min per bath) and impregnated in liquid paraffin at 60°C (for 5 hours), uterine and vaginal epithelial sizes as well as intima and media heights were assessed from 5 µm sections of paraffin-embedded and haematoxylin-eosin stained uterine and vaginal tissues. Epithelial sizes were assessed on microphotographies obtained by using a light microscope (Leitz wetzlar Germany 513) connected with a digital camera celestron 44421 linked to a computer where images were transferred.

2.12. Statistical Analysis. Data were expressed as mean ± standard error on mean. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey post hoc test using GraphPad Prism 8.0.1. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Phytochemical Analysis. The phytochemical analysis revealed that heartwood of *Pterocarpus soyauxii* extract contains, respectively, 229.42 ± 3.62 mg EAG/g, 63.42 ± 2.16 mg EQ/g, and 27.88 ± 0.23 mg ETA/g of polyphenols, flavonoids, and tannins (Table 1).

TABLE 1: Phytochemical analysis of *P. soyauxii* aqueous extract.

Secondary metabolites	Aqueous extract of <i>Pterocarpus soyauxii</i> heartwood
Flavonoids (mg EQ/g)	63.42 ± 2.16
Polyphenols (mg EAG/g)	229.42 ± 3.62
Tannins (mg ETA/g)	27.88 ± 0.23

mg ETA/g = mg equivalent of tannic acid per gram of extract. mg EGA/g = mg equivalent of gallic acid per gram of extract. mg EQ/g = mg equivalent of quercetin per gram of extract.

3.2. Identification of Compounds of *P. soyauxii* Extract by UHPLC-MS Analysis. Ultra-High-Performance Light Chromatography allowed the separation of components of the aqueous extract of *Pterocarpus soyauxii*. Ions mass spectrometry and a representative base peak chromatogram are shown in Figure 1 and Table 2. UHPLC-MS enabled identifying seven components: ambrial, 7-O-acetylformononetin, khrinone A, mono(2-ethylhexyl) phthalate, cembrene, 3',5'-dimethoxy-4-stilbenol, and linoleic acid.

3.3. In Vitro Antioxidant Activity. According to the results obtained in Table 3, vitamin C exhibits greater anti-free radical activity than that of our extract. It had the smallest IC₅₀ against the DPPH and ABTS radicals. The inhibitory concentration 50 of vitamin C was 24.56 µg/mL while the aqueous extract of *P. soyauxii* was 730.20 µg/mL for the DPPH radical while it was 37.75 for vitamin C against 892.90 for the extract of PS for the radical ABTS. The concentration of FRAP was 765.75 mEAG/g.

3.4. Effects of a 3-Day Treatment with *P. soyauxii*

3.4.1. Effect on Relative Weight, Protein Level, and the Size of the Epithelium of Uterus. Figure 2 represents effects of 3-day treatment with aqueous extract of *P. soyauxii* heartwood on the relative weight of the uterus (Figure 2(a)), the size of the uterine epithelium (Figure 2(b)), and uterine protein level (Figure 2(c)). The extract induced a significant increase in the relative weight of the uterus and the size of the uterine epithelium at the doses of 200 and 300 mg/kg with respective probabilities of $p < 0.001$ and $p < 0.01$ as compared to the ovariectomized animals treated with distilled water. Figure 2(c) also shows that the extract induced a significant increase in uterine protein levels ($p < 0.05$) at doses of 100 and 400 mg/kg. The doses of 200 and 300 mg/kg also significantly increased this uterine protein level ($p < 0.001$) in comparison to animals in the Ovx control.

3.4.2. Effect on the Size of the Vagina Epithelium. According to Figure 3, the histomorphometry of vaginal histological sections showed a significant ($p < 0.001$) increase in the size of the vaginal epithelium at the doses of 200 and 300 mg/kg and significant decrease in the size of the vaginal epithelium at a dose of 400 mg/kg.

3.4.3. Effect on Vaginal Cytology and Microarchitecture of Vagina, Uterus, and Mammary Gland. Figure 4 represents effects of 3-day treatment with aqueous extract of *P. soyauxii*

heartwood on the vaginal cytology and microarchitecture of vaginal, uterus, and mammary gland. The three-day treatment with the aqueous extract of *P. soyauxii* heartwood 14 days after ovariectomy resulted in the appearance of superficial cells on vaginal smears of female rats treated with the extract at the doses of 100, 200, 300, and 400 mg/kg as well as estradiol valerate. However, the vaginal smear of the rats treated with the extract at a dose of 50 mg/kg revealed parabasal, polynuclear, and some superficial cells, which indicate a cycle at the metestrus stage. According to Figure 4, the 3-day treatment with plant extract and E₂V resulted in stratification of the vaginal epithelium at doses of 200 and 300 mg/kg compared with that of Ovx group animals treated with distilled water. On the mammary gland, *P. soyauxii* aqueous extract at doses of 100, 200, and 300 mg/kg like E₂V compared to Ovx animals induced a differentiation of the cell layers of the acinus, an increase of eosinophilic secretions in the lumen of the acini, and heights lobule in Ovx rats. The microphotographies of uterus shows a differentiation of the endometrium with both estradiol valerate and the extract at doses of 200 and 300 mg/kg compared to the Ovx group.

3.5. *P. soyauxii* Activities in a Postmenopausal Model

3.5.1. Effects on the Vaginal Epithelium. According to Figure 5(a), the 28-day treatment with plant extract resulted in stratification of the vaginal epithelium at the doses of 200 and 300 mg/kg compared with that of Ovx group animals treated with distilled water. In addition, the histomorphometry of vaginal histological sections shows a significant ($p < 0.01$) increase in the height of the vaginal epithelium height doses of 200 mg/kg. The dose of 300 mg/kg induced a significant ($p < 0.001$) increase in the size of the vaginal epithelium.

3.5.2. Effects on the Uterine Epithelium. The 28-day treatment with the extract of *P. soyauxii* did not have any effect on uterine epithelium at all doses. As shown by Figure 6, the uterine epithelium is simple cubic in all rats treated with the extract of *P. soyauxii* contrary to the one treated with estradiol valerate which is stratified.

3.5.3. Effects on the Mammary Gland. As shown by Figure 7, *P. soyauxii* at 100 mg/kg exhibits a cell differentiation and production of eosinophilic secretions according to Figure 8. Nevertheless, this differentiation is weaker than E₂V one.

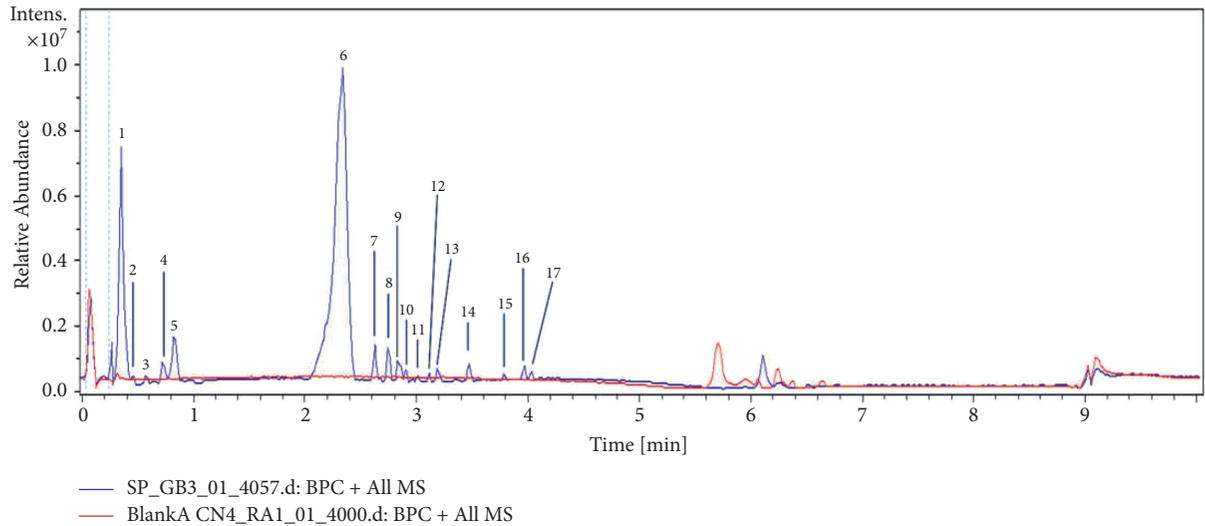


FIGURE 1: Chromatographic profile of *Pterocarpus soyauxii* aqueous extract.

TABLE 2: Main signals exhibited in the LC-MS spectra of compounds detected in *Pterocarpus soyauxii* and proposed attribution.

N°	Tr (min)	[M + H] ⁺		Molecular formula	Name of compound	Molecular classes
		Exp.	Calcl.			
1	0.4	235.2035	235.2056	C ₁₆ H ₂₇ O	Ambrial	—
2	0.5	215.0544	215.0550	C ₉ H ₁₁ O ₆	Not identified	—
3	0.6	311.0875	311.0914	C ₁₈ H ₁₅ O ₅	7-O-Acetylformononetin	Isoflavone
4	0.7	301.0738	301.0707	C ₁₆ H ₁₃ O ₆	Khrinone A	Isoflavonoid
5	0.8	181.1063	181.1071	C ₇ H ₁₇ O ₅	Not identified	—
6	2.4	195.1223	195.1227	C ₈ H ₁₉ O ₅	Ammoniated polyethylene glycol	—
7	2.6	279.1609	279.1591	C ₁₆ H ₂₃ O ₄	Mono(2-ethylhexyl) phthalate	Aromatic dicarboxylic acid
8	2.8	437.2909	437.2898	C ₂₅ H ₄₁ O ₆	Not identified	—
9	2.9	273.2577	273.2577	C ₂₀ H ₃₃	Cembrene A	Diterpene
10	2.9	305.1074	305.1078	C ₉ H ₂₁ O ₁₁	Not identified	—
11	3.0	209.1507	209.1536	C ₁₃ H ₂₁ O ₂	Not identified	—
12	3.1	211.1301	211.1329	C ₁₂ H ₁₉ O ₃	Not identified	—
13	3.2	293.2127	293.2111	C ₁₈ H ₂₉ O ₃	Not identified	—
14	3.5	257.1210	257.1172	C ₁₆ H ₁₇ O ₃	3',5'-Dimethoxy-4-stilbenol	Stilbenoid
15	3.8	281.2495	281.2474	C ₁₈ H ₃₃ O ₂	Linoleic acid	Fatty acid
16	4.0	235.2054	235.2056	C ₁₆ H ₂₇ O	Not identified	—
17	4.1	263.2378	263.2369	C ₁₈ H ₃₁ O	Not identified	—

TABLE 3: Inhibitory concentration 50 of *P. soyauxii* aqueous extract against DPPH and ABTS radicals and FRAP concentration.

Parameters substances	FRAP (mEAG/g)	IC ₅₀ of DPPH (μg/mL)	IC ₅₀ of ABTS (μg/mL)
Vitamin C	—	24.56	37.75
PS extract	765.79	730.20	892.90

3.5.4. Effects on Weight Gain and Abdominal Fat. Figure 8(a) shows a significant increase in weight gain on days 7 and 14 of treatment, respectively, of $p < 0.01$ and $p < 0.05$ in ovariectomized rats compared with sham-operated animals. Likewise, Figure 7(b) shows a significant increase ($p < 0.001$) in the relative weight of abdominal fat in ovariectomized rats treated with distilled water compared to sham-operated rats. The extract of *P. soyauxii* at the dose of 300 mg/kg induced a significant decrease ($p < 0.05$) in weight gain on 14 and 21 days of treatment and the same effect ($p < 0.001$) on relative weight abdominal fat compared

to Ovx animals. Extract at the dose of 200 mg/kg decreased only relative weight abdominal fat ($p < 0.001$) and weight gain on 21 days of treatment compared to Ovx animals.

3.5.5. Effects on Serum Glucose Levels during Insulin Resistance Test. Figure 9 below shows a significant increase in serum glucose levels of ($p < 0.01$) and ($p < 0.001$), respectively, at 20 and 30 minutes in ovariectomized rats compared to sham-operated rats. The extract of *P. soyauxii* at the dose of 200 mg/kg resulted in a significant decrease in serum

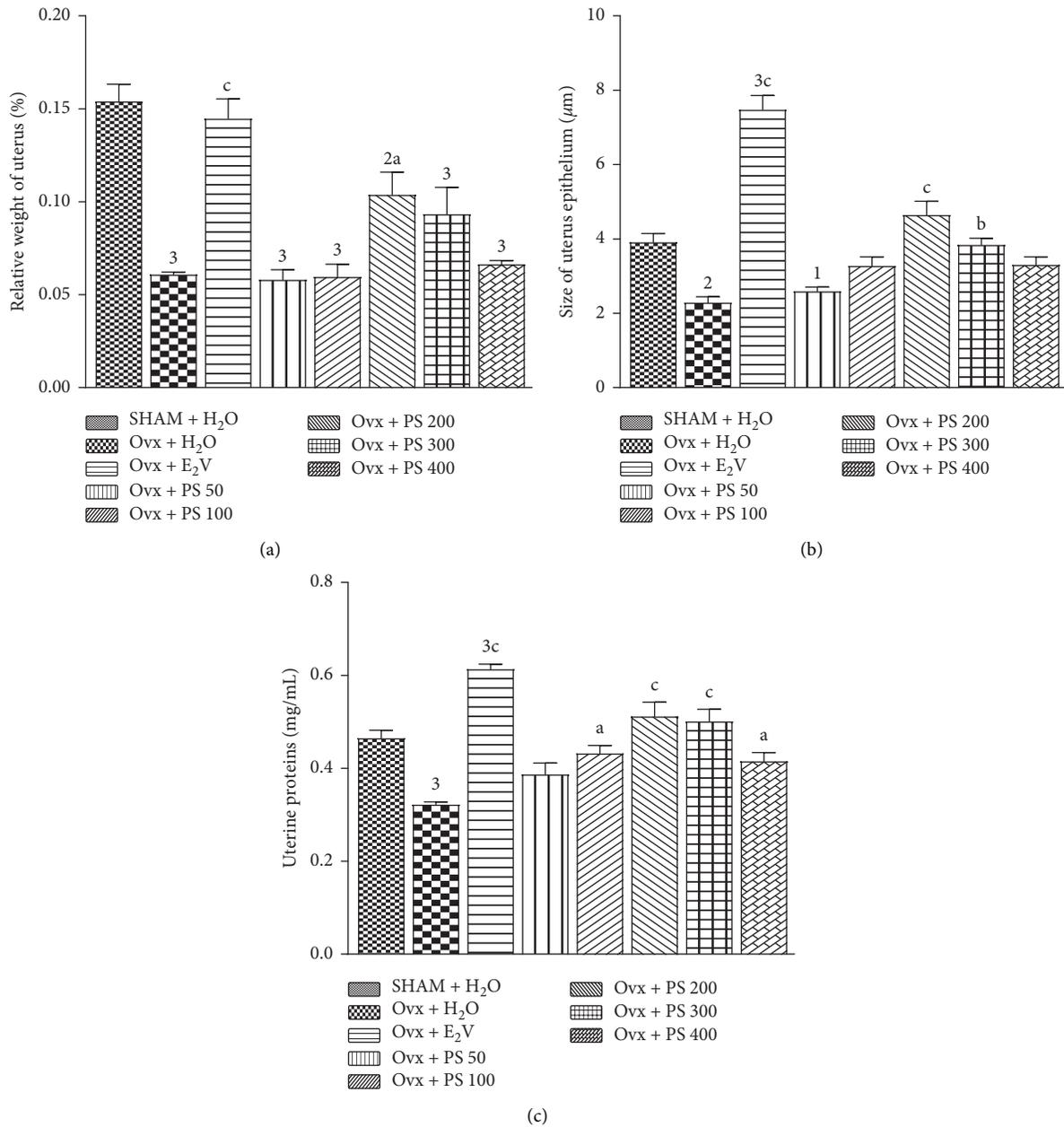


FIGURE 2: Effects of a 3-day treatment with *P. soyauxii* on relative weight of fresh uterus. (a) Size of uterine epithelium. (b) Total uterine protein levels. (c).¹ $p < 0.05$; ² $p < 0.01$; ³ $p < 0.001$, significant difference compared to sham-operated control; ^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.001$, significant difference compared to Ovx control rats. PS = *P. soyauxii*.

glucose levels at 20 and 30 minutes of $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively, as compared to Ovx animals. The extract at the dose of 300 mg/kg resulted also in a significant decrease in serum glucose levels at 20 and 30 minutes of $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively, as compared to Ovx animals.

3.5.6. Effects on Relative Weight of the Aorta and on Aortic Protein. Figure 10 shows a significant decrease ($p < 0.05$) in the aortic protein. There was also a significant ($p < 0.05$) increase in the relative weight of the aorta in Ovx rats as compared to sham-operated rats (Figure 10(a)). The extract of *P. soyauxii* at the dose of 300 mg/kg resulted in a

significant increase ($p < 0.001$) in aortic protein levels and a significant decrease ($p < 0.001$) in relative weight of this organ. *P. soyauxii* extract at the doses of 100 and 200 mg/kg significantly increased protein levels ($p < 0.001$) but had no effect on relative aortic weight.

3.5.7. Effects of *P. soyauxii* on Serum Lipid Levels. Ovariectomy caused a substantial increase in the TC, TG, LDL-C, and VLDL-C levels (Table 4) and also caused substantial decrease in HDL-C levels and increase in atherogenic index as compared to sham-operated control group ($p < 0.001$). In Ovx rats, treatment with 100 mg/kg/day of *P.*

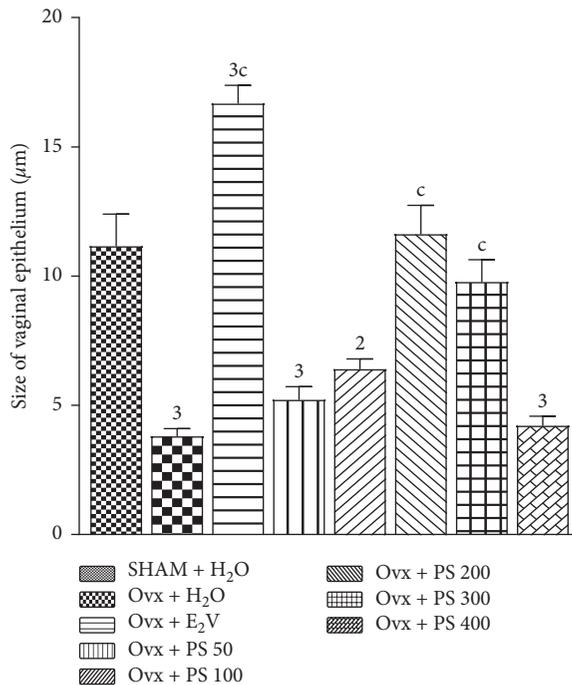


FIGURE 3: Effect of a 3-day treatment with *P. soyauxii* on vaginal epithelium. ² $p < 0.01$; ³ $p < 0.001$, significant difference compared to sham-operated control; ^c $p < 0.001$, significant difference compared to Ovx control. PS = *P. soyauxii*.

soyauxii induced a significant decrease in TG, LDL-C, and VLDL-C levels and atherogenic index ($p < 0.05$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, and $p < 0.05$) but did not affect HDL-C and TC levels compared with the Ovx-control group. *P. soyauxii* at the dose of 200 mg/kg/day has significantly reduced TC, TG, LDL-C, and VLDL-C levels and atherogenic index ($p < 0.01$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, and $p < 0.001$) and increased HDL-C levels ($p < 0.05$) as compared to Ovx-control group. At the dose of 300 mg/kg/day, *P. soyauxii* extract significantly decreased TG, LDL-C, and VLDL-C levels and atherogenic index ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, and $p < 0.001$) and significantly increased HDL-C levels ($p < 0.05$) as compared to Ovx group.

3.5.8. Effects of *P. soyauxii* on Oxidative Stress Status. After 84 days, ovariectomy resulted in a significant increase ($p < 0.001$) in MDA level and a significant decrease ($p < 0.001$) in GSH and nitrite levels in the aorta. The plant at the dose of 100 mg/kg significantly increases the levels of nitrites but had no effect on the level of GSH and MDA. *P. soyauxii* extract at the dose of 200 and 300 mg/kg significantly decreased ($p < 0.001$, $p < 0.01$, resp.) the MDA level and likewise increased ($p < 0.001$, $p < 0.01$, resp.) GSH and nitrites levels (Figure 11).

3.5.9. Effects of *P. soyauxii* on Aorta Histology. As shown in Figure 12, after 84 days, ovariectomy induced leukocyte infiltration in aorta compared to sham-operated rats. Leukocyte infiltration was associated with a high ratio intima/

media ($p < 0.001$) in Ovx rats. The extract at the dose of 100, 200, and 300 mg/kg prevented leukocyte infiltration on aorta sections. Furthermore, *P. soyauxii* extract significantly reduced at all doses the ratio intima/media in Ovx rats compared to the control group treated with distilled water.

4. Discussion

The aim of the present study was to assess estrogenic and antioxidant activities of aqueous extract of *P. soyauxii* heartwood in a model of oophorectomy in Wistar rats. For this, a 3-day uterotrophic assay according to the protocol of the Organization for Economic Cooperation and development [26] was used to verify estrogenic potential of the extract in ovariectomized rats. *In vitro* antioxidant capacity of *P. soyauxii* heartwood was evaluated using protocols described by numerous authors [23–25]. Then, an 84-day postoophorectomy model was used as described in numerous studies [13, 14] to assess properties of the plant extract on postmenopausal cardiovascular disorders and aortic oxidative stress. Compared to Ovx control, results of the 3-day uterotrophic assay showed that aqueous extract of *P. soyauxii* heartwood at 200 and 300 mg/kg exhibited uterotrophic activities characterized by an increase of relative weight, epithelial height, and protein level of the uterus. Plant extract also led to vagina cornification and stratification correlated with an increase of vaginal epithelium height and the density of follicle cells. The uterotrophic assay also showed an increased eosinophilic secretion in lumen of mammary acini at 200 and 300 mg/kg. Indeed, it is histologically known that oophorectomy leads to atrophy of estrogen-dependent tissues like a decrease of vaginal and uterine epithelia heights; it also reduced eosinophilic secretions in the lumen of mammary acini [33–35]. Estrogenic activities of *P. soyauxii* extract could be due to flavonoids found in the plant extract (63.42 ± 2.16 quercetin equivalent). As a matter of fact, flavonoids represent the most potent phytoestrogen family [36]. The results of *in vitro* antioxidant assay showed that *P. soyauxii* extract has induced inhibition of the DPPH and ABTS free radical with IC₅₀ of 730.20 and 892.90 µg/mL, respectively. This antioxidant activity could be linked to the richness of the plant extract in phenolic compounds and linoleic acid according to LC-MS analysis. Indeed, linoleic acid can prevent the production of ROS by protecting membranes composed of 1-palmitoyl 2-linoleoyl phosphatidylcholine [37]. Besides, purslane leaves like *P. soyauxii* aqueous extract exhibit antioxidant-like properties due to phenols and linoleic acid [38].

These estrogenic and antioxidant activities of *P. soyauxii* extract can be beneficial for deep hypoestrogenism observed in postmenopausal women. Indeed, oophorectomy leads to a reduction in circulating estrogen levels [39]. In rats, long-term oophorectomy is an appropriate experimental research model to study postmenopausal disorders [40] such as atrophy of estrogen-dependent tissues, cardiovascular risk factors primarily obesity, and dyslipidaemia [41, 42]. In this study, compared to sham-operated group, 84-days oophorectomy resulted in an atrophy of estrogen-

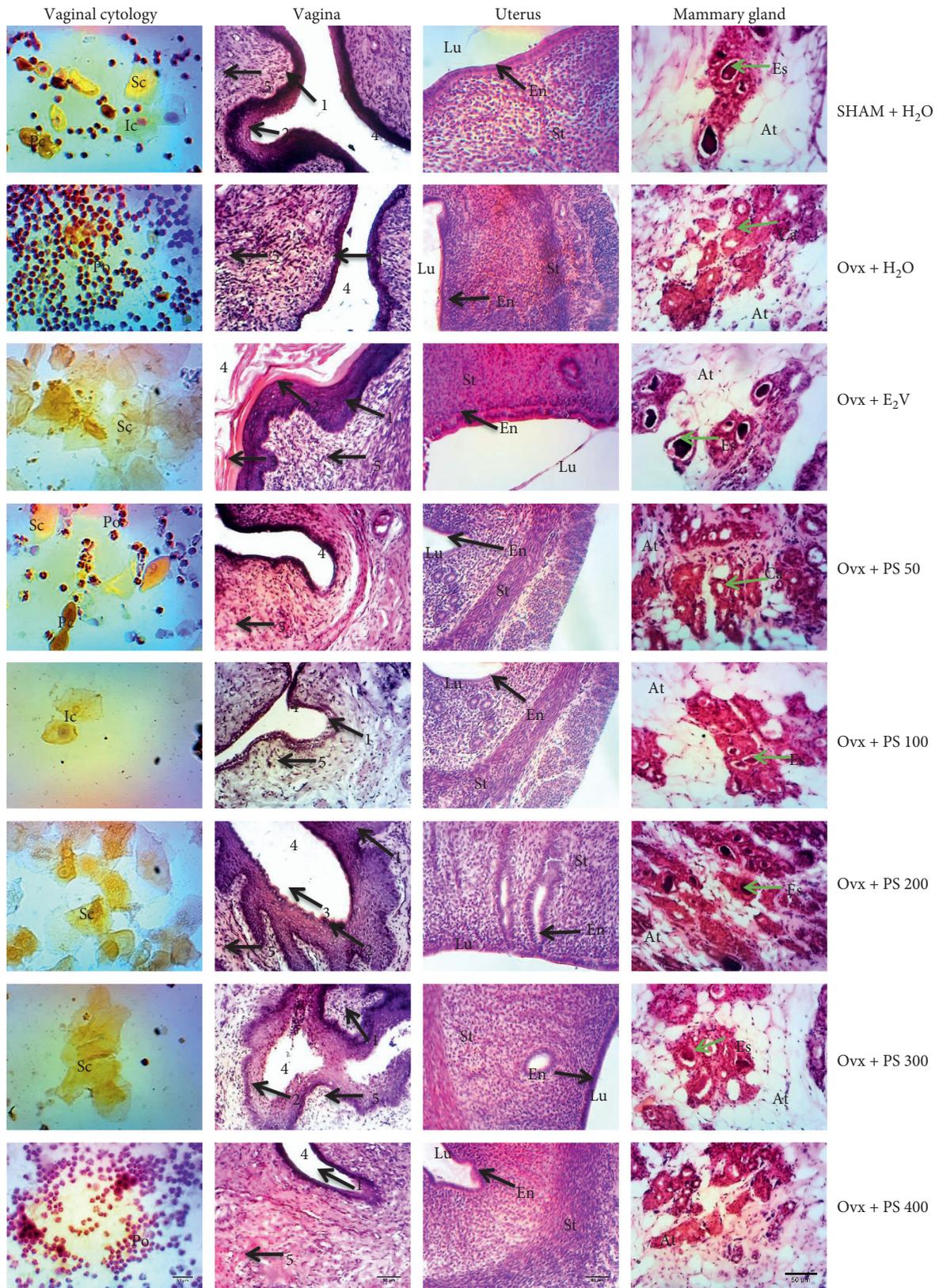


FIGURE 4: Microphotographies of vaginal cytology (100x, Papanicolaou) and the microarchitecture of vagina, uterus, and mammary gland (HE, 100x) after 3-days treatment with *Pterocarpus soyauxii* heartwood extract. PS= *P. soyauxii*; **vaginal cytology:** Sc= superficial cell; Ic= intermediate cell; Po = polynuclear; Pc= parabasal cell; **vagina:** 1 = *Stratum germinativum*; 2 = *Stratum granulosum*, 3 = *Stratum corneum*, 4 = lumen, 5 = chorion; **uterus:** Lu = uterine lumen; En = endometrium; St = myometrium; **mammary gland:** At = adipose tissue; Es = eosinophilic secretion; Ca = cell layer of the acinus.

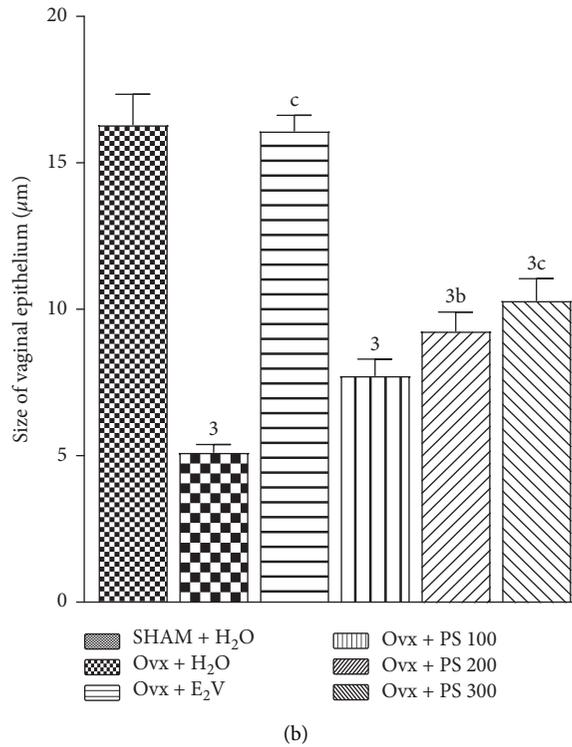
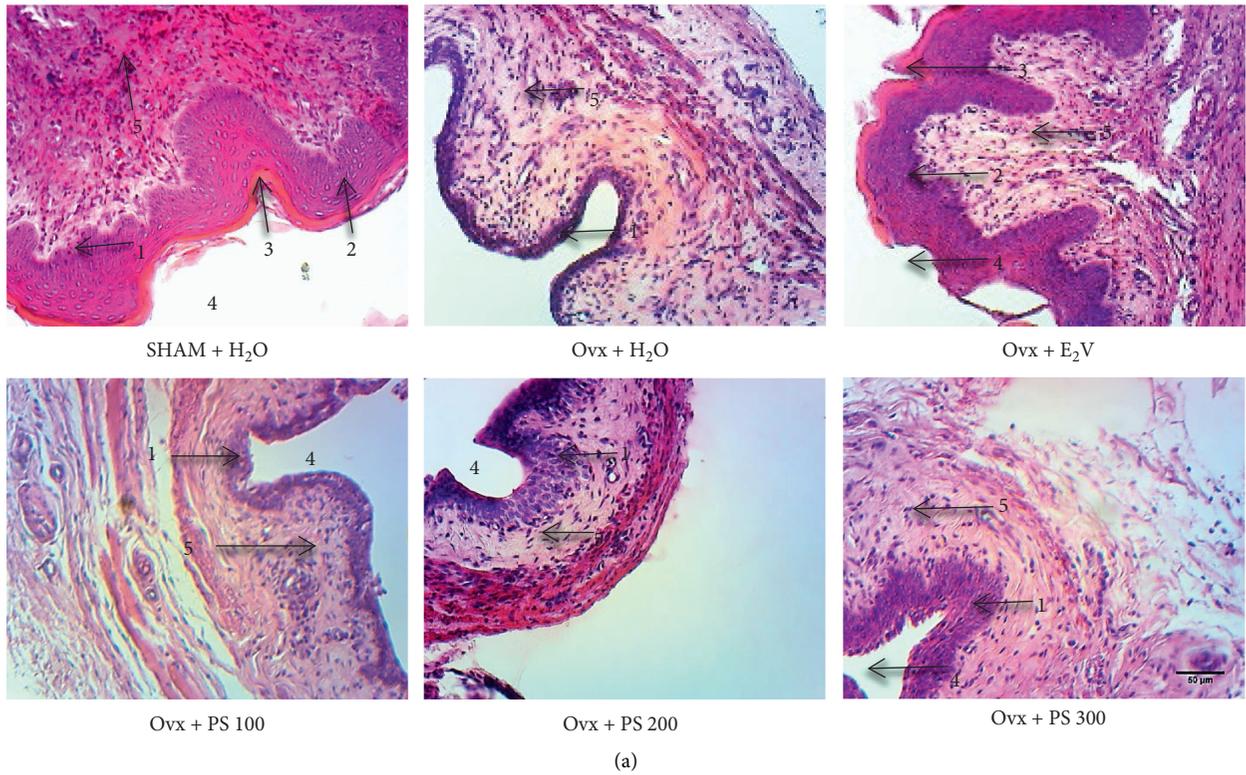


FIGURE 5: Effects of a 28-day treatment of with PS on vaginal epithelium (100x, haematoxylin-eosin). ³ $p < 0.001$, significant difference compared to sham-operated control; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.001$, significant difference compared to OvX control. 1 = *Stratum germinativum*; 2 = *Stratum granulosum*, 3 = *Stratum corneum*, 4 = lumen, 5 = chorion.

dependent tissues characterized firstly by a decrease of uterus relative weight, epithelial height, and protein level, and secondly by a decrease of vagina epithelial height as well

as a decrease of mammary acini diameter and a lack of eosinophilic secretions in acini lumen. These effects could be attributed to ovarian loss. Indeed, ovaries estradiol

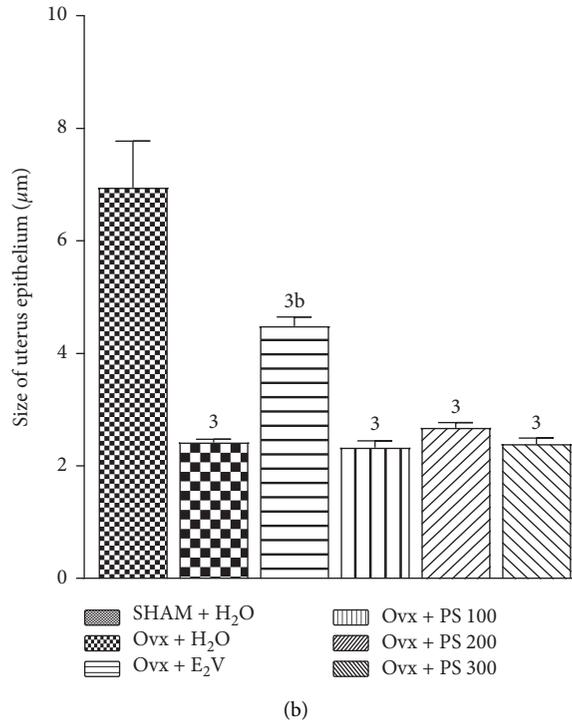
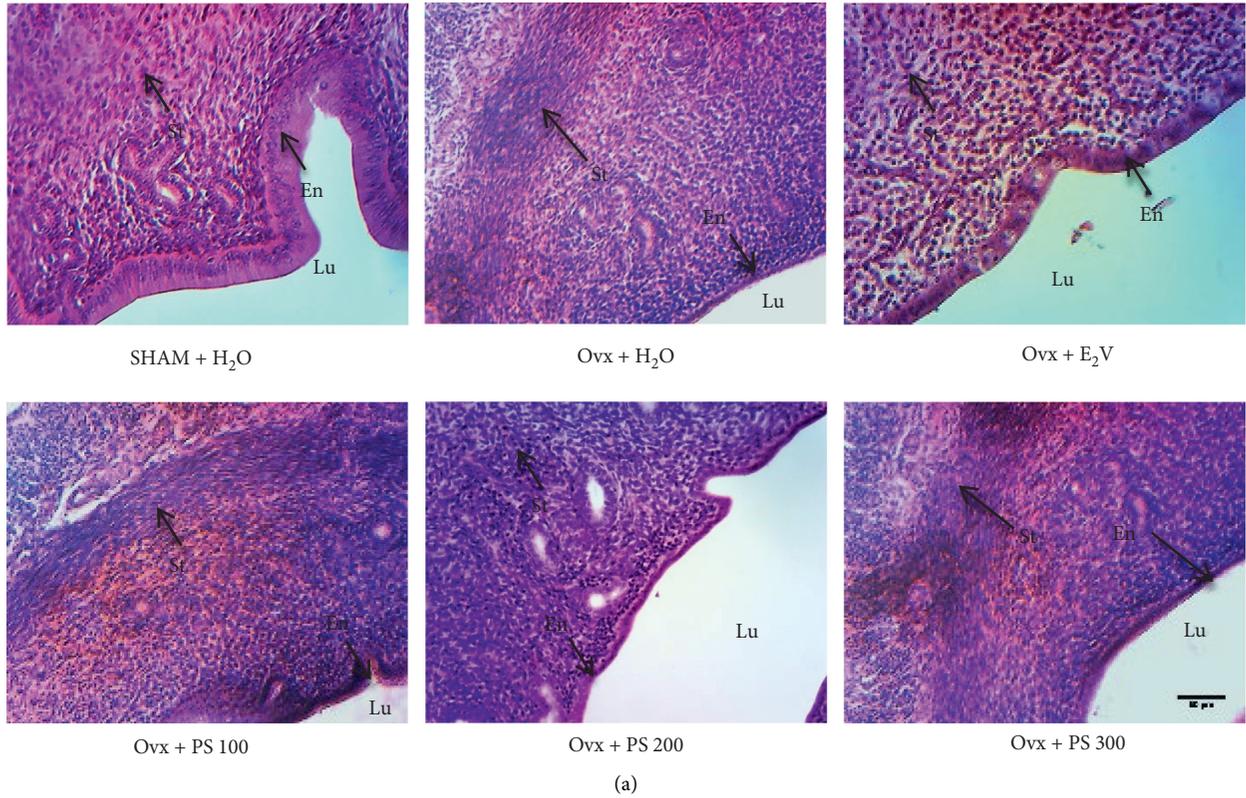


FIGURE 6: Effects of a 28-day treatment with *P. soyauxii* on uterine epithelium (100X, haematoxylin-eosin). ³ $p < 0.001$, significant difference compared to sham-operated control; ^b $p < 0.01$, significant difference compared to Ovx rats treated with distilled water. PS = *P. soyauxii*; Lu = uterine lumen; En = endometrium; St = myometrium.

normally supplies dynamic development of estrogen-dependent tissues via a proliferative activity involving estrogen receptors [43]. The 28-days treatment with

Pterocarpus soyauxii aqueous extract resulted in stratification and an increase of vagina epithelial height without noticeable effects on mammary gland and uterus. Effect on

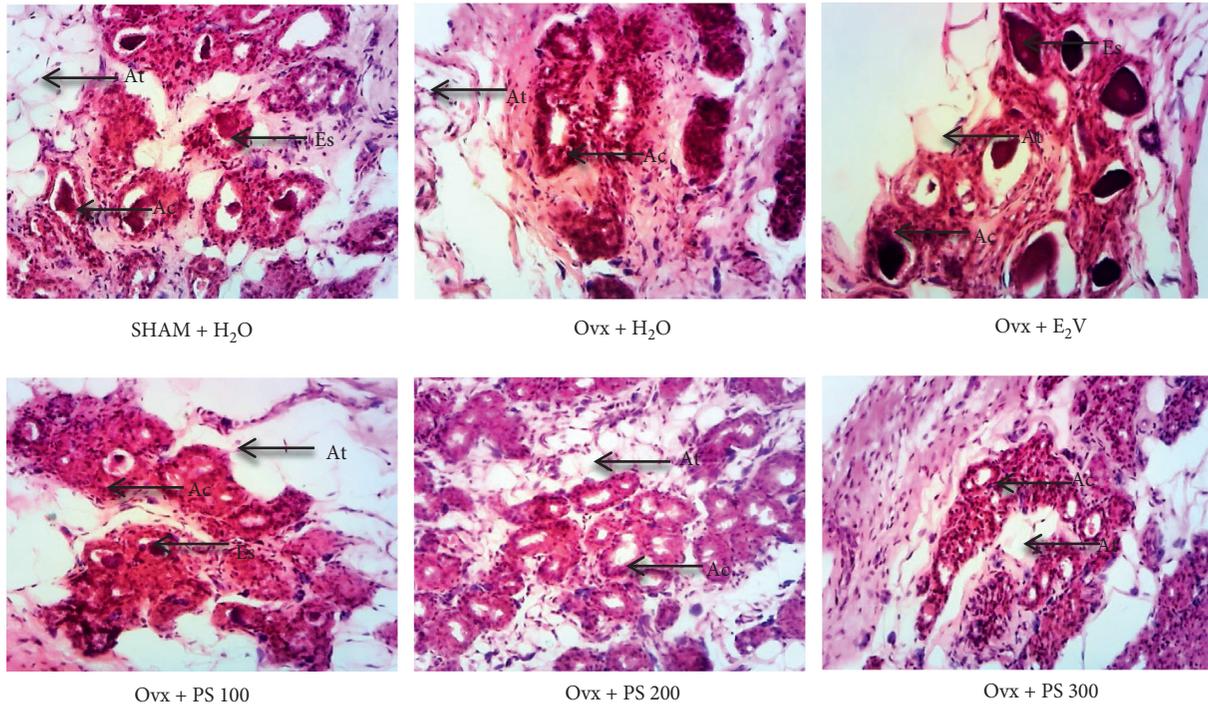


FIGURE 7: Effect of a 28-day treatment with PS on mammary gland (100×, haematoxylin-eosin) showing the differentiation in Ovx rats. At = adipose tissue; Es = eosinophilic secretion; Ca = cell layer of the acinus. (a) SHAM + H₂O. (b) Ovx + H₂O. (c) Ovx + E₂V. (d) Ovx + PS 100. (e) Ovx + PS 200. (f) Ovx + PS 300.

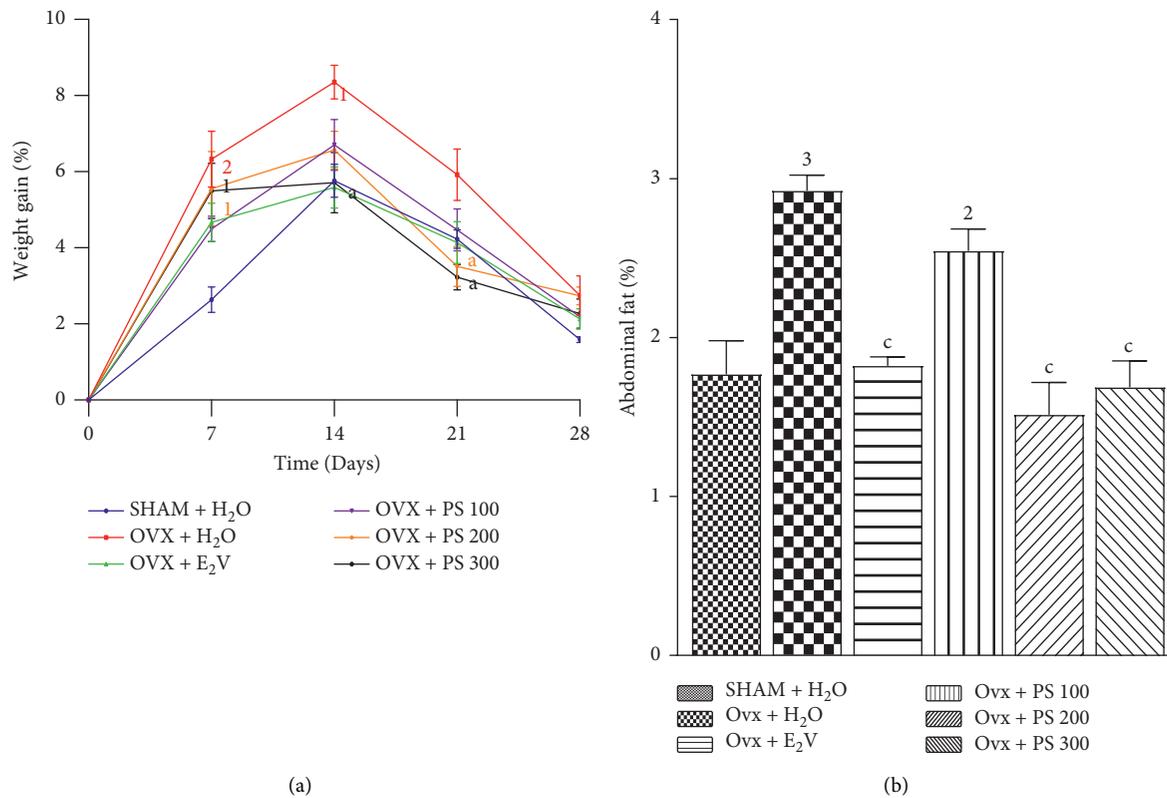


FIGURE 8: Effects of a 28-day *P. soyauxii* treatment on weight gain (a) and abdominal fat (b). ¹*p* < 0.05; ²*p* < 0.01; ³*p* < 0.001, significant difference compared to sham-operated control; ^a*p* < 0.05; ^b*p* < 0.01; ^c*p* < 0.001, significant difference compared to Ovx control; PS = *P. soyauxii*.

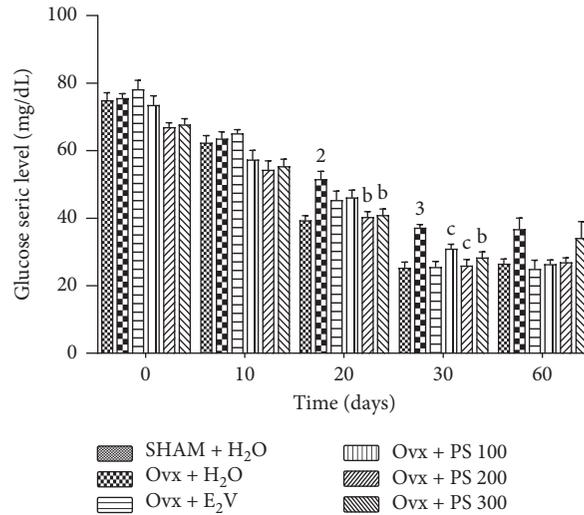


FIGURE 9: Effects of a 21-day treatment with *P. soyauxii* on serum glucose levels during insulin resistance test. ¹*p* < 0.05; ²*p* < 0.01; ³*p* < 0.001, significant difference compared to sham-operated control; ^a*p* < 0.05; ^b*p* < 0.01; ^c*p* < 0.001, significant difference compared to Ovx control; PS = *P. soyauxii*.

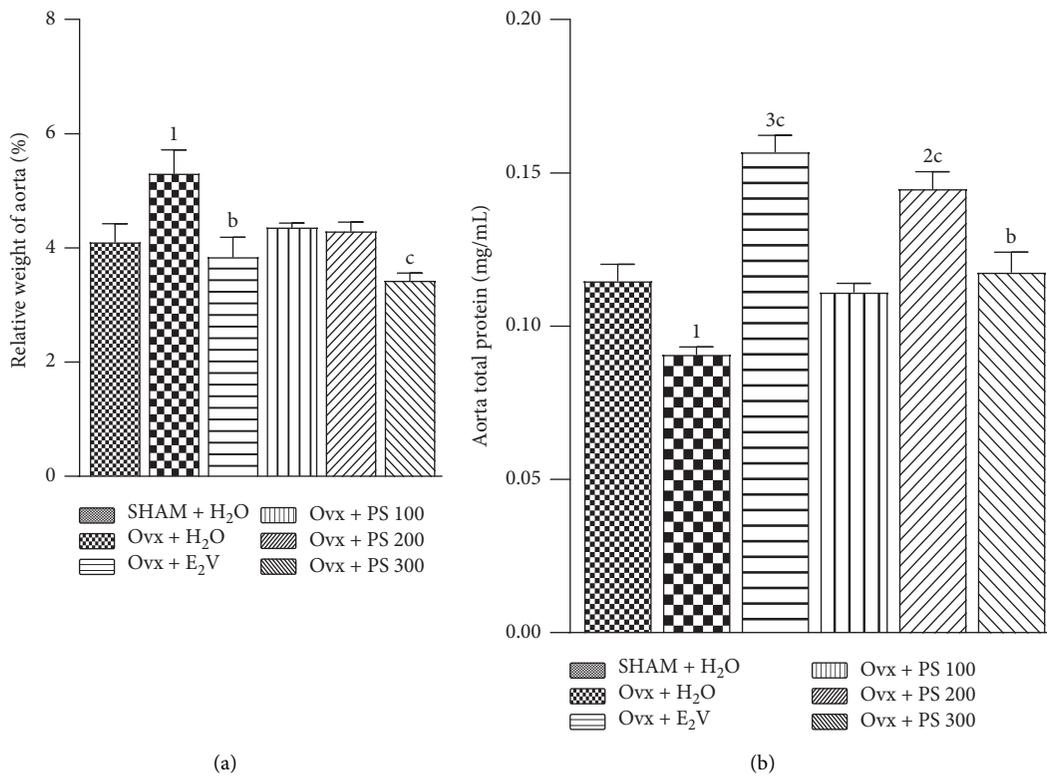


FIGURE 10: Effects of a 28-day treatment with *P. soyauxii* on fresh aorta weight (a) and aorta total protein levels (b). ¹*p* < 0.05; ²*p* < 0.01; ³*p* < 0.001, significant difference compared to sham-operated control; ^b*p* < 0.01; ^c*p* < 0.001, significant difference compared to Ovx control.

TABLE 4: Effects of a 28-day treatment with *P. soyauxii* on lipid profile.

Groups parameters	Sham + H ₂ O	OVX + H ₂ O	OVX + E ₂ V	OVX + PS 100	OVX + PS 200	OVX + PS 300
TC (mmol/L)	1.43 ± 0.03	1.85 ± 0.03 ³	1.56 ± 0.05 ^c	1.80 ± 0.03 ³	1.57 ± 0.01 ^b	1.69 ± 0.02
HDL-C (mmol/L)	0.97 ± 0.02	0.55 ± 0.01 ³	0.78 ± 0.04 ^{1b}	0.54 ± 0.02 ³	0.74 ± 0.02 ^{2a}	0.74 ± 0.01 ^{2a}
LDL-C (mmol/L)	0.32 ± 0.05	1.12 ± 0.02 ³	0.56 ± 0.07 ^c	0.61 ± 0.06 ^c	0.71 ± 0.03 ^{3c}	0.60 ± 0.06 ^c
TG (mmol/L)	0.63 ± 0.02	0.84 ± 0.00 ³	0.68 ± 0.02 ^b	0.73 ± 0.03	0.67 ± 0.00 ^b	0.69 ± 0.01 ^b
VLDL (mmol/L)	0.12 ± 0.00	0.16 ± 0.00 ³	0.12 ± 0.00 ^c	0.14 ± 0.00	0.13 ± 0.00 ^b	0.14 ± 0.00 ^c
AI	1.45 ± 0.05	3.31 ± 0.05 ³	2.20 ± 0.12 ^{3c}	3.44 ± 0.06	2.24 ± 0.08 ^c	2.17 ± 0.13 ^{3c}

Values represent means ± SEM (*n* = 5); ¹*p* < 0.05; ²*p* < 0.01; ³*p* < 0.001, significant difference compared to sham-operated control; ^a*p* < 0.05; ^b*p* < 0.01; ^c*p* < 0.001, significant difference compared to Ovx control; PS = *P. soyauxii*.

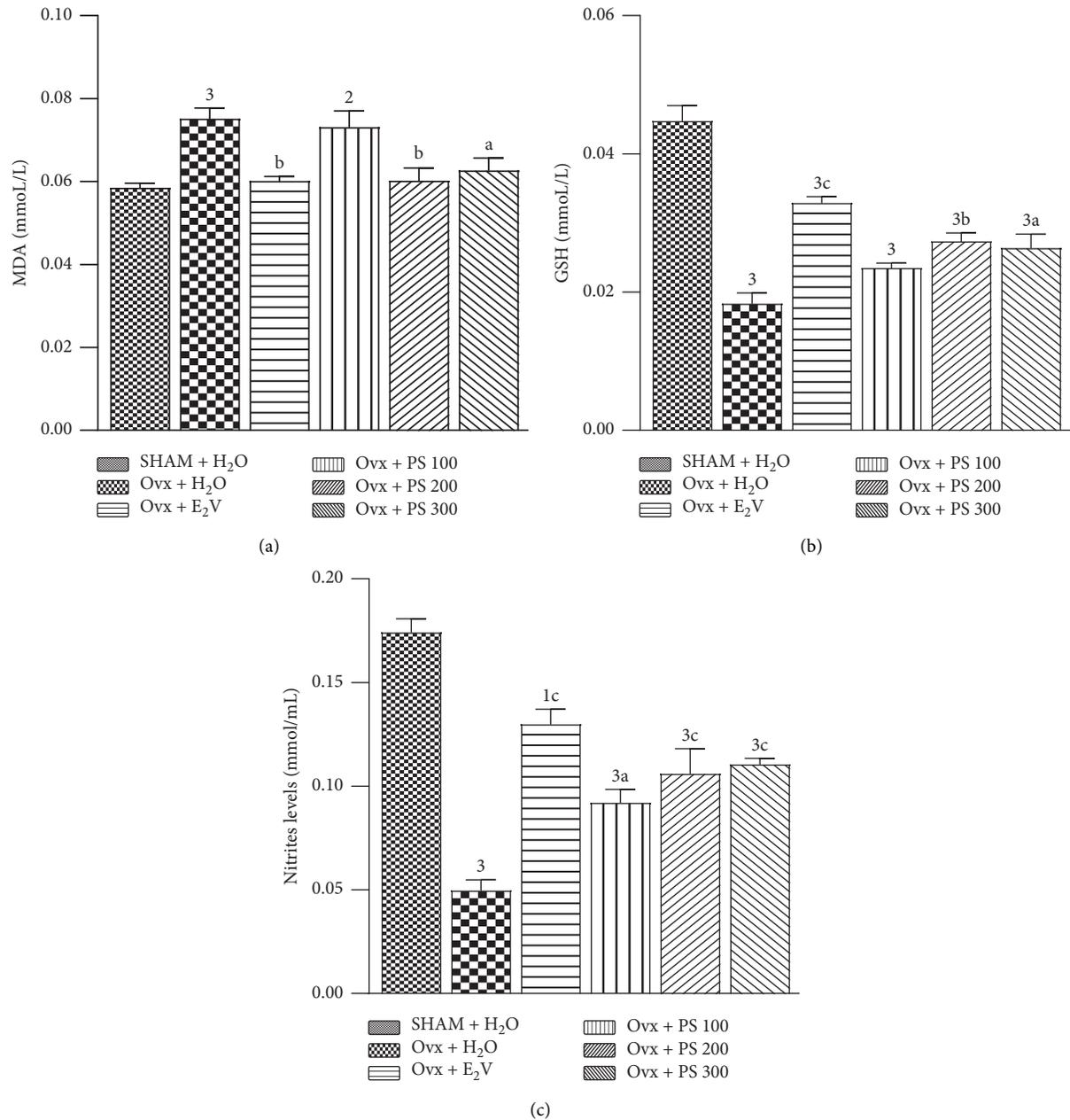


FIGURE 11: Effects of a 28-day treatment with *P. soyauxii* on MDA (a), GSH (b), and nitrites (c) aorta levels. ¹ $p < 0.05$; ² $p < 0.01$; ³ $p < 0.001$, significant difference compared to sham-operated control; ^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.001$, significant difference compared to OvX control; PS = *P. soyauxii*; MDA = Malondialdehyde; GSH = reduced glutathione.

vagina after 28-days treatment could be due to linoleic acid, known as promoting vaginal cornification [44]. This lack of long-term action of the plant extract on mammary gland and uterus could reflect a potential selective effect, useful for preventing estrogen-dependent cancers. In addition, LC-MS analysis revealed the presence in the plant extract of mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) and 3',5'-dimethoxy-4-Stilbenol or pterostilbene which are known as selective estrogen receptor modulators (SERM). This differing agonist or antagonist effects at the estrogen receptor in different tissues of pterostilbene contained in the plant extract can prevent hormone responsive cancers [45, 46].

In addition to genital atrophy, oophorectomy resulted in an increase of relative weight of abdominal fat, weight gain, and insulin resistance correlated with dyslipidaemia and an increased atherogenic index, similar to studies carried by Somayeh et al. [47] and Dzeufiet et al. [11]. Indeed, estrogen deficiency increases lipoprotein lipase activity, leading to blood fatty acids accumulation, and thus dyslipidaemia [48]. According to Wade [49], estrogen negatively regulates food intake and weight gain. Thereby, increased body weight and abdominal fat in ovariectomized rats in this study could be due to high food intake and fat accumulation in adipose tissue [50]. It has also been established that free radical

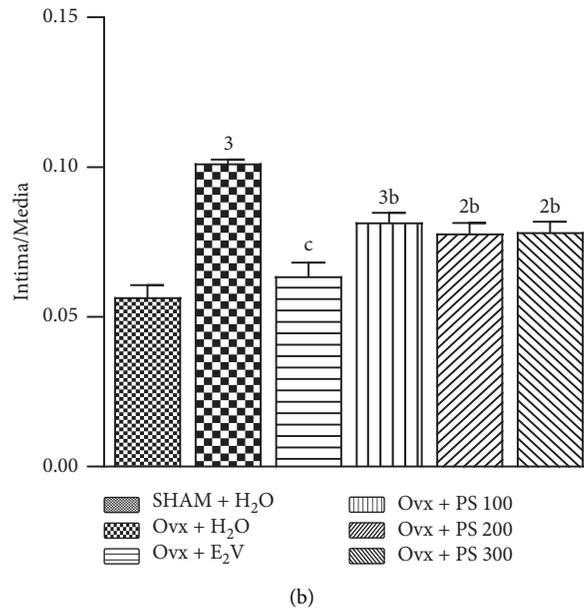
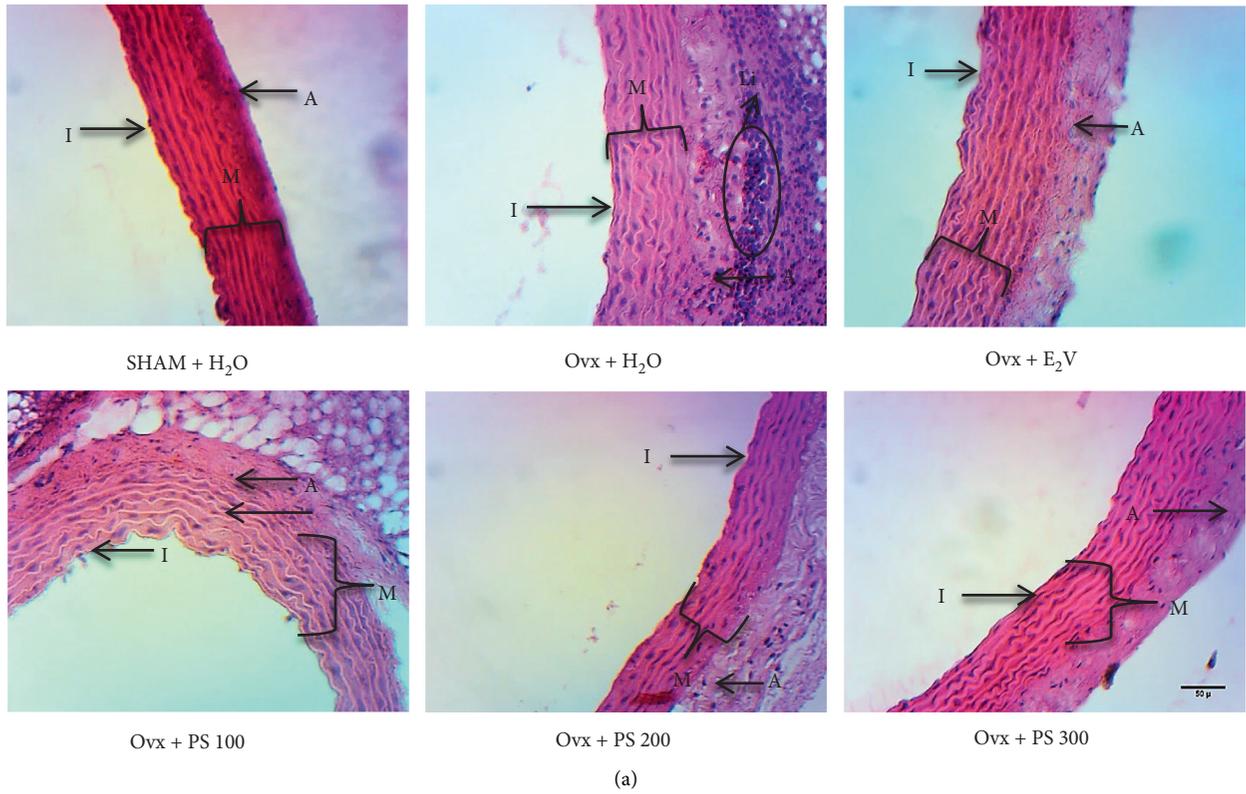


FIGURE 12: Effects of *P. soyauxii* 28-day treatment on aorta (100×, haematoxylin-eosin). PS = *P. soyauxii*; (I) intima; (M): media; (A): adventitia; Li = leukocyte infiltration.

oxidation of LDL cholesterol leads to atherosclerosis [11]. In the present study, the increase of atherogenic index is associated with oxidative stress in ovariectomized rats. Indeed, in addition to an increased LDL cholesterol, ovariectomized rats exhibited a high lipid peroxidation via an increase of MDA level. They showed also a decrease of GSH concentration which characterized an oxidative stress. Compared to Ovx control, *P. soyauxii* extract significantly reduced

abdominal fat weight and body weights, insulin resistance, and dyslipidaemia. These effects could be due to the 3',5'-dimethoxy-4-stilbenol also called pterostilbene which was revealed by LC-MS analysis. Indeed, pterostilbene is known for its antiadipogenic and hypotriglyceridemic properties through inhibition of proliferation and differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes, fatty acids accumulation, and expression of Diacylglycerol O-acyltransferase 1 (DGAT1)

which supply triglycerides synthesis. In addition, pterostilbene is known to reduce expression of Peroxisome Proliferator Activated Receptors γ (PPAR γ) involved in the starting of insulin resistance and dyslipidaemia [51, 52].

Oophorectomy is associated with a high activity of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase, leading to the formation of free radicals in the mitochondria. The high production of free radicals is a major contributor in the pathogenesis of atherosclerosis through LDL cholesterol oxidation [53], starting process of endothelial dysfunction leading to a decreased nitrogen monoxide levels in aorta. This atherogenic process constitutes an inflammatory state materialized in this work by leukocyte infiltration on aortic sections in Ovx control. The treatment with plant extract improved the oxidative status as well as leukocyte infiltration in the aorta at 100, 200, and 300 mg/kg. Indeed, pterostilbene is known to exert antioxidant and anti-inflammatory activities. They decreased expression of NADPH oxidase and inactivation of NF- κ B via a down-regulation of Toll-like 5 receptors [54].

5. Conclusions

Sixteen-week bilateral oophorectomy induced postmenopausal symptoms in rats like vagina atrophy, dyslipidaemia, insulin resistance, weight gain, and oxidative stress. *P. soyauxii* aqueous extract contains mono(2-ethylhexyl) phthalate, cembrene, 3',5'-dimethoxy-4-stilbenol, and linoleic acid. Furthermore, this extract is able to exhibit estrogenic and antioxidant activities which are probably responsible of the prevention of postmenopausal symptoms. There is a need to evaluate different pathways involved by secondary metabolites of this extract on postmenopausal symptoms.

Abbreviation

ABTS:	2,2'-Azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
AI:	Atherogenic index
DAD:	Diode array detector
DGAT1:	Diacylglycerol O-acyltransferase 1
DPPH:	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
E ₂ V:	Estradiol valerate
FRAP:	Ferric-reducing antioxidant power
GSH:	Reduced glutathione
HED:	Human equivalent dose
HDL-C:	High-density lipoprotein cholesterol
HRT:	Hormone replacement therapy
IC50:	Inhibitory concentration 50
ITT:	Insulin tolerance test
LC-MS:	Liquid chromatography-mass spectrometry
LDL-C:	Low-density lipoprotein cholesterol
MDA:	Malondialdehyde
MEHP:	Mono(2-ethylhexyl) phthalate
NF- κ B:	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
Ovx:	Ovariectomized animals
PPAR γ :	Peroxisome proliferator activated receptors γ

PS:	Pterocarpus soyauxii
ROS:	Reactive oxygen species
SERM:	Selective estrogen receptor modulators
TC:	Total cholesterol
TG:	Triglycerides
TPTZ:	2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine
UHPLC-	Ultra-High-Performance Liquid
MS:	Chromatography tandem mass spectrometry
VLDL-C:	Very-low-density lipoprotein cholesterol.

Data Availability

The data are available upon request.

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Authors' Contributions

O. P. Emmanuel, N. M. Chantal, and M. N. Lohik carried out the experiments. M. N. Y. Sandrine, B. A. G. Ronald, and K. T. R. Bernes were involved in histological analysis. N. Michel and N. F. Rodrigue performed biochemical analyses. D. D. P. Désiré, K. Pierre, and B. D. Claude designed the study. All the authors were involved in the draft and review of the manuscript.

Acknowledgments

The authors appreciate the staff of the Laboratory of Animal Physiology, University of Yaoundé 1, for their valuable help. The authors are also grateful for French association PCD (Pathologie Cytologie Développement) for providing histological reagents.

References

- [1] J. P. G. Camporez, F. R. Jornayvaz, H.-Y. Lee et al., "Cellular mechanism by which estradiol protects female ovariectomized mice from high-fat diet-induced hepatic and muscle insulin resistance," *Endocrinology*, vol. 154, no. 3, pp. 1021–1028, 2013.
- [2] V. Bittner, "Menopause, age, and cardiovascular risk," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 54, no. 25, pp. 2374–2375, 2009.
- [3] D. J. Betteridge, "What is oxidative stress?" *Metabolism*, vol. 49, no. 2-1, pp. 3–8, 2000.
- [4] F. Giacco, M. Brownlee, and A. M. Schmidt, "Oxidative stress and diabetic complications," *Circulation Research*, vol. 107, no. 9, pp. 1058–1070, 2010.
- [5] J. S. Bhatti, S. Kumar, M. Vijayan, G. K. Bhatti, and P. H. Reddy, "Therapeutic strategies for mitochondrial dysfunction and oxidative stress in age-related metabolic disorders," *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, vol. 146, pp. 13–46, 2017.
- [6] C. M. Sena, A. M. Pereira, and R. Seiça, "Endothelial dysfunction- a major mediator of diabetic vascular disease," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1832, no. 12, pp. 2216–2231, 2013.

- [7] M. Rodriguez-Porcel, A. R. Chade, and J. D. Miller, "Studies on atherosclerosis. Oxidative stress in applied basic research and clinical practice," 2017.
- [8] British Menopause Society, "HRT: Benefits and risks Women's health concern fact sheet. Information for women," 2020.
- [9] N. R. Cook, C. M. Albert, J. M. Gaziano et al., "A randomized factorial trial of vitamins C and E and beta carotene in the secondary prevention of cardiovascular events in women," *Archives of Internal Medicine*, vol. 167, no. 15, pp. 1610–1618, 2007.
- [10] S. Mitra, A. Deshmukh, R. Sachdeva, J. Lu, and J. L. Mehta, "Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis implications in antioxidant therapy," *The American Journal of the Medical Sciences*, vol. 342, no. 2, pp. 135–142, 2011.
- [11] D. P. D. Dzeufiet, N. Y. S. Mengue, D. C. Bilanda et al., "In vivo estrogenic-like activities of *Gouania Longipetala* Hemsl. (*Rhamnaceae*) bark extracts in a post-menopause-like model of ovariectomized Wistar rats," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 168, pp. 122–128, 2015.
- [12] M. C. Ngoungouré, D. C. Bilanda, D. P. D. Dzeufiet et al., "Oral acute toxicity and estrogenic-like effects of the aqueous extract of *Anthocleista schweinfurthii* Gilg (*Loganiaceae*)," *Pharmacologia*, vol. 8, pp. 9–17, 2017.
- [13] M. Wilson, V. Konda, K. Heidt, T. Rathinasabapathy, A. Desai, and S. Komarnytsky, "Rheum raphonticum root extract improves vasomotor menopausal symptoms and estrogen-regulated targets in ovariectomized rat model," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 3, pp. 1–12, 2021.
- [14] S. Djiogue, M. Halabalaki, X. Alexi et al., "Isoflavonoids from *Erythrina poeppigiana*: evaluation of their binding affinity for the estrogen receptor," *Journal of Natural Products*, vol. 72, no. 9, pp. 1603–1607, 2009.
- [15] C. B. Tempfer, G. Froese, G. Heinze, E.-K. Bentz, L. A. Hefler, and J. C. Huber, "Side effects of phytoestrogens: a meta-analysis of randomized trials," *The American Journal of Medicine*, vol. 122, no. 10, pp. 939–946, 2009.
- [16] I. Brémaud, N. Amusant, K. Minato, J. Gril, and B. Thibaut, "Effect of extractives on vibrational properties of african padouk (*Pterocarpus soyauxii* Taub.)," *Wood Science and Technology*, vol. 45, no. 3, pp. 461–472, 2011.
- [17] J.-B. T. Saha, D. Abia, S. Dumarçay et al., "Antioxidant activities, total phenolic contents and chemical compositions of extracts from four Cameroonian woods: padouk (*Pterocarpus soyauxii* Taub), tali (*Erythrophleum suaveolens*), moabi (*Baillonella toxisperma*), and movingui (*Distemonanthus benthamianus*)," *Industrial Crops and Products*, vol. 41, no. 1, pp. 71–77, 2013.
- [18] R. T. O. Kala, "Tollefsbol, A novel combinatorial epigenetic therapy using resveratrol and pterostilbene for restoring estrogen receptor- α (ER α) expression in ER α -negative breast cancer cells," *PLoS One*, vol. 11, no. 5, pp. 1–17, 2016.
- [19] A. Nair and S. Jacob, "A simple practice guide for dose conversion between animals and human," *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, vol. 7, no. 2, pp. 27–31, 2016.
- [20] R. B. Broadhurst and W. T. Jones, "Analysis of condensed tannins using acidified vanillin," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 29, no. 9, pp. 788–794, 1978.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] L. L. Mensor, F. S. Menezes, G. G. Leitão et al., "Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method," *Phytotherapy Research*, vol. 15, no. 2, pp. 127–130, 2001.
- [24] I. F. F. Benzie and J. J. Strain, "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay," *Analytical Biochemistry*, vol. 239, no. 1, pp. 70–76, 1996.
- [25] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 26, no. 9–10, pp. 1231–1237, 1999.
- [26] Éditions OCDE. n°440, *Bio-essai utéro-trophique chez les rongeurs: Essai de dépistage à court terme des propriétés oestrogéniques, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques*, Éditions OCDE, Paris, France, 2007.
- [27] W. T. Friedewald, R. I. Levy, and D. S. Fredrickson, "Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge," *Clinical Chemistry*, vol. 18, no. 6, pp. 499–502, 1972.
- [28] N. Akhtar, M. K. Srivastava, and R. B. Raizada, "Assessment of chlorpyrifos toxicity on certain organs in rat *Rattus norvegicus*," *Journal of Environmental Biology*, vol. 30, no. 6, pp. 1047–1053, 2009.
- [29] J. F. Fortier and R. Hould, *Histotechnologie: Théories et procédés*, CCDMD edition, Paris, France, 2003.
- [30] K. M. Wilbur, F. Bernheim, and O. W. Shapiro, "The Thio-barbituric acid reagent as a test for the oxidation of unsaturated fatty acids by various agents," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 24, no. 2, pp. 305–313, 1949.
- [31] G. L. Ellman, "Tissue sulfhydryl groups," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 82, no. 1, pp. 70–77, 1959.
- [32] L. C. Green, D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum, "Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids," *Analytical Biochemistry*, vol. 126, no. 1, pp. 131–138, 1982.
- [33] M. C. Ngoungoure, D. P. D. Dzeufiet DPD, D. C. Bilanda et al., "Neuroprotective effects of the *Anthocleista Schweinfurthii* Gilg. (*Loganiaceae*) stem bark extract in post-menopause-like model of ovariectomized wistar rats," *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, vol. 16, no. 1, pp. 1–7, 2019.
- [34] D. Njamen, N. C. B. Magne, and G. Vollmer, "Effects of the extracts of some tropical medicinal plants on estrogen inducible yeast and Ishikawa screens, and on ovariectomized Wistar rats," *Die Pharmazie*, vol. 63, no. 2, pp. 164–168, 2012.
- [35] S. Zingue, N. C. B. Magne, C. Clyne, and D. Njamen, "Elucidation of underlying mechanisms by which *Milletia macrophylla* Benth induces its estrogenic activity," *International Scholarly Research Notices*, vol. 2014, Article ID 763781, 8 pages, 2014.
- [36] S. Choi, T. Ha, J. Ahn et al., "Estrogenic activities of isoflavones and flavones and their structure-activity relationships," *Planta Medica*, vol. 74, no. 1, pp. 25–32, 2008.
- [37] B. Lalithadevi, N. S. Muthiah, and S. N. Murty, "Antioxidant activity of conjugated linoleic acid," *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, vol. 11, no. 11, pp. 169–173, 2018.

- [38] A. Saffaryazdi, A. Ganjeali, and R. Farhoosh, "Variation in phenolic compounds, α -linolenic acid and linoleic acid contents and antioxidant activity of purslane (*Portulaca oleracea* L.) during phenological growth stages," *Physiology and Molecular Biology of Plants*, vol. 26, pp. 1519–1529, 2020.
- [39] A. Tchernof, M. D. Desmeules, C. Richard et al., "Ovarian hormone status and abdominal visceral adipose tissue metabolism," *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 89, no. 7, pp. 3425–3430, 2004.
- [40] I. Baeza, N. M. De Castro, L. Gimenez-Llort, and M. De la Fuente, "Ovariectomy, a model of menopause in rodents, causes a premature aging of the nervous and immune systems," *Journal of Neuroimmunology*, vol. 219, no. 1-2, pp. 90–99, 2010.
- [41] M. C. Carr, "The emergence of the metabolic syndrome with menopause," *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 88, no. 6, pp. 2404–2411, 2003.
- [42] M.-E. Piche, S. J. Weisnagel, L. Corneau, A. Nadeau, J. Bergeron, and S. Lemieux, "Contribution of Abdominal Visceral Obesity and Insulin Resistance to the Cardiovascular Risk Profile of Postmenopausal Womenfile of postmenopausal women," *Diabetes*, vol. 54, no. 3, pp. 770–777, 2005.
- [43] C. Heinemann and G. Reid, "Vaginal microbial diversity among postmenopausal women with and without hormone replacement therapy," *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 51, no. 9, pp. 777–781, 2005.
- [44] P. Saadat and A. L. Latiffah, "Supplementary health benefits of linoleic acid by improvement of vaginal cornification of ovariectomized rats," *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, vol. 3, no. 1, pp. 31–36, 2013.
- [45] K. Da-Hye, G. P. Chang, H. K. Sang, and J. K. Young, "The effects of mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on human estrogen receptor (her) and androgen receptor (har) by YES/YAS *in vitro* Assay," *Molecules*, vol. 24, no. 8, pp. 1–10, 2019.
- [46] P. Chi, H. Yiwang, L. Jun et al., "Estrogen receptor-a36 is involved in pterostilbene induced apoptosis and anti-proliferation in *in vitro* and *in vivo* breast cancer," *PLoS One*, vol. 9, no. 8, pp. 1–8, 2014.
- [47] K. Somayeh, Z. Samad, and B. Parvin, "Flavonoids fraction of *Mespilus germanica* alleviates insulin resistance in metabolic syndrome model of ovariectomized rats via reduction in tumor necrosis factor- α ," *Journal of Menopausal Medicine*, vol. 24, no. 3, pp. 169–175, 2018.
- [48] M. Tamayo, H. Takuya, O. Masafumi et al., "Effects of estrogen on cardiovascular injury in ovariectomized female DahlS-Z-Lepr^{fa}/Lepr^{fa} Rats as a new animal model of metabolic syndrome," *Hypertension*, vol. 59, no. 3, pp. 552–554, 2012.
- [49] G. N. Wade, *Sex hormones, regulatory behaviors and body weight*, Academic press, New York, NY, USA, 1976.
- [50] E. J. Roy and G. N. Wade, "Role of food intake in estradiol-induced body weight changes in female rats," *Hormones and Behavior*, vol. 8, no. 3, pp. 265–274, 1977.
- [51] Y.-J. Seo, K.-J. Kim, E.-J. Koh, J. Choi, and B.-Y. Lee, "Anti-adipogenesis mechanism of pterostilbene through the activation of heme oxygenase-1 in 3T3-L1 cells," *Phytomedicine*, vol. 33, pp. 7–13, 2017.
- [52] J. R. Barry and M. R. Gerald, "PPAR- γ agonists, insulin resistance and dyslipidemia: not a simple relationship," *Clinical Lipidology*, vol. 5, no. 4, pp. 509–525, 2010.
- [53] M. A. Alyson, R. D. Grant, E. M. Anja, S. W. H. H. Harald, and S. G. Christopher, "Effect of gender on NADPH-oxidase activity, expression, and function in the cerebral circulation role of estrogen," *Stroke*, vol. 38, no. 7, pp. 2142–2149, 2007.
- [54] W.-S. Lin, J. V. Leland, C.-T. Ho, and M.-H. Pan, "Occurrence, bioavailability, anti-inflammatory, and anticancer effects of pterostilbene," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 68, no. 46, pp. 12788–12799, 2020.



***Pterocarpus soyauxii* (Fabaceae) Heartwood Aqueous Extract Exhibits Anti-osteoporotic Activities in a Postmenopausal-like Model**

Owona Pascal Emmanuell^a, Mengue Ngadena Yolande Sandrine^{a,b},
Mbolang Nguegan Lohik^a, Bidingha A. Goufani Ronald^a,
Ngoungoure Madeleine Chantal^a, Kegne Ségolène^a,
Tcheutchoua Yannick Carlos^a, Bilanda Danielle Claude^a,
Kamtchouing Pierre^a and Dzeufiet Djomeni Paul Désiré^{a*}

^a Laboratory of Animal Physiology, Faculty of Science, University of Yaoundé 1, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon.

^b Department of Psychology, Faculty of Arts, Unit of Biology, Letters and Social Sciences, University of Yaoundé 1, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration among all authors. All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

DOI: 10.9734/JOCAMR/2021/v16i430316

Editor(s):

(1) Prof. Arun Singh, Bareilly International University, India.

Reviewers:

(1) Catalin Tiliscan, Carol Davila University of Medicine and Pharmacy, Romania.

(2) Ali B. Roomi, Al-Ayen University, Iraq.

Complete Peer review History, details of the editor(s), Reviewers and additional Reviewers are available here:
<https://www.sdiarticle5.com/review-history/76962>

Original Research Article

Received 02 October 2021
Accepted 06 December 2021
Published 22 December 2021

ABSTRACT

Previous studies showed that *Pterocarpus soyauxii* (*P. soyauxii*) exhibits estrogenic activities ease menopausal disorders. The objective of this study was to evaluate anti-osteoporotic activities of the aqueous extract of *P. soyauxii* heartwood in ovariectomized (Ovx) Wistar rats. To achieve this, an 84-day postmenopausal osteoporosis model was used. Twenty-five female rats were ovariectomized and 5 others were sham-operated (Sham). After 84 days of hypoestrogenism, Ovx animals were divided into 5 groups including a group receiving distilled water at 10 mL/kg, a group receiving estradiol valerate (E₂V) at 1 mg/kg, and three groups receiving *P. soyauxii* extract at 100,

200, and 300 mg/kg; Sham-operated animals received vehicle (10 mL/kg). After 28 days of treatment, animals were sacrificed. Blood was collected in EDTA tubes for blood count and in dry test tubes. Some femoral and seric biochemical analyses were carried out. The relative mass of both tibia and femur, and femoral density were assessed. As result, oophorectomy significantly increased the level of white blood cells (WBC) ($p < 0.01$), MDA ($p < 0.01$), nitrites ($p < 0.001$), and urinary calcium/urinary creatinine ratio ($p < 0.01$). Ovx animals presented a low femoral calcium and phosphorus levels ($p < 0.05$) likewise ALP activity in both serum and femur compared to sham group. Thus, they also presented numerous resorption lacunae in the tibia and femur and a disorganization of tibia trabecular bone. *P. soyauxii* extract at 300 mg/kg significantly decreased WBC ($p < 0.05$), MDA ($p < 0.01$), and nitrites ($p < 0.001$) compared to vehicle. At the dose of 200 mg/kg, *P. soyauxii* extract significantly increased femoral calcium ($p < 0.05$), seric phosphorus ($p < 0.01$), and ALP activity ($p < 0, 05$) in both femur and serum, as well as relative femoral mass ($p < 0.05$) and density ($p < 0.001$). Furthermore, the plant extract at 200 and 300 mg/kg reduced resorptive lacunae and reconstituted trabecular bone in Ovx animals. Overall, aqueous extract of *P. soyauxii* exhibits anti-osteoporotic activities in a postmenopausal-like model in Wistar rats.

Keywords: *P. soyauxii*; anti-osteoporotic; postmenopausal; rat.

1. INTRODUCTION

Osteoporosis is a systemic disorder characterized by a reduction in bone mass and microarchitectural deterioration of bone tissue, resulting in skeletal fragility [1]. Known as a multifactorial disease, its susceptibility is determined by genetic influences, environmental factors, and sex hormone status among others [2]. The ever-increasing aging of the world's population makes osteoporosis a major public health problem [3]. Estrogen deficiency in postmenopausal women, however, is known to be an important factor in the pathogenesis of osteoporosis [4]. Prevention and management of this condition are based primarily on Hormone Replacement Therapy (HRT) [5]. Despite the positive effects associated with HRT for osteoporosis, the Women's Health Initiative (WHI) trial reported a risk of cardiovascular diseases and breast cancer associated with this healing [6]. Around the world and particularly in developing countries, herbs are used as a therapeutic alternative to conventional medicine [7]. Plants commonly used to prevent menopausal disorders have among other estrogenic activities that are linked to their richness in a class of molecules called phytoestrogens. These molecules have been shown to possess anti-osteoporotic effects without the adverse effects associated with estrogens, such as estrogen-dependent cancers, reported in experimental studies [8-9]. Previous studies showed that *P. soyauxii*, the subject of this study exhibits estrogen-like effects in a postmenopausal model [10]. Indeed, this study confirmed the ethnobotanical uses of this plant to manage uro-genital issues in women [11-15].

Actually, the aqueous extract of the plant contains phytoestrogens like pterostilben and linoleic acid, thus it reduced menopausal impairment like vaginal atrophy and metabolic syndrome. Nevertheless, effects on postmenopausal osteoporosis have not yet been evaluated. Thus, this study aimed to evaluate the anti-osteoporotic activities of *P. soyauxii* heartwood aqueous extract in a postmenopausal-like model induced by ovariectomy in rat.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 *P. soyauxii* Extraction

The aqueous extract of *P. soyauxii* was prepared according to the protocol described by Mengue *et al.* [10].

2.2 Animal material

Wistar strain female rats aged 10-12 weeks and weighing between 130-150 g were used. They were housed in plastic cages of 5 animals per cage with free access to tap water and soy-free chow. The animals were ovariectomized using a dorsal approach [9,15].

2.3 Experimental Design

Thirty rats were used. Twenty-five rats were ovariectomized and the others were the sham-operated (Sham). 84 days after oophorectomy, the animals were divided into 6 groups of 5 animals each and were treated daily for 28 days as follows: the sham group received distilled water (10 mL/kg) and an Ovx animals received

respectively distilled water (10 mL/kg), E₂V (1 mg/kg), and *P. soyauxii* at 100, 200 and 300 mg/kg. Before sacrifice, fasted animals were individually housed in a metabolic cage for 24 h. A urine sample was collected and acidified with 2 mL of 1 mol/L HCl. Collected urine samples were used for the determination of creatinine, calcium, inorganic phosphorus, magnesium. Thus, some osteolysis indexes (Urinary-calcium/Urinary-creatinine; Urinary-magnesium/Urinary-creatinine) were calculated. Vaginal smears were also carried out. Arteriovenous blood was collected both in EDTA tubes for blood count and in dry tests tubes for centrifugation (3500rpm for 15 min). Calcium, magnesium, creatinine, inorganic phosphorus (IP) levels, and alkaline phosphatase activity (ALP) were assessed in serum. Femur and Tibia were collected and weighed. 0.2 g of the head of femur was homogenized in 2 mL of phosphate buffered saline. The homogenate obtained was centrifuged (3500 rpm for 30 min) and the supernatant was used to determinate some biochemical bone markers such as calcium, magnesium, inorganic phosphorus, ALP activity as well as femur oxidative status (MDA, GSH, and Nitrites). At last, histopathological analysis of heads of femur and tibia were carried on paraffin-embedded sections stained with hematoxylin-eosin.

2.4 Determination of the Relative Mass and Femoral Density

2.4.1 Determination of the relative mass of the femur and tibia

Femur and tibia relative fresh weight were calculated respectively using the formula bellow according to Akhtar *et al.* [16].

$$\text{Organ weight ratio} = \frac{\text{Femur/Tibia weight (g)}}{\text{Body w}} \times 100$$

2.4.2 Determination of femoral density

Wet femur volume was measured using a plethysmometer and its density was calculated using the formula as described by Lee *et al.* [17]:

$$\text{Femoral density} = [\text{femur wet weight (kg)} \times 1000 (\text{kg/mm}^3) / \text{volume of femur (mm}^3)]$$

2.5 Biochemical Assays

ALP activity like creatinine and IP levels, were assessed using commercial diagnostic kits

LABKIT. Calcium and magnesium levels were assessed using commercial diagnostic kits Biolabo and Randox respectively.

2.6 Oxidative Stress Parameters Assays

Malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) in femur homogenate were determined using methods described by Wilbur *et al.* [18] and Ellman [19] respectively while the nitrites content was determined using the method described by Green *et al.* [20].

2.7 Vaginal Smears and Cell Differentiation

Using a micropipette, 10 μ L of a 0.9% NaCl solution was introduced into the vagina of each rat and then aspirated with a bulb. The collected sample was placed on a slide and fixed in increasing baths of 50%, 70% and 80% alcohol. The slides were stained according to the method described by Papanicolaou [21].

2.8 Histopathological Analysis

After fixation of the femur and tibia in 10% buffered formalin, the organs were streamed in 3 xylene baths (10 min per bath) and then dehydrated in alcohol of croissant gradient (70%, 95%, and 100% (3 baths)). Tissues were then clarified in two xylene baths and embedded in liquid paraffin at 60°C for 4 hours. A 5 μ m section of each organ was cut with a microtome, deparaffinized, and stained with hematoxylin-eosin. The microphotographies were obtained using a light microscope (Leitz wetzlar Germany 513) connected with a celestron 44421 camera linked to a computer.

2.9 Statistical Analysis

Data were stated as mean \pm standard error on mean. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey post hoc test using GraphPad Prism 8.0.1. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. RESULTS

3.1 Effects of *P. soyauxii* on Relative Mass of Femur and Tibia and on Total Femoral Protein Level

As shown by Fig. 1, ovariectomy resulted in a significant decrease in relative femur mass ($p < 0.01$) as well as femoral protein level ($p < 0.001$)

compared to Sham control. Administration of the *P. soyauxii* extract at 200 and 300 mg/kg significantly ($p < 0.05$) increased relative femur mass compared to Ovx animals. Moreover, treatment with 200 and 300 mg/kg significantly increased femoral protein levels by $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively, compared to Ovx animals. Besides, ovariectomy and plant extract have no effects on tibia weight.

3.2 Effects of *P. soyauxii* on Femur Density

The 84-day after Ovariectomy resulted in a significant decrease in femoral density ($p < 0.001$) compared to Sham control (Fig. 2). Administration of *P. soyauxii* significantly increased femoral density at 200 ($p < 0.001$) and 300 ($p < 0.01$) mg/kg compared to Ovx animals.

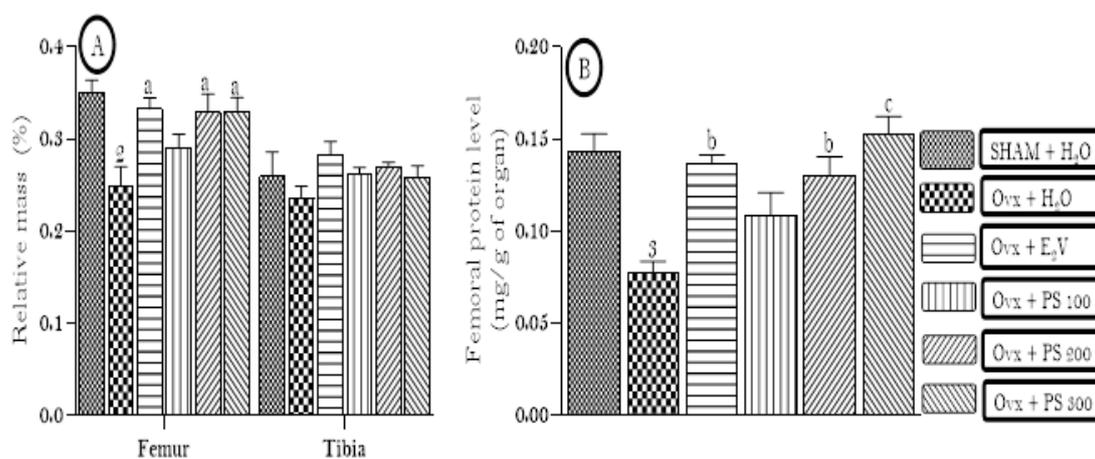


Fig. 1. Effects of *Pterocarpus soyauxii* on femur and tibia relative weight (A) and femoral protein level (B)

¹ $p < 0.05$; ² $p < 0.01$; ³ $p < 0.001$, significant difference compared to Sham control; ^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.001$, significant difference compared to Ovx control; PS = *P. soyauxii*.

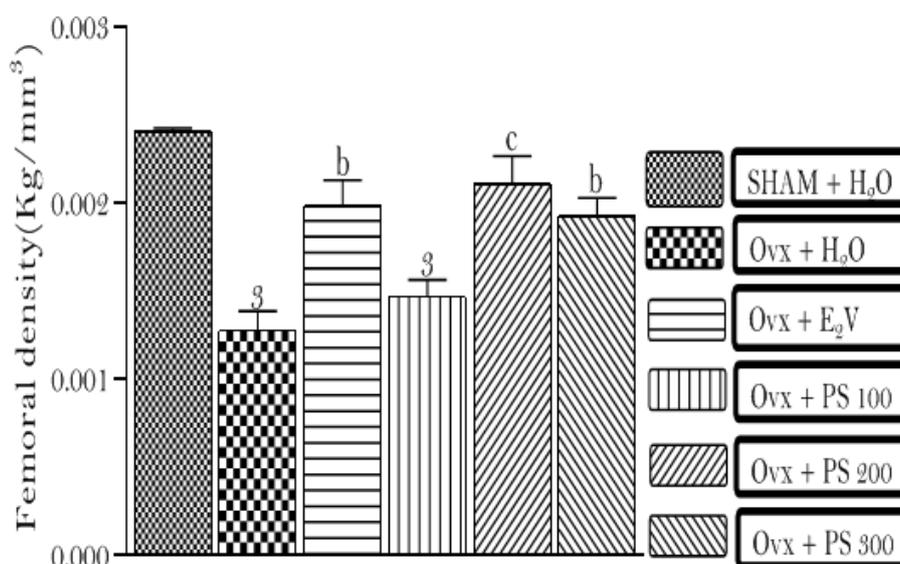


Fig. 2. Effects of *P. soyauxii* on femur density

¹ $p < 0.05$; ² $p < 0.01$; ³ $p < 0.001$, significant difference compared to Sham control; ^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.001$, significant difference compared to Ovx control; PS = *P. soyauxii*.

3.3 Effects of *P. soyauxii* Heartwood on Some Blood Elements

The effects of *P. soyauxii* aqueous extract on some blood components are shown in Table 1. It shows that ovariectomy resulted in a significant ($p < 0.01$) increase in white blood cell (WBC) and a non-significant increase in monocytes and lymphocytes compared to Sham control. The administration *P. soyauxii* extract at 200 mg/kg reduced WBC by 86.29 % compared to Ovx control.

3.4 Effects *P. soyauxii* on Seric, Urinary, and Femoral Levels of Calcium, Phosphorus, and Magnesium

Table 2 shows that a 112-day of ovariectomy induced a decrease of calcium levels in both seric and femoral homogenate ($p < 0.001$) in one hand and a significant increase ($p < 0.001$) in calcium urinary levels in other hand compared to sham control. While the administration of *P. soyauxii* extract at 100 mg/kg increased significantly ($p < 0.05$) femoral calcium level and decreased likewise the urinary one. The treatment of ovariectomized rats with the aqueous extract of *P. soyauxii* at 200 mg/kg and 300 mg/kg compared to Ovx control, increased significantly ($p < 0.05$) seric IP, levels while only the extract at 300 mg/kg increased phosphorus levels in the femur.

3.5 Effects of *P. soyauxii* on ALP Activity, Creatinine Levels and Some Osteolysis Indices

The Table 3 shows the effects of treatment of Ovx rats with aqueous extract of *P. soyauxii* heartwood on femoral and seric ALP activity, seric and urinary creatinine levels and some osteolysis indices. Ovariectomy resulted in a significant ($p < 0.001$) decrease in femoral ALP activity and increase seric ALP activity compared with Sham-operated rats. There was also a significant ($p < 0.01$) increase in the urinary calcium to urinary creatinine ratio in Ovx after 112 days. The administration of *P. soyauxii* at 200 mg/kg significantly reduced seric ALP activity ($p < 0.05$) although it increased significantly ($p < 0.01$) this parameter in femur compared to Ovx control.

3.6 Effects of *P. soyauxii* on Femoral Oxidative Stress Status

Ovariectomy resulted in a significant decrease in GSH levels ($p < 0.01$) and a significant increase in

MDA ($p < 0.01$) and nitrite ($p < 0.001$) levels in the femur. *P. soyauxii* extract at 200 and 300 mg/kg doses compared to Ovx animals significantly increased GSH levels by ($p < 0.05$) and ($p < 0.01$) respectively. At all extract doses, there was a significant ($p < 0.001$) decrease in femur nitrite level compared to Ovx animals. MDA level was significantly ($p < 0.01$) decreased following treatment with *P. soyauxii* extract at the dose of 300 mg/kg compared to Ovx female rats (Fig. 3).

3.7 Effects on the Microarchitecture of the Femur and Tibia

Fig. 4 shows the effects of *P. soyauxii* extract on the microarchitecture of the femur and tibia in ovariectomized animals. Ovariectomy increased the number of resorption lacunae in the tibia and femur. Besides, it also induced tibia trabecular disorder. The oral extract corrected these alterations compared to Ovx animals at 200 and 300 mg/kg.

4. DISCUSSION

The potential anti-osteoporotic effects of *P. soyauxii* were evaluated in a model of postmenopausal osteoporosis induced by ovariectomy in Wistar rats. Results revealed that ovariectomy decreased significantly femur relative mass and density compared to Sham-operated animals. Indeed, estrogen is known to induce osteoclast apoptosis and osteoblast proliferation. These actions increase bone matrix synthesis, mass, and density [22-24]. In addition, Braun *et al.* [25] mentioned that high oxidative stress in hypoestrogenism was linked to osteoblast death. Furthermore, Reactive oxygen species (ROS) stimulate osteoclastogenesis [26], thus they promote bone loss. Signaling pathways are consistent in the present work with the increase of ROS like malondialdehyde (MDA) in the femur. This significant increase in MDA level could be considered as an indication of oxidative stress and cell death. Indeed, the increase in MDA level is an indicator of lipid peroxidation and thus of cell death. Some studies had the same results and showed that estrogen deficiency in ovariectomized female rats resulted in decreased relative mass and density of the femur [9,27]. In the present study, aqueous extract of *P. soyauxii* increased femur density and relative mass in Ovx rats. This result reflects an antiresorptive activity of the plant. Qualitative and quantitative phytochemical analysis revealed flavonoids (formononetin and naringenin) in the extract of the heartwood of *P. soyauxii* [15, 28]. Naringenin

Table 1. Effects of *P. soyauxii* on some blood constituents

Parameters Groups	WBC (10 ⁹ /L)	RBC (10 ¹² /L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	LYM (10 ⁹ /L)	MO (10 ⁹ /L)
SHAM + H ₂ O	6.43 ± 0.73	8.26 ± 0.22	13.95 ± 0.26	45.00 ± 0.77	6.79 ± 1.28	0.18 ± 0.01
Ovx + H ₂ O	10.14 ± 0.71 ²	8.21 ± 0.22	13.57 ± 0.35	43.62 ± 0.88	8.30 ± 0.76	0.24 ± 0.01
Ovx + E ₂ V	6.73 ± 0.60 ^a	8.73 ± 0.06	14.12 ± 0.17	46.47 ± 0.33	7.36 ± 1.36	0.18 ± 0.02
Ovx + PS 100	8.05 ± 0.70	8.81 ± 0.35	14.07 ± 0.48	47.27 ± 1.73	7.13 ± 0.21	0.20 ± 0.02
Ovx + PS 200	8.75 ± 0.40	8.83 ± 0.08	14.65 ± 0.16	48.05 ± 0.45	7.91 ± 0.28	0.17 ± 0.02
Ovx + PS 300	9.45 ± 0.79 ¹	8.77 ± 0.17	14.52 ± 0.33	47.67 ± 1.35	7.60 ± 0.63	0.17 ± 0.02

Values represents mean ± SEM (n = 5); ¹p < 0.05; ²p < 0.01, significant difference compared to Sham-operated control; ^ap < 0.05, significant difference compared to Ovx control; PS = *P. soyauxii*, WBC = White blood cells; LYM = Lymphocytes; RBC = Red blood cells; HGB = Hemoglobin; HCT = Hematocrit; MO = Monocytes

Table 2. Effects of aqueous extract of *P. soyauxii* heartwood on serum, urine and bone levels of calcium, phosphorus and magnesium

Parameters Groups	Calcium (Mmol/L)			Phosphorus (Mmol/L)		Magnesium (Mmol/L)		
	Serum	Femur	Urine	Serum	Femur	Serum	Femur	Urine
SHAM + H ₂ O	2.23 ± 0.05	3.18 ± 0.33	7.72 ± 0.34	2.73 ± 0.02	10.74 ± 0.25	0.45 ± 0.01	0.32 ± 0.05	2.32 ± 0.10
Ovx + H ₂ O	1.82 ± 0.04 ³	1.88 ± 0.23 ¹	11.07 ± 0.13 ³	2.44 ± 0.05 ²	8.89 ± 0.57 ¹	0.44 ± 0.00	0.20 ± 0.01	2.68 ± 0.23
Ovx + E ₂ V	2.13 ± 0.04 ^a	2.61 ± 0.27	8.33 ± 0.28 ^b	2.69 ± 0.07 ^b	10.54 ± 0.20 ^a	0.45 ± 0.01	0.32 ± 0.05	2.14 ± 0.10
Ovx + PS 100	1.96 ± 0.06 ¹	3.09 ± 0.22 ^a	9.17 ± 0.78 ^a	2.63 ± 0.02	9.73 ± 0.27	0.47 ± 0.00	0.34 ± 0.04	2.25 ± 0.10
Ovx + PS 200	2.09 ± 0.01 ^a	2.94 ± 0.24	8.71 ± 0.23 ^b	2.73 ± 0.01 ^b	10.40 ± 0.49	0.50 ± 0.02	0.25 ± 0.04	2.47 ± 0.17
Ovx + PS 300	1.93 ± 0.04 ¹	2.33 ± 0.24	8.94 ± 0.48 ^a	2.69 ± 0.03 ^b	10.62 ± 0.13 ^a	0.45 ± 0.03	0.26 ± 0.04	2.51 ± 0.49

Values represents mean ± SEM (n = 5); ¹p < 0.05; ²p < 0.01; ³p < 0.001, significant difference compared to Sham-operated control; ^ap < 0.05; ^bp < 0.01; ^cp < 0.001, significant difference compared to Ovx control; PS = *P. soyauxii*.

Table 3. Effects of *P. soyauxii* on serum and bone PAL activity, urinary creatinine and some osteolysis indices

Parameters Groups	Creatinine (mg/dL)		ALP activity (IU/L)		Uri-Ca ²⁺ /Uri-Crea	Uri-Mg ²⁺ /Uri-Crea
	Serum	Urine	Femur	Serum		
SHAM + H ₂ O	1.02 ± 0.03	15.19 ± 0.19	545.66 ± 8.41	232.05 ± 6.56	0.50 ± 0.02	0.15 ± 0.01
Ovx + H ₂ O	0.99 ± 0.02	16.10 ± 0.54	397.24 ± 15.59 ³	185.15 ± 4.46 ³	0.69 ± 0.02 ²	0.16 ± 0.01
Ovx + E ₂ V	0.99 ± 0.02	15.40 ± 0.24	549.20 ± 16.09 ^{3c}	197.45 ± 2.65 ^c	0.54 ± 0.01 ^a	0.13 ± 0.01
Ovx + PS 100	0.98 ± 0.02	14.83 ± 0.55	398.39 ± 15.73 ³	215.12 ± 4.61 ²	0.62 ± 0.05	0.15 ± 0.03
Ovx + PS 200	0.96 ± 0.01	15.28 ± 0.10	474.71 ± 7.27 ^{1a}	206.55 ± 3.62 ^{1b}	0.57 ± 0.01	0.16 ± 0.01
Ovx + PS 300	0.95 ± 0.01	15.56 ± 0.34	454.33 ± 11.01 ²	211.32 ± 5.06 ^{2a}	0.57 ± 0.02	0.16 ± 0.03

Values represents means ± SEM (n = 5); ¹p < 0.05; ²p < 0.01; ³p < 0.001, significant difference compared to Sham-operated control; ^ap < 0.05; ^bp < 0.01; ^cp < 0.001, significant difference compared to Ovx control; PS = *P. soyauxii*, ALP = Alkaline phosphatase, Uri-Crea = Urinary creatinine, Uri-Ca²⁺ = Urinary calcium, Uri-Mg²⁺ = Urinary Magnesium.

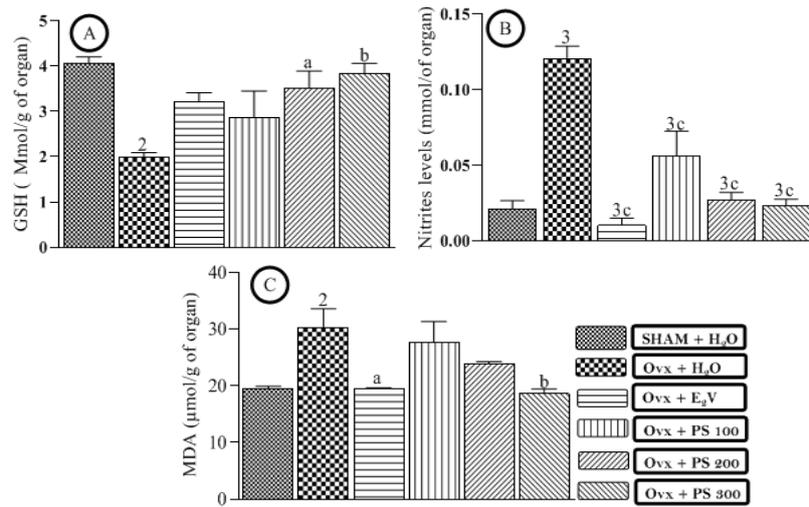


Fig. 3. Effects of a 28-day treatment with *P. soyauxii* on GSH (A), nitrites (B) and MDA (C) femur levels

¹*p* < 0.05; ²*p* < 0.01; ³*p* < 0.001, significant difference compared to Sham-operated control; ^a*p* < 0.05; ^b*p* < 0.01; ^c*p* < 0.001, significant difference compared to Ovx control; PS = *P. soyauxii*; MDA = Malondialdehyde; GSH = Reduced glutathione.

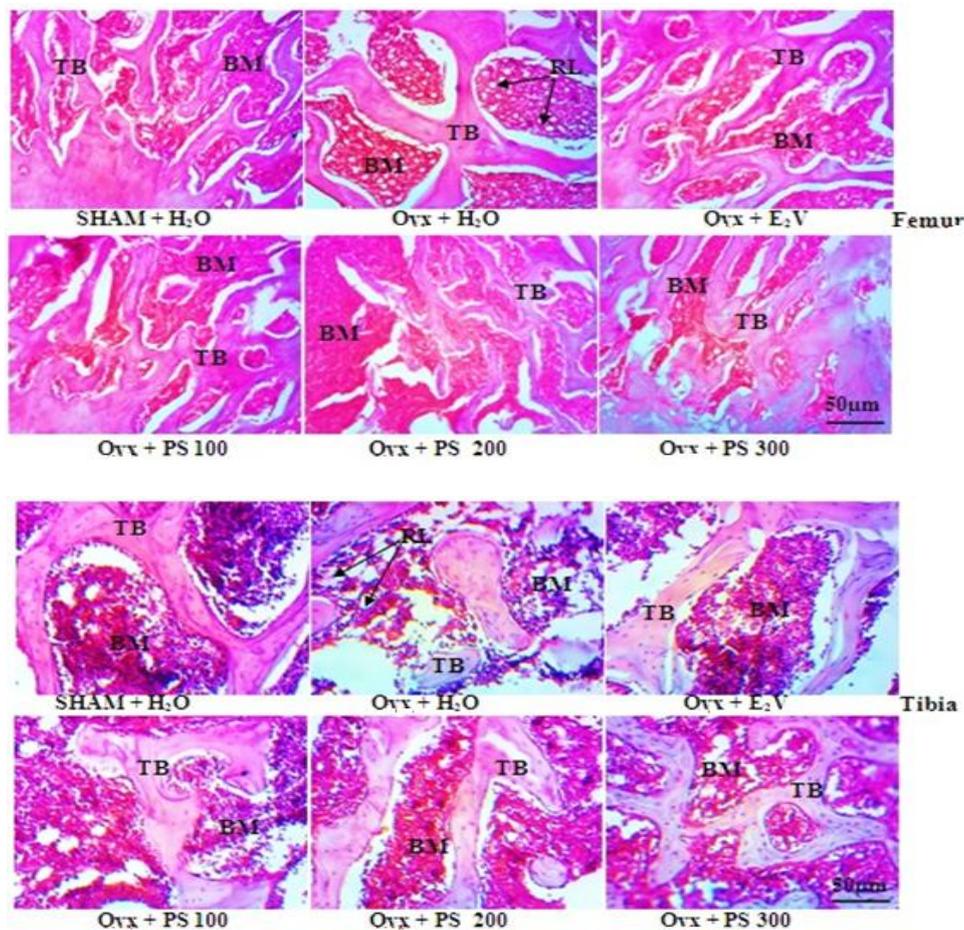


Fig. 4. Microphotographs of the femur (100x, H-E) and tibia (200x, HE)
 PS = *P. soyauxii*, RL = Resorption Lacunae, BM = Bone marrow, TB = Trabecular bone.

is reported to possess anti-osteoporotic activity in ovariectomized rats by stimulating osteoclast apoptosis and osteoblastic proliferation [29]. Besides, formononetin preserves femoral mass and density through its ability to bind to estrogen receptors located on the bone and exert antioxidant activity to increase bone mineral density [30-32]. In addition, LCMS analysis revealed that *P. soyauxii* aqueous extract possesses linoleic acid [10]; a molecule capable of preventing bone loss by stimulating osteoprogenin (OGP) expression and inhibiting RANKL expression in ovariectomized animals according to Rahman *et al.* [8].

Measurement of bone metabolism markers plays an important role in the diagnosis and treatment of osteoporosis [33]. Bone loss in many studies is evidenced by increased calcium, phosphorus, alkaline phosphatase (ALP) activity in blood and urine, and urinary calcium/creatinine ratio [34]. Other work also explains the development of osteoporosis by a decrease in bone concentrations of calcium, phosphorus, and ALP activity [9,35]. Ovariectomy in the same sense varied seric, femoral and urinary biochemical markers of bone metabolism evaluated in the present work. Indeed, a study reported that ovariectomy modified biochemical markers of bone metabolism [9], by the way, Hewitt *et al.* [36] show that ALP modulates osteoblastic activity and is associated with bone mineralization. Furthermore, hypoestrogenism is related to bone demineralization by Braun *et al.* [25] and the results of the present study corroborate this point. Indeed, 112-day Ovx animals presented a high osteolysis index (urinary calcium/ urinary creatinine). *P. soyauxii* extract, as well as estradiol valerate, reestablished normal values of biochemical markers of bone metabolism compared to Ovx rats. Phytoestrogens are known to possess positive action on bone mineralization and osteoblastic differentiation as well as inhibition of osteoclastic activity [37-38]. Linoleic acid, a phytoestrogen identified in the heartwood aqueous extract [10] is probably responsible for osteoprotective activity by decreasing the concentration of serum biochemical markers of bone resorption in ovariectomized animals [9].

Inflammation may contribute to osteoporosis [39]. The results of the present study show in Ovx animals a significant elevation of bone nitrite; a surrogate for nitrite oxide (NO) in ovariectomized animal. Analysis of hematological parameters

also revealed an increase in white blood cells count, in Ovx rats compared to sham-operated rats. Cuzzocrea [40] reported the same results and suggested that the nitrites produced following oophorectomy would come from a macrophagic activity and are a sign of bone inflammation. NO appears to exert biphasic effects by affecting the bone formation and resorption processes in osteoblasts and osteoclasts. Bone formation increased while bone resorption is suppressed at low NO concentration [41]. *P. soyauxii* extract at all doses decreased femoral nitrite level and non-significantly decreased the white blood cell level. Indeed, the work of Saliu *et al.* [42] highlighted the richness of *P. soyauxii* in kaempferol and quercetin. Kaempferol and quercetin potentially protect bone through their anti-inflammatory properties on osteoblastic cells by inhibiting nuclear translocation and NF- κ B activation [43-44]. Linoleic acid a molecule reported in *P. soyauxii* extract [10] is known to inhibit the production of inflammatory cytokines that are messengers for osteoclast recruitment and differentiation [45]; thus, explaining the anti-osteoporotic activity of *P. soyauxii* through the anti-inflammatory pathway.

In addition to inflammatory processes, oxidative stress is an important factor in the pathogenesis of osteoporosis, which is manifested in many studies by microarchitectural alterations of the femur and tibia. In the present work, analysis of oxidative status markers revealed the increase in MDA level and the decrease in GSH level in the femur of Ovx animals compared to sham-operated control; reflecting femoral oxidative stress in Ovx rats. This oxidative stress was correlated with numerous resorption lacunae on histological sections of femur and tibia. This oxidative stress in bones is thought to be related to post-ovariectomy estrogen deficiency. Many studies reported that ovariectomy caused oxidative bone stress in rats marked by an increase in MDA levels and a decrease in GSH levels but also the appearance of resorption lacunae on histological sections of the femur [9]. Indeed, ROS formed under hypo-estrogenic conditions stimulate osteoclast formation and activity, thus they decreased osteoblastic function and osteoblast recruitment, and collagen synthesis [46-47]. The administration of *P. soyauxii* extract reestablished the homeostasis of oxidative parameters in femur and prevented microarchitectural alterations in femur and tibia. Pterostilbenes contain in *P. soyauxii* extract reported to possess antioxidant activity by

reducing the expression of NADPH oxidase [10,48]. This activity would explain the antioxidant effects of *P. soyauxii* on bone.

5. CONCLUSION

Hypoestrogenism induced by ovariectomy resulted in disorders of bone metabolism and microarchitecture. *P. soyauxii* extract fixed these alterations. The osteoprotective effects of *P. soyauxii* would be related to its antioxidant, estrogenic and probably anti-inflammatory activities. It would be necessary to evaluate *in vitro*, the osteoprotective signaling pathways of *P. soyauxii*.

CONSENT

It is not applicable.

ETHICAL APPROVAL

All experiments were conducted following the principles and procedures of the European Union on Animal Care (CEE Council 86/609) guidelines adopted by the Cameroon Institutional National Ethics Committee, Ministry of Scientific Research and Technology Innovation (Reg. number FWA-IRD 0001954).

ACKNOWLEDGEMENTS

The Authors are grateful to the staff of the Laboratory of Animal Physiology, University of Yaoundé 1 for their valuable help. We are also grateful to French association PCD (Pathologie Cytologie Développement) for providing histological reagents. They also thank the Laboratory of Animal Physiology (LAP) of UY1.

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

- Choi MH, Yang JH, Seo JS, Kim YJ, Kang SW. Prevalence and diagnosis experience of osteoporosis in postmenopausal women over 50: Focusing on socioeconomic factors. PLoS ONE. 2021;16(3):e0248020.
- Graham LS, Parahami F, Tintut Y, Kitchen CM, Demer LL, Effors RB. Oxidized lipids enhance RANKL production by T lymphocytes: Implications for lipid-induced bone loss. Clin Immunol. 2009;133(2):265-275.
- Jakob F, Seefried L, Ebert R. Pathophysiology of bone metabolism. Internist. 2008;49:1159-1169.
- Michael A, Clynes, Nicholas C, Harvey, Elizabeth M, Curtis, Nicholas R. Fuggle, Elaine M. Dennison, and Cyrus Cooper. The epidemiology of osteoporosis. Br. Med. Bull. 2020;133:105-117.
- Kapur P, Harry H, Wuttke W, Pereira BMJ, Seidlova-Wuttke D. Evaluation of the antiosteoporotic potential of *Tinospora Cordifolia* in female rats. Maturitas. 2008;20:59(4):329-38.
- WHO. Traditional medicine: growing needs and potential. WHO policy perspectives on medicines, World Health Organization Geneva 2. 2002;1-6.
- Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women principal results from the women's health initiative randomized controlled trial. JAMA. 2002;288:321-333.
- Rahman M, Fernandes G, Williams P. Conjugated linoleic acid prevents ovariectomy-induced bone loss in mice by modulating both osteoclastogenesis and osteoblastogenesis. Lipids. 2014; 49(3):211-224.
- Oumarou M, Zingue S, Bakam B, Ateba S, Harquin Foyet S, Fritz T, Tchaptchet M, Njamen D. *Lannea acida* A. Rich. (Anacardiaceae) ethanol extract exhibits estrogenic effects and prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. eCAM. 2017; Article ID 7829059, 16 pages.
- Mengue NYS, Owona PE, Noubom M, Mbock MA, Mbolang NL, Ngoungouré MC, Ngapout FR, Bidingha GR, Kahou T RB, Bilanda DC, Kamtchouing P, Dzeufiet DPD. Estrogenic and antioxidant activities of *Pterocarpus soyauxii* heartwood aqueous extract in bilateral oophorectomized *Wistar* rat. eCAM. 2021; Article ID 6759000:18 pages.
- Betti J, Lejoly J. Contribution to the knowledge of medicinal plants of the Dja Biosphere Reserve, Cameroon: Plants used for treating jaundice. J. Med. Plant Res. 2009;3:1056-1065.
- Betti J. An ethnobotanical study of medicinal plants among the Baka pygmies in the Dja biosphere reserve, Cameroon. Afr. Study Monogr. 2004;25:1-27.

13. Moronkola D, Oladapo T, Adegbenro F, Ogunbanjo D, Olayinka K. Chemical constituents in essential oils of *Pterocarpus soyauxii* leaf, leaf stalk and stem bark. *Drug Discov Ther.* 2019;9: 206-211.
14. Mpondo C, Ngene J, Mpounze S, Etame L, Boumsong P, Yinyang J, Dibong S. Connaissances et usages traditionnels des plantes médicinales du département du haut Nyong. *J. Appl. Biosci.* 2017;113: 11229-11245.
15. Saslis-Lagoudakis H, Klitgaard B, Forest F, Francis L, Savolainen V, Elizabeth M, Hawkins J. the use of phylogeny to interpret cross-cultural patterns in plant use and guide medicinal plant discovery: An Example from *Pterocarpus* (Leguminosae), *PLoS ONE.* 2011;6: 7e22275.
16. Akhtar NMK, Srivastava, Raizada RB. Assessment of chlorpyrifos toxicity on certain organs in rat, *Rattus norvegicus.* *J. Environ. Biol.* 2009;30(6):1047-1053, 2009.
17. Lee YB, Lee HJ, Kim KS. Evaluation of the preventive effect of isoflavone extract on bone loss in ovariectomized rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2004;68(5):1040–1045.
18. Wilbur KM, Bernheim F, Shapiro OW. The Thiobarbituric acid reagent as a test for the oxidation of unsaturated fatty acids by various agents. *Arch. Biochem. Biophys.* 1949;24(2):305-313.
19. Ellman GL. Tissue sulfhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959;82(1):70-77.
20. Green LC, Wagner DA, Godowsky J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 1982;126(1):131-138.
21. Fortier JF, Hould R. *Histotechnologie : Théories et procédés*, CCDMD edition edition, 2003.
22. Turner RT. Mice, estrogen, and postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 1999;14(2): 187-191.
23. Turner RT, Glenn KW, Kathleen SH. Differential effects of androgens on cortical bone histomorphometry in gonadectomized male and female rats. *J Orthop Res.* 1990;8(4):612-617.
24. Kameda T, Mano H, Yuasa T, Mori Y, Miyazawa K, Shiokawa M, Nakamaru Y, Hiroi E, Hiura K, Kameda A, Yang NN, Hakeda Y, Kumegawa M. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. *J Exp Med.* 1997;186(4):489-495.
25. Braun KF, Ehnert S, Freude T, Egaña JT, Schenck TL, Buchholz A, Schmitt A, Siebenlist S, Schyschka L, Neumaier M, Stöckle U, Nussler AK. Quercetin protects primary human osteoblasts exposed to cigarette smoke through activation of the antioxidative enzymes HO-1 and SOD-1. *Sci. World J.* 2011;11:2348-57.
26. Kim HJ, Chang EJ, Kim HM, Lee SB, Kim HD, Su KG, Kim HH. Antioxidant alpha-lipoic acid inhibits osteoclast differentiation by reducing nuclear factor kappa B DNA binding and prevents in vivo bone resorption induced by receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and tumor necrosis factor alpha. *Free Radic Biol Med.* 2006;1;40(9):1483-93.
27. Patsaki A, Tchoumtchoua J, Passali C, Lelovas P, Kourkoulis S, Papaioannou N, Mbanya JC, Njamen D, Mitakou S, Halabalaki M, Dontas I. The Protective Effect of *Amphimas pterocarpoides* plant extract on bone mineral density and strength in estrogen deficient ovariectomized wistar rats. *Med Aromat Plants.* 2016;5(5):1-7.
28. Barend C, Bezuidenhoudt E, Vincent B, Daneel F. Flavonoid analogues from *Pterocarpus* species. *Phytochemistry.* 1987;26:531- 535.
29. Zhu Z, Wenjing X, Yanyan L, Zaiou Z, Wei Z. Effect of naringin treatment on postmenopausal osteoporosis in ovariectomized rats: A meta-analysis and systematic review. *eCAM.* 2021; Article ID 6016874:8.
30. Kaczmarczyk-Sedlak I, Weronika W, Maria Z, Ewa O, Joanna T, Agata S. Effect of formononetin on mechanical properties and chemical composition of bones in rats with ovariectomy-induced osteoporosis. *eCAM.* 2013;Article ID 457052:10.
31. Ha H, Lee HY, Lee JH. Formononetin prevents ovariectomy-induced bone loss in rats. *Arch. Pharm. Res.* 2010;33(4):625-632.
32. Mu H, Bai YH, Wang ST, Zhu ZM, Zhang YW. Research on antioxidant effects and estrogenic effect of formononetin from *Trifolium pretense* (red clover). *Phytomedicine.* 2009;16(4):314-319.
33. Allende-Vigo MZ. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *P. R. Health Sci. J.* 2007;26(2):91-95.

34. Alavizadeh H, Hosseinzadeh H. Bioactivity assessment and toxicity of crocin: a comprehensive review. *Food Chem. Toxicol.* 2014;64:65-80.
35. Chitme HR, Muchandi IS, Burli SC. Effect of *Asparagus Racemosus* Willd root extract on ovariectomized rats. *Open Nat. Prod. J*; 2009;2:16-23.
36. Hewitt SC, Deroo BJ, Hansen K, Collins J, Grissom S, Afshari CA, Kenneth S. Estrogen receptor dependent genomic responses in the uterus mirror the biphasic physiological response to estrogen. *J. Mol. Endocrinol*, 2003; 17(10):2070-2083.
37. Rassi CM, Lieberherr M, Chaumaz G, Pointillart A, Cournot G. Down-regulation of osteoclast differentiation by daidzein via caspase 3. *J Bone Miner Res.* 2002; 17: 630-638.
38. Vergne S, Bennetau-Pelissero C, Lamothe V, Chantre P, Potier M, Asselineau J, Perez P, Durand M, Moore N, Sauvart P. Higher bioavailability of isoflavones after a single ingestion of a soya-based supplement than a soya-based food in young healthy males. *Br J Nutr.* 2008; 99:333-344.
39. Yun AJ, Lee PY. Maldaptation of the link between inflammation and bone turnover may be a key determinant of osteoporosis. *Med Hypotheses.* 2004;63(3):532-537.
40. Cuzzocrea S, Emanuela M, Laura D, Tiziana G, Rosanna DP, Zaira R, Elisabetta V, Achille PC, Fons AJV, Domenico P, Adriana M. Inducible nitric oxide synthase mediates bone loss in ovariectomized mice. *Endocrinology.* 2003;144(3):1098-1107.
41. Wimalawansa SJ. Nitric oxide and bone. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1192:391-403.
42. Saliu J, Schetinger M, Ganiyu O, Olasunkanmi S, João B, Roberta S, Jessie G, Naiara S, Fabiano C, Vera M, Aline B. Effect of dietary supplementation of Padauk (*Pterocarpus soyauxii*) leaf on high fat diet/streptozotocin induced diabetes in rats brain and platelets. *Biomed. Pharmacother.* 2016;84:1194-1201.
43. Pang J, Dennis AR, Su H, Nigar F, Dhirendra PS, Jose RR, Naibedya C. Differential activity of kaempferol and quercetin in attenuating tumor necrosis factor receptor family signaling in bone cells. *Biochem Pharmacol.* 2006;71:818-826.
44. Zhu J, Tang H, Zhang Z, Yong Z, Chengfeng Q, Ling Z, Ping H, Feng L. Kaempferol slows intervertebral disc degeneration by modifying LPS-induced osteogenesis/adipo-genesis imbalance and inflammation response in BMSCs. *Int Immunopharmacol.* 2017;43:236-242.
45. Barbour KE, Boudreau R, Danielson ME, Youk AO, Wactawski-Wende J, Greep NC, LaCroix AZ, Jackson RD, Wallace RB, Bauer DC, Allison MA, Cauley JA. Inflammatory markers and the risk of hip fracture: The Women's Health Initiative. *J Bone Miner Res.* 2012;27:1167-1176.
46. Aiwo SA, Chaekyun K. Reactive oxygen species in osteoclast differentiation and possible pharmaceutical targets of ROS-mediated osteoclast diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20:1-16.
47. Huan Q, Wenwen Z, Yang J, Haoyi Z, Hao Z, Jingyu J, Qiu L, Xiuping C, Xia G and Yantao H. Aqueous extract of *Salvia miltiorrhiza* bunge-radix puerariae herb pair attenuates osteoporosis in ovariectomized rats through suppressing osteoclast differentiation. *Front. Pharmacol.* 2021; 11: 581049.
48. Zhang Y, Zhang Y. Pterostilbene, a novel natural plant conduct, inhibits high fat induced atherosclerosis inflammation via NF kappa B signaling pathway in Toll like receptor 5 (TLR5) deficient mice. *Biomed. Pharmacother.* 2016;81(1):345-355.

© 2021 Emmanuel et al.; This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peer-review history:

The peer review history for this paper can be accessed here:
<https://www.sdiarticle5.com/review-history/76962>