

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau I: les formes d'intoxication..... | 11 |
| Tableau II : Masse corporelle moyenne en grammes (g) | 27 |
| Tableau III: Masse corporelle moyenne en grammes (g)..... | 28 |
| Tableau IV: Evolution de la masse corporelle moyenne des animaux nourris avec le régime supplémenté avec des graines d'acacia colei en grammes (g) pendant 90 jours | 29 |
| Tableau V: Evolution de la masse corporelle moyenne des animaux nourris avec le régime supplémenté avec des graines d'acacia saligna en grammes (g) pendant 90 jours | 30 |
| Tableau VI: Variation de quelques paramètres biochimiques sériques chez des rats traités avec du régime supplémenté avec des graines d'A.colei pendant 90 jours. | 31 |
| Tableau VII: Variation de quelques paramètres biochimiques sériques chez des rats traités avec du régime supplémenté avec des graines d'A.saligna pendant 90 jours | 32 |
| Tableau VIII: Evaluation des paramètres hématologiques chez les rats traités avec l'aliment complémenté avec des graines d'Acacia colei..... | 35 |
| Tableau IX: Evaluation des paramètres hématologiques chez les rats traités avec de l'aliment complémenté avec des graines d'Acacia saligna | 36 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1: Dose létale 50 ; Source : Internet (Google image) | 12 |
| Figure 2: Rats albinos de souche Wister ; source : photo personnelle..... | 16 |
| Figure 3: Conditionnement des rats..... | 17 |
| Figure 4: Cage à métabolisme. (Photo personnelle) | 20 |
| Figure 5: Bandelettes réactives multiparamétriques. (Photos personnelles)..... | 20 |
| Figure 6: Appareil pour les tests biochimiques, microplaques Multiskan TM FC . | 21 |

LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|---------------|--|
| ALAT : | Alanine Amino Transférase. |
| ASAT : | Aspartate Amino Transférase. |
| CCMH : | Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine |
| CHUN : | Centre Hospitalier Universitaire National. |
| DL50 : | Dose Létale 50%. |
| EDTA : | Ethylène Diamine Tétra Acétique. |
| GB : | Globules Blancs. |
| GR : | Globules Rouges. |
| Hb : | Hémoglobines. |
| HCT : | Hématocrites |
| ITA : | Institut de Technologie Alimentaire. |
| LTH : | Laboratoire de Toxicologie et d'Hydrologie |
| NFS : | Numération Formule Sanguine. |
| OCDE : | Organisation de Coopération et de Développement Economiques. |
| PAL : | Phosphatases Alcalines. |
| TGMH : | Teneur Globulaire Moyenne en Hémoglobine |
| TGO: | Transaminases Glutamo Oxalo acétique. |
| TGP: | Transaminases Glutamo Pyruvique. |
| UCAD: | Université Cheikh Anta Diop de Dakar. |
| VGM : | Volume Globulaire Moyen |
| WVA : | World Vision Australia. |
| CHU : | Centre Hospitalier Universitaire |

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCTION | 1 |
| PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE..... | 5 |
| I. LES ACACIA AUSTRALIENS..... | 6 |
| I.1 Utilisation | 6 |
| I.1.1 Utilisation pharmaceutique | 6 |
| I.1.2 Utilisation alimentaire..... | 7 |
| I.1.3 Autres utilisations | 7 |
| I.2 Composition nutritionnelle des Acacia Australiens | 8 |
| I.3 Acide djenkolique | 9 |
| I.3.1 Composition chimique | 9 |
| I.3.2 Toxicité | 9 |
| II. RAPPEL SUR L'EVALUATION DU RISQUE TOXIQUE..... | 10 |
| II.1 Toxicité aigüe | 11 |
| II.2 Toxicité subchronique | 14 |
| DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE | 13 |
| I. CADRE D'ETUDE..... | 15 |
| II. MATERIELS | 15 |
| II.1 Matériel végétal | 15 |
| II.2 Matériel animal..... | 15 |
| III. METHODES..... | 16 |
| III.1 Protocole expérimental..... | 16 |
| III.1.1 Toxicité aigüe | 17 |
| III.1.2 Toxicité subchronique | 18 |
| III.2 Etude des paramètres hématologiques et biochimiques sériques dosés | 20 |
| III.2.1 Les tests biochimiques | 20 |
| III.2.2 Les tests hématologiques..... | 24 |

| | |
|---|-----------|
| III.3 Analyses statistiques | 25 |
| RESULTATS ET DISCUSSION | 26 |
| IV. RESULTATS | 27 |
| IV.1 Toxicité aigüe | 27 |
| IV.2 Toxicité subchronique..... | 28 |
| IV.2.1 Effet sur l'évolution des masses corporelles..... | 28 |
| IV.2.2 Effet sur l'évolution des paramètres biochimiques sériques | 31 |
| IV.2.3 Effet sur la teneur urinaire en protéines et glucose..... | 33 |
| IV.2.4 Effet sur les paramètres hématologiques | 33 |
| V. DISCUSSION | 37 |
| CONCLUSION | 40 |
| BIBLIOGRAPHIE | 42 |

INTRODUCTION

RapportGratuit.com

Depuis très longtemps, la faim, la famine et les maladies qui en découlent sont les principales crises dans les zones arides et semi-arides d'Afrique. Ces crises sont favorisées pour la plupart du temps par la sécheresse, les guerres, les inondations et les effets d'épidémies. L'incidence de ces facteurs sur la sécurité alimentaire pousse les populations à aller chercher d'autres sources d'alimentation , que ça soit à l'état brut ou transformé pour en faire une alimentation habituelle ou un complément alimentaire.

Les *Acacias* australiens, en plus de leur contribution au fourrage, bois de feu et l'amélioration et la protection des sols, sont considérés comme une importante source d'aliments pour améliorer la sécurité alimentaire dans les régions semi-aride d'Afrique et d'Australie. Nombreuses de ces espèces produisent des graines qui sont consommés comme un aliment de base saisonnier par les peuples autochtones en Australie. En Afrique, particulièrement au Niger, l'*Acacia colei* a été utilisé comme un aliment depuis plus de quinze ans sans problèmes de santé signalés (Adewusi et al, 2003 ; Harwood et al, 1999 ; Yates, 2014). Des essais agronomiques faits sur *A.saligna*, originaire du sud-ouest de l'Australie et qui a été introduite à des fins de conservation des sols dans les régions montagneuses du Tigrey (Ethiopie), *A.tumida* et *A.torulosa*, tous originaires de l'Australie, ont montré leur capacité à contribuer à l'amélioration de la sécurité alimentaire.

Cependant, des études de détermination des amines dans les graines d'*Acacia* (Metabolomics Australia), ont montré des niveaux potentiellement dangereux d'Acide djenkolique dans certaines espèces d'*Acacia* (Featherby and Yates, 2014). L'acide djenkolique a été identifié, pour la première fois, comme la cause d'une maladie rénale aiguë chez des personnes qui ont mangé du haricot djenkol (*Archidendron jirringa*) dans le sud-est de l'Asie (Van Veen et Hyman, 1933). Des analyses faites par Boughton et al (2012) sur des graines d'*Acacia colei*, d'*Acacia elecantha*, d'*Acacia torulosa*, d'*Acacia turmida* et d'*Acacia saligna*, pour la présence d'acides aminés toxiques, ont montré que l'acide djenkolique,

composé néphrotoxique connu, était présent à des niveaux élevés dans toutes les espèces testées. Les niveaux les plus bas étaient dans *A.colei* (0,49%) et le plus élevé chez *A.saligna* (1,9%).

Par ailleurs, des expériences ultérieures ont montré que des techniques de traitement appropriées pouvaient réduire l'acide djenkolique à des niveaux négligeables. Par exemple, exposer les graines à une chaleur très intense (par cuisson, par trempage dans de l'eau chaude ou par grillage), avant consommation, réduirait efficacement les niveaux d'acide djenkolique jusqu'à 90% (Featherby and Yates, 2014). Ceci a été démontré par des études menées à l'Institut des neurosciences Florey et de santé mentale à Melbourne (Australie) pour évaluer la toxicité subaiguë des graines d'*A.saligna*, d'*A.colei* et d'*A.torulosa*. Un régime supplémenté avec 30% et 60% de ces graines d'*Acacia* (grillées) a été utilisé dans cette étude chez des rats. Les résultats n'ont montré aucune toxicité pour ces espèces. (Yates, 2014)

Ces différentes approches d'utilisation de certaines espèces d'*Acacia* comme principales sources alimentaires ont permis de souligner l'importance de bien veiller sur leur innocuité et de convoquer des chercheurs pour l'examen de la question toxicologique qui, peut-être, se pose en matière de sécurité alimentaire .

L'objectif principal de ce travail consiste à évaluer la toxicité des graines comestibles d'*A.saligna* et d'*A.colei* pour renforcer la sécurité alimentaire dans les régions semi-arides de l'Afrique.

De manière plus spécifique, ce travail consiste à :

- Evaluer, *in vivo*, la toxicité aiguë (14 jours) des graines d'*Acacia saligna* crues par détermination de la Dose Létale 50 (DL50) ;
- Effectuer un test de toxicité subchronique (90 jours) des graines grillées d'*Acacia saligna* et d'*Acacia colei* chez le rat.

Le document est scindé en trois parties :

- Une première partie qui passe en revue les différents aspects d'utilisations alimentaire et thérapeutiques de même que la toxicité des acacias et des différentes études toxicologiques ;
- Une seconde partie qui présente le matériel et la méthode utilisés ;
- Et enfin une troisième partie qui présente les résultats et la discussion avant de boucler le tout avec une conclusion et des perspectives.

PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LES ACACIAS AUSTRALIENS

Les *Acacias* sont des végétaux de taille très variable appartenant à la sous-famille des mimosoidées (famille des fabacées) (Maslin, 1998). Certains sont des lianes ligneuses, d'autres des buissons bas, tandis que d'autres encore sont de grands arbres forestiers de plus de 35 mètre de hauteur (FAO, 1980). *Acacia* est le plus grand genre de plantes vasculaires en Australie (plus de 950 espèces actuellement reconnues), il est l'emblème floral national du pays et fut probablement l'une des deux premières plantes jamais collectées par les Européens de ce continent (George, 1971). Les espèces d'*Acacia* dominent de vastes régions de l'Australie, mais sont particulièrement communes et visibles dans les zones arides, semi-arides et subtropicales sèches. Les espèces de ce genre présentent une variété étonnante de caractéristiques morphologiques, écologiques, géographiques, biochimiques et génétiques (George, 1971).

I.1 Utilisation

La diversité biologique de la flore australienne, *Acacia* représente une vaste ressource économique, environnementale et sociale. Les espèces se produisent dans toutes les régions climatiques d'Australie et présentent une large gamme de tolérances écologiques (Brockwell *et al*, 2005). Dans la culture, la plupart des espèces australiennes sont faciles à propager et présentent souvent une bonne survie et une croissance rapide (Brockwell *et al*, 2005).

I.1.1 Utilisation pharmaceutique

Les aborigènes australiens utilisaient la plupart des parties de l'*Acacia* comme les feuilles, les gousses et l'écorce principalement à des fins médicinales (worldwidewattle). La gomme de certaines espèces d'*Acacia*, à l'exception de son pouvoir rotatoire, répond à toutes les exigences pharmacopées et elle est utilisée comme médicament dans les cas de diarrhée, de dysenterie et de diabète dans les

pays semi-aride d'Afrique (UNESCO, 1960). Depuis plusieurs années, beaucoup d'espèces d'*Acacia* sont utilisées déjà dans des laboratoires pharmaceutiques du monde entier. L'*Eucalyptus* par exemple est utilisé pour combattre le rhume et la toux, la fièvre et les infections (www.australia-australie.com, 08/12/2017).

I.1.2 Utilisation alimentaire

En dehors de l'utilisation pharmaceutique, les espèces d'*Acacia* en tant que source de nourriture humaine a fait l'objet d'un intérêt et d'une recherche croissants au cours des dernières années. Toutefois, plus de 30 espèces d'*Acacias* australiens produisent des graines et des fleurs comestibles (Brand, and Maggiore, 1992).

En Australie, les *Acacias* sont surtout connus pour avoir été utilisés comme une source de nourriture par les peuples autochtones. Toutefois, ces plantes sont prometteuses en tant que nouvelle source d'aliment humain dans les régions semi-arides du Sahel et d'Afrique de l'Ouest (Thomson, 1992 ; Harwood, 1994). Les graines d'*A. Colei* et d'*A. Elachantha* sont utilisées comme source de nourriture humaine dans certaines parties de l'Afrique subsaharienne, en particulier en période de famine. Elles ont été utilisées comme nourriture dans la région aride du Niger pendant plus de quinze ans sans aucun problème de santé signalé (Adewusi et al, 2003). Des études menées par Tigray Agricultural Research Institute (TARI) ont montré que l'*Acacia saligna* a fait ses preuves dans les hautes terres du Tigrey (Nord de l'Ethiopie) où plusieurs millions d'arbres matures, représentent une vaste ressource alimentaire potentielle (Shumuye, 2011). En Amérique du Nord et en Europe, les ingrédients des espèces d'*Acacia* sont utilisés dans les boissons gazeuses, les gommes à mâcher, les bonbons et les menthes.

I.1.3 Autres utilisations

Les *Acacias* sont reconnus pour leur potentiel élevé de production de la biomasse et leur bois est généralement considéré comme un bon combustible avec une haute valeur calorifique. En effet, certaines espèces d'*Acacia* fournissent un charbon de

bois de très bonne qualité. Plusieurs espèces d'*Acacia* sont très riches en tanins, dont *A.catechu*, *A.nilotica* (30-32% dans les gousses et 20% dans les écorces), *A.mearnsii* (30 à 54 % dans les écorces), *A.polyacantha*, *A. saligna* (jusqu'à 30.3% dans les écorces) et *A.tortilis*. Ainsi, une teinture d'un brun rougeâtre produite à partir du bois d'*A.catechu* est utilisée pour le tannage des peaux et également, dans le passé, pour l'imperméabilisation des voiles. (Ghouila H, 2012).

Les *Acacias* australiens ont également été introduits dans de nombreux pays afin de revégétaliser des milieux dégradés caractérisés en particulier par des carences importantes en azote (N) et en phosphore (P). De plus, plusieurs espèces d'*Acacia* présentent la capacité de cumuler ces deux types de symbiose avec la symbiose ectomycorhizienne. À titre d'exemple, les *Acacias* ont été introduits en Afrique du Sud (1840) et en Afrique du Nord (1870) afin de limiter les processus d'érosion éolienne et hydrique (Poynton, 2009 ; Carruthers, 2011).

Au moins 23 espèces d'*Acacia* d'origine australienne se comportent comme des plantes invasives à travers le globe, réduisant ainsi la biodiversité et les fonctions des écosystèmes dans lesquels elles ont été introduites.

I.2 Composition nutritionnelle des *Acacias* Australiens

La valeur nutritive globale de certaines graines d'*acacias* australiennes en zone sèche telles que *A. elachantha* (*Kalkardi*), *A. thomsonii* (*Thomson Wattle*), *A. tumida* (*Pindan Wattle*) et en particulier *A. colei* (*Cole's Wattle*) est généralement élevée, reflétant leur teneur en protéines, en lipides et en glucides. Ce qui leur donne un potentiel important pour améliorer la sécurité alimentaire dans les régions sujettes à la sécheresse et à la famine périodique ou chronique (Yates, P, 2014), comme la zone semi-aride d'Afrique (Adewusi. et al, 2003; Harwood, 1999) et les régions sèches du sud de l'Inde, qui ont des climats similaires à ceux des régions subtropicales, arides et semi-arides d'Australie (Thomson et al, 1996).

Cependant, des études, menées pour la détermination des acides aminés dans les *Acacias*, ont montré la présence d'un composé anti nutritionnel, l'acide djenkolique, dans certaines espèces (Featherby and Yates, 2014) comme l'*Acacia colei* (Baughton et al, 2012) et l'*A.saligna*.

I.3 L'Acide Djenkolique

L'acide djenkolique c'est un composé qui a été identifié pour la première fois dans les urines des indigènes de Java (dans le sud-est de l'Asie) atteints d'une maladie rénale chronique après avoir mangé du haricot djenkol. Ce fut plus tard que le composé a été isolé du haricot djenkol lui-même. (V.Vincent et al, 1936).

I.3.1 Structure chimique

L'analyse des urines des patients indigènes a montré que ce composé, s'agissait d'un acide aminé soufré non protéique présent de façon naturelle dans les graines du haricot djenkol. Sa structure chimique est celle de deux résidus de cystéine reliés par un pont méthylène entre les deux atomes de soufre terminaux. Des études, d'extraction de l'acide djenkolique du haricot djenkol, menées par Areekul et al (1976) ont montré que les graines du haricot Djenkol contenaient 0,3-1,3 g% d'acide djenkolique en forme de cristaux pointus, et environ 93% de cet acide se trouvaient à l'état libre.

I.3.2 Toxicité

La toxicité de ce composé pour l'homme, notamment pour les reins provient de sa faible solubilité en milieu acide après ingestion des graines du haricot djenkol. L'acide aminé précipite en formant des cristaux qui provoquent l'irritation mécanique des tubules rénaux et de l'appareil urinaire, provoquant divers symptômes tels que douleurs abdominales, coliques, nausées, vomissements, dysurie, hématurie

macroscopique et oligurie survenant entre deux et six heures après l'ingestion des graines (V. Vincent et al, 1936).

La toxicité des haricots djenkol a été étudiée chez 5 singes rhésus, 9 rats albinos et 22 souris nourries avec des graines du haricot djenkol. La production urinaire totale a diminué. Il y avait une augmentation de la densité de l'urine pendant la période d'alimentation des singes avec des haricots djenkol. Les échantillons urinaires des animaux de laboratoire étaient troubles et contenaient des globules rouges, des globules blancs, des cellules épithéliales, de l'albumine et des particules amorphes. Une des 22 souris a excrété des cristaux pointus en forme d'aiguilles dans l'urine au troisième jour après l'alimentation. L'examen histologique des reins des rats et des souris a montré une nécrose tubulaire aiguë légère à sévère avec une nécrose des cellules glomérulaires (Areekul, 1976).

Des études menées en Australie pour la recherche d'acide aminés dans des graines d'*Acacia* ont révélé la présence de l'acide djenkolique dans certaines espèces d'*Acacia* mais à de très faibles proportions (par exemple 0,49% dans une graine d'*Acacia colei* et 1,9% dans une graine d'*Acacia saligna*). Ce résultat a été démontré par des études faites à l'Institut des neurosciences Florey et de santé mentale à Melbourne (Australie) lors d'une évaluation de la toxicité subaiguë des graines d'*A.saligna*, d'*A.colei* et d'*A.torulosa* (Featherby et Yates, 2014).

II. RAPPELS SUR L'EVALUATION DES RISQUES TOXIQUES

L'évaluation de la toxicité s'appuie sur des études qualitatives ou quantitatives adéquates. Il existe plusieurs types d'études qui nous permettent d'évaluer les effets d'un toxique. On peut les classer dans quatre catégories (Lapointe, 2004) :

- Les études épidémiologiques, qui comparent plusieurs groupes d'individus ou les études de cas ;
- Les études expérimentales *in vivo*, qui utilisent des animaux ;

- Les études *in vitro*, effectuées sur des cultures de tissus ou des cellules et ;
- Les études théoriques par modélisation.

On utilise fréquemment une terminologie pratique mais arbitraire pour désigner les diverses formes de toxicité selon la fréquence et la durée de l'exposition.

(Tableau 1) :

Tableau I : les formes d'intoxication

| Forme de toxicité | Fréquence d'administration | Durée de l'exposition (Rongeurs) |
|-------------------|----------------------------|----------------------------------|
| Aiguë | Unique ou Répétée | < 24 heures |
| Subaiguë | Répétée | = 1 mois |
| Subchronique | Répétée | De 1 à 3 mois |
| Chronique | Répétée | > 3 mois |

II.1 Toxicité aiguë

La toxicité aiguë d'une substance chimique est l'ensemble des effets sur l'organisme provoqués par une exposition de courte durée à une dose (concentration) forte, généralement unique. En effet, dans les études expérimentales chez l'animal, la toxicité aiguë se détermine par la DL₅₀ (par voie orale - voie cutanée). La DL₅₀ est un terme qui a été introduit et développé par Trevan en 1927. Elle est définie comme la dose létale médiane qui est la dose unique déduite statistiquement, censée provoquer la mort de 50 % des animaux auxquels la substance a été administrée (**Figure 1**) (Oliver, 1986). Elle est souvent employée dans la littérature classique comme une mesure de la toxicité aiguë des produits chimiques. La valeur de la DL₅₀ est exprimée en masse de la

substance étudiée rapportée à l'unité de masse corporelle des animaux soumis à l'expérimentation ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$).

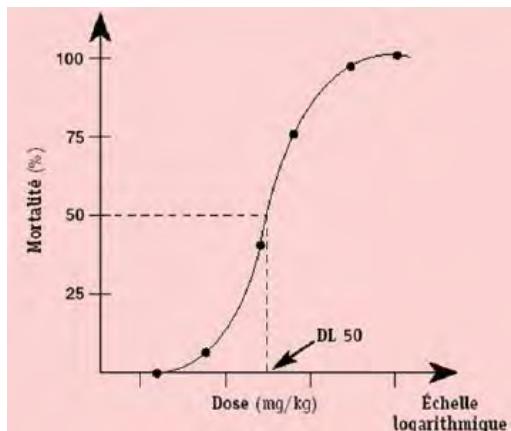


Figure 1: Dose létale 50 ; **Source :** Internet (Google image)

Lorsque la voie d'absorption du toxique est respiratoire on parlera de CL₅₀ (concentration létale 50) pour exprimer la concentration du toxique dans l'air inspiré et causant la mort de 50 % des animaux. La CL₅₀ est exprimée en $\text{mg} \cdot \text{min}/\text{m}^3$.

La méthode classique d'étude de la toxicité orale aiguë d'une substance (Trevan, 1927) consiste en une administration de ladite substance à différentes doses, par voie orale, à plusieurs groupes d'animaux d'expérience (généralement des rats ou des souris des deux sexes), à raison d'une dose par groupe. Les animaux traités sont observés de près durant les premières 24 heures et ensuite quotidiennement pendant 2 semaines et les éventuels changements de l'apparence et du comportement, ainsi que la létalité (DL₅₀) sont notés. Pour les études expérimentales *in vivo*, généralement, c'est le rat et la souris deux espèces de rongeurs qui sont sélectionnés pour déterminer la DL₅₀ pour des raisons de coût (prix de revient acceptable, besoins nutritifs réduits) et de commodité (petite taille, courte durée de gestation).

II.2 Toxicité subchronique :

Alors que la toxicité aiguë concerne les effets nocifs dus à des doses uniques, une forme plus commune de l'exposition humaine à de nombreux produits chimiques se fait par la répétition de doses qui ne produisent pas d'effets toxiques immédiats. La toxicité subchronique correspond aux effets d'une administration réitérée à long terme, durant une période de 1 à 3 mois, et à faibles doses. Ces doses sont insuffisantes pour provoquer un effet immédiat, mais la répétition de leur absorption sur une longue période de temps à des effets délétères.

La substance à tester est administrée quotidiennement à différents niveaux de dose à plusieurs groupes d'animaux, à raison d'un niveau de dose par groupe. De manière générale, au moins trois groupes d'essai et un groupe témoin doivent être utilisés. La dose la plus élevée doit provoquer des effets toxiques, sans être létale ou causer de sévères souffrances. Une séquence de doses décroissantes doit ensuite être sélectionnée en vue de mettre en évidence tout effet lié à la dose ainsi qu'une concentration sans effet nocif observé à la dose la plus faible (OCDE, 2008a).

Dans ce présent travail nous avons réalisé des études expérimentales *in vivo*, avec utilisation de rats, pour des tests de toxicité aiguë et subchronique de deux espèces d'acacia australien (*A. saligna* et *A. colei*).

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

I. CADRE D'ETUDE

Le travail présenté dans ce mémoire a été effectué au sein du Laboratoire de Toxicologie et d'Hydrologie (LTH), à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie (FMPO) de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar (UCAD) avec la collaboration de WVA (World Vision Australia), du Laboratoire de Biochimie et d'hématologie de CHUN (Centre Hospitalier Universitaire) de Fann et de l'ITA (Institut de Technologie Alimentaire).

Ce travail a été réalisé dans le cadre du Programme Acacia comestibles de WVA pour renforcer la sécurité alimentaire dans les régions semi-arides de l'Afrique.

II. MATERIELS

II.1 Matériel végétal

L'étude a été réalisée avec du régime normal de rats supplémentés avec des graines de deux espèces d'acacias australiens, *Acacia saligna* et *Acacia colei*. Ces graines étaient soit à l'état cru ou grillé.

II.2 Matériel animal

L'espèce animale choisie pour cette étude est le rat (*Rattus norvegicus*) albinos de la souche *Wistar* (**figure 2**). Ce sont des mammifères de l'ordre des rongeurs, largement utilisés dans divers domaines de recherche. Les rats ont été élevés à l'animalerie du Laboratoire de Toxicologie et d'Hydrologie (LTH) de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontologie (FMPO) de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar (UCAD).



Figure 2 : Rats albinos de souche Wister ; **source** : photo personnelle.

III. METHODES

III.1 Protocole expérimental

Les rats sélectionnés pour les tests ont été maintenus dans des conditions favorables d'élevage à une température de 25°C. Ils ont été nourris par leur régime standard provenant des Etas unis d'Amérique et ils recevaient de l'eau minérale naturelle à volonté. Les aliments ont été supplémentés par des graines crues ou grillées d'*A.saligna* ou d'*A.colei*, à 90%, 70% (pour l'étude de la toxicité aiguë), et 50%, 35%, 20% (pour l'étude de la toxicité subchronique). La préparation des aliments d'essai a été faite par l'ITA (Institut de Technologie Alimentaire).

Les animaux étaient constitués de mâles et de femelles nullipares et non gravides et avaient des poids moyens respectifs de 348 g et 241 g. Ils ont été gardés dans des cages tapissées de copeaux de bois renouvelés tous les trois jours. Aucun de ces animaux n'avait été sujet à des expériences antérieures.

Pour chaque traitement on a utilisé 6 rats dont 3 mâles et 3 femelles qui vont constituer un lot.

III.1.1 Test de Toxicité aiguë

La détermination de la DL50 a été menée chez les rats par la méthode de «l'ajustement des doses» du protocole 425 de l'OCDE (OCDE, 2006) modifiée. Pour évaluer la toxicité aiguë de l'*Acacia saligna*, une étude a été menée avec deux tests, test 1 avec 70% d'*A.saligna* et test 2 avec 90% *A.saligna*. Pour chaque test, nous avons travaillé sur 18 rats âgés de 12 semaines environ avec un poids moyen de 250g, répartis au hasard dans différentes cages (**figure 3**), et ils ont été acclimatés pendant environ une semaine. Après acclimatation, 3 lots de 6 rats (3 mâles et 3 femelles, séparés) ont été constitués pour chaque test.



Figure 3: Conditionnement des rats

Avant le début des traitements, les animaux ont été mis à jeun pendant environ 12 heures.

Les rats ont été aussi pesés la veille du jour de traitement, correspondant à J0. Pour les traitements, le produit testé est constitué d'aliment normal des rats supplémenté soit par 70% de graines d'*Acacia saligna* crues, soit par 70% de graines d'*Acacia saligna* grillées pour le test 1, et en ce qui concerne le test 2, 90% d'*Acacia saligna* cru ou 90% d'*Acacia saligna* grillé a été rajouté dans le régime normal des rats. Ainsi, dans les 2 tests, le lot 1 représentait le lot témoin (régime non supplémenté ou T1), le lot 2, régime supplémenté de 70% ou 90%

d'*Acacia saligna* cru (T2), et le lot 3, régime supplémenté de 70% ou 90% d'*Acacia saligna* à l'état grillé (T3).

Test 1 :

- Lot 1 Contrôle (régime normal) ou T1
- Lot 2 *Acacia saligna* cru 70% ou T2
- Lot 3 *Acacia saligna* grillé 70% ou T3

Test 2 :

- Lot 1 Contrôle (régime normal) ou T1
- Lot 2 *Acacia saligna* cru 90% ou T2
- Lot 3 *Acacia saligna* grillé 90% ou T3

Les animaux ont été nourris à ces produits supplémentés pendant une semaine (7 jours), avant d'être retirés et remplacés par le régime normal pendant une semaine encore (7 jours).

Durant toute l'étude (14 jours), tous les animaux ont été soumis à des observations particulières 24 heures après le début des traitements, ensuite des observations quotidiennes ont été effectuées pour constater éventuellement les animaux morts et les signes cliniques. Chaque fin de semaine, correspondant à J7 et J14, des pesés d'animaux s'effectuaient. Pour chaque test, l'évolution des masses corporelles des lots a été déterminée puis comparée au lot témoin, durant les 14 jours de l'étude.

III.1.2 Test de Toxicité subchronique

La toxicité subchronique des espèces d'*Acacia* australien (*A.saligna* et *A.colei*) a été déterminée selon la ligne directrice 407 de l'OCDE (OCDE, 2008).

Pour ce test, 42 rats (21 mâles et 21 femelles, de poids corporels moyens : 348g pour les mâles, et 241g pour les femelles), ont été utilisés. Chaque rat a été identifié par une marque sur la queue.

Les animaux ont été répartis au hasard dans 7 lots de 6 rats dont 3 mâles et 3 femelles, séparés comme décrit précédemment. Les rats du premier lot (lot1) constituaient le lot témoin et recevaient, durant toute l'étude, de la nourriture normale non traité. Les lots 2, 3 et 4 ont reçu respectivement de la nourriture supplémentée de graines d'*Acacia colei* grillées de 20%, 35% et 50%, et les lots 5, 6 et 7, recevaient respectivement du régime supplémenté de graines d'*acacia saligna* grillées à 20%, 35% et 50%, pendant 90 jours.

- Lot 1 Contrôle (régime normal)
- Lot 2 *Acacia colei* grillé 20%
- Lot 3 *Acacia colei* grillé 35%
- Lot 4 *Acacia colei* grillé 50%
- Lot 5 *Acacia saligna* grillé 20%
- Lot 6 *Acacia saligna* grillé 35%
- Lot 7 *Acacia saligna* grillé 50%

Les animaux étaient observés individuellement au moins une fois par jour avec une attention particulière pendant les 90 jours. Les observations portaient sur les changements affectant la peau, la fourrure, la respiration, la démarche, et de comportements bizarres.

Le poids individuel de chaque animal a été déterminé 24h avant les traitements, puis tous les 7 jours, et enfin à la veille de la fin du test.

Chaque semaine, tous les rats ont été isolés dans des cages à métabolisme (**figure 4**) où ils séjournaient pendant 24 heures et leurs urines ont été collectées dans des flacons en vue de dosages biochimiques (protéinurie et glycosurie) à l'aide de bandelettes réactives multiparamétriques (**figure 5**). L'évolution pondérale des rats de chaque test a été déterminée puis comparée aux témoins.



Figure 4: Cage à métabolisme. (Photo personnelle)



Figure 5: Bandelettes réactives multiparamétriques. (Photos personnelles)

A la fin de l’expérimentation, les rats ont été mis à jeun durant la nuit qui a précédé la prise de sang. Les animaux ont été ensuite sacrifiés, et un prélèvement de sang a été effectué au niveau de l’œil, pour certains rats, et pour d’autres, directement au niveau du cœur. Le sang prélevé a été recueilli dans des tubes avec anticoagulant, l’Ethylène Diamine Tétra Acétique (EDTA) pour les tests hématologiques, avec fluorure de sodium pour le dosage de la glycémie, et des tubes secs pour les tests biochimiques (activité de transaminases (aspartate aminotransférase (ASAT) et alanine aminotransferase (ALAT)), la phosphatase alcaline (PAL), les dosages de l’urée et de la créatinine.

III.2 Etude des paramètres hématologiques et biochimiques sériques

III.2.1 Tests biochimiques

Les analyses biochimiques ont été faites au niveau du Laboratoire de Toxicologie (LTH) et d’Hydrologie de l’Université Cheikh Anta Diop de Dakar (UCAD)

Les tubes secs et fluorés ont été centrifugés à 3000 tours /minute pendant 5 minute, ensuite le surnageant (plasma) a été placé dans des tubes nunc afin de quantifier les paramètres biochimiques suivants : glycémie, urée, créatinine, ASAT, ALAT et PAL.

La quantification de ces paramètres biochimique a été faite à l'aide d'un photomètre pour microplaques Multiskan™ FC (**Figure 6**).



Figure 6: appareil pour les tests biochimiques, microplaques Multiskan™ FC
(photo personnelle)

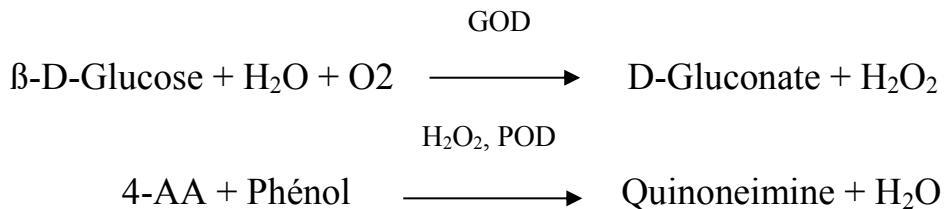
Cet appareil est capable de lire des plaques de 96 puits pour un grand nombre de tests. La gamme comprend un modèle équipé d'un incubateur assurant un contrôle de la température jusqu'à 50 °C et capable de lire les plaques à 96 puits et la lecture ne prend que 6 secondes. Grâce à sa plage de longueurs d'ondes de 340 à 850 nm, le Multiskan™ FC est parfaitement adapté à des applications de la cinétique enzymatique.

➤ Dosage de la glycémie :

✓ Principe

Le dosage du glucose dans le sang repose sur une méthode enzymatique colorimétrique mettant en jeu la réaction de Trinder (Trinder, 1969). Le glucose est oxydé en D-gluconate par le glucose oxydase (GOD) avec la formation de

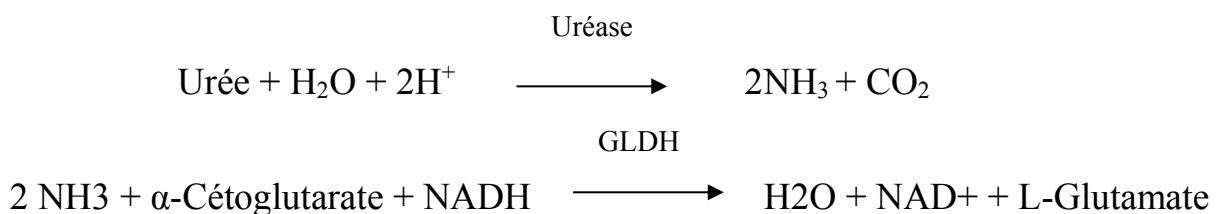
peroxyde d'hydrogène. En présence de la peroxydase (POD), un mélange de phénol et de 4-aminoantipyrine (4-AA) est oxydé par le peroxyde d'hydrogène, pour former une coloration rouge de quinoneimine proportionnelle à la concentration de glucose dans l'échantillon.



➤ Détermination des teneurs en urée :

✓ Principe

L'uréase catalyse l'hémolyse de l'urée, présente dans l'échantillon, en ammoniac (NH_3) et en anhydride carbonique (CO_2). L'ammoniac formé est incorporé à l' α -cétoglutarate par l'action du glutamate déshydrogénase (GLDH) avec oxydation parallèle de la NADH à la NAD^+ :



La diminution de la concentration de NAD^+ dans la méthode est proportionnelle à la concentration d'urée dans l'échantillon testé (Kaplan et al, 1984).

➤ Détermination des teneurs en créatinine :

✓ Principe

La créatinine dans l'échantillon est dosée en routine par la réaction de Jaffé (Kaplan et al, 1984, Young, 1995), une méthode cinétique colorimétrique. La

créatinine réagit avec le picrate de sodium en milieu alcalin pour donner un complexe coloré quantifiable par spectrophotométrie à 570nm.

➤ Activité des transaminases : ASAT et ALAT :

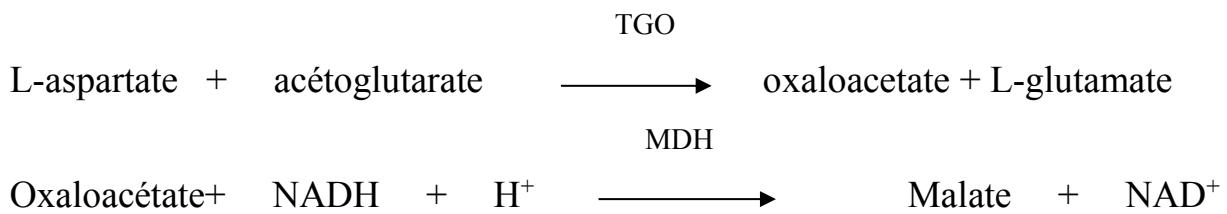
Les dosages pour la détermination de l'activité des transaminases sont basés sur la mesure cinétique dans un système réactionnel dont la finalité est l'oxydation du coenzyme NADH, H⁺.

- Dosage de l'Aspartate Aminotransférase (ASAT ou TGO)

✓ Principe

Le dosage repose sur le transfert enzymatique médié par l'ASAT d'un groupement amine de la L-aspartate à l'acétoglutarate pour obtenir le L-glutamate et l'oxaloacétate

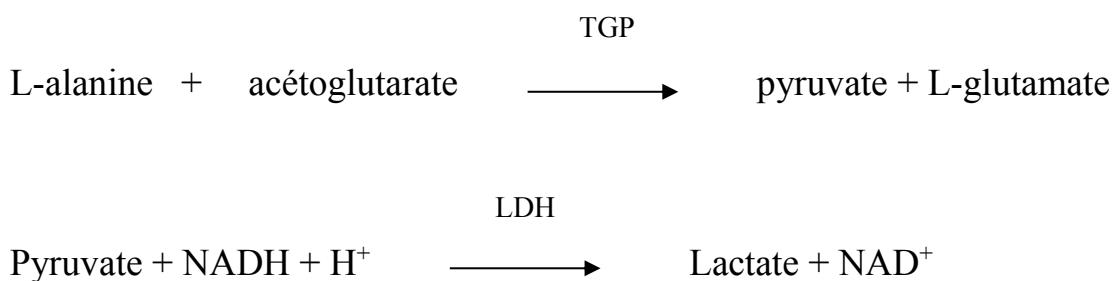
Le dosage se fait selon les réactions suivantes :(Kaplan et al, 1984)



- Dosage de l'Alanine Aminotransférase (ALAT ou TGP)

✓ Principe

Le principe de ce test repose sur le transfert enzymatique médié par L'ALAT d'un groupement amine de la L-alanine à l'acétoglutarate pour obtenir le L-glutamate et le pyruvate selon les réactions suivantes :(Kaplan et al, 1984)



- Dosage de la Phosphatase Alcaline (PAL)

Les phosphatases alcalines (PAL) sont présentes de nombreux tissus, dont les os, le foie, les intestins, les reins et le placenta. La détermination des PAL présente un intérêt particulier dans le diagnostic des maladies hépatobiliaires (hépatite, cirrhose ou cancer) ou des maladies osseuses (rachitisme chez l'enfant par carence de vitamine D, carcinome métastasique, maladie de Paget...).

✓ Principe

En milieu alcalin les PAL catalysent l'hydrolyse du p-nitrophénylphosphate en p-nitrophénol et phosphate selon la réaction ci-dessous. La vitesse d'apparition du nitrophénol, suivie par la variation de l'absorbance à 405nm, est proportionnelle à l'activité PAL dans le sérum.



III.2.2 Tests hématologiques :

Les tests hématologiques ont été effectués au niveau du laboratoire biochimique et hématologique du Centre Hospitalier Universitaire National (CHUN) de Fann à Dakar.

Les tubes à EDTA ont été utilisés pour l'analyse des paramètres hématologiques (nombre de Globules Rouges (GR), nombre de globules blancs (GB), taux d'Hématocrite (HCT), taux d'Hémoglobine (Hb), Volume Globulaire Moyen (VGM), Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (CCMH) et Teneur Globulaire Moyenne en Hémoglobine (TGMH). Pour tous ces paramètres précités les analyses ont été effectuées à l'aide d'un automate pour hématologie MIN-BC-3000Plus auto hematology analyzer de la marque Mindray.

Le mode de fonctionnement de cet automate est basé sur l’aspiration d’une quantité connue de sang total, dilué au préalable par des solutions de dilution adaptées pour chaque type de cellules.

L’échantillon de sang est placé au niveau des canalicules de diamètres très faibles, et le sang est aspiré par ce dernier, permettant le passage des cellules, ce qui entrave la réception d’un faisceau lumineux par une cellule photoélectrique, permettant de traiter automatiquement la numération de la formule sanguine.

III.3 Analyse statistique :

Les résultats ont été présentés sous la forme de moyennes avec leurs écart-types (Moyennes± Ecart type). Après analyse de la variance (ANOVA), la comparaison des moyennes a été effectuée par le test « t de Student » à l’aide du logiciel XLSTAT version 2017. La différence a été considérée statistiquement significative pour un niveau de probabilité p inférieur à 0,05 ($p < 0,05$).

RESULTATS ET DISCUSSION

IV. RESULTATS

IV.1 Toxicité aigüe

Durant toute la période de l'étude (14 jours), aucune mort et aucun signe particulier de toxicité n'a été observé pour les deux tests qui étaient 70% et 90% de graines d'*A.saligna* crues et grillées, supplémentées dans le régime normal des rats. Les tableaux II et III présentent l'évolution des poids corporels moyens des animaux d'essai (avec n= 3 rats) pour les tests 1 et 2, pendant la période d'observation.

Test 1 (70% d'*Acacia saligna*) :

Tableau II : Masse corporelle moyenne en grammes (g)

| Mâles | | | |
|---|-----------|-----------|------------|
| | J0 | J7 | J14 |
| Contrôle T1 (n=3) | 260 ± 9 | 301± 21 | 319 ± 18 |
| <i>A.saligna</i> cru 70% T2 (n=3) | 249 ± 8 | 258 ± 67 | 310 ± 10 |
| <i>A.saligna</i> grillé 70% T3 (n=3) | 261 ± 8 | 291 ± 13 | 320 ± 10 |
| Femelles | | | |
| | J0 | J7 | J14 |
| Contrôle T1 (n=3) | 195 ± 11 | 208 ± 12 | 227 ± 10 |
| <i>A.saligna</i> cru 70% T2 (n=3) | 196 ± 14 | 212 ± 22 | 225 ± 13 |
| <i>A.saligna</i> grillé 70% T3 (n=3) | 209 ± 1 | 223 ± 1 | 250 ± 1 |

* Différence statistiquement significative par rapport au groupe contrôle (p < 0,05)

L'analyse de ces tableaux ne montre aucune différence significative des poids corporels moyens chez les mâles et les femelles traités avec de l'*A.saligna* cru et grillé, à 70% comparativement à leurs témoins respectifs.

Test 2 (90% d'*Acacia saligna*) :

Tableau III : Masse corporelle moyenne en grammes (g)

| Mâles | | | |
|--------------------------------------|-----------|-----------|------------|
| | J0 | J7 | J14 |
| Contrôle T1 (n=3) | 299 ± 6 | 340 ± 3 | 328 ± 6 |
| A.saligna cru 90% T2 (n=3) | 299 ± 4 | 297 ± 5 | 331 ± 10 |
| A.saligna grillé 90% T3 (n=3) | 298 ± 9 | 309 ± 12 | 326 ± 14 |
| Femelles | | | |
| | J0 | J7 | J14 |
| Contrôle T1 (n=3) | 210 ± 7 | 214 ± 10 | 218 ± 6 |
| A.saligna cru 90% T2 (n=3) | 216 ± 2 | 200 ± 10 | 231 ± 10 |
| A.saligna grillé 90% T3 (n=3) | 203 ± 10 | 214 ± 12 | 226 ± 14 |

*Différence statistiquement significative par rapport au groupe contrôle (p <0,05)

Nos résultats ne montrent aucune différence significative du poids corporel des rats traités par l'*A.saligna* cru et grillé, à 90% comparativement au lot témoin.

IV.2 Toxicité subchronique

IV.2.1 Effet sur l'évolution des masses corporelles

Les tableaux (III et IV) présentent l'évolution des masses corporelles moyennes des rats traités avec du *colei* et du *saligna* à différentes proportions (50%, 35% et 20%).

Tableau IV : Evolution de la masse corporelle moyenne des animaux nourris avec le régime supplémenté avec des graines d'*Acacia colei* en grammes (g) pendant 90 jours.

| Mâles | | | | | | |
|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| %<i>Acacia colei</i> | S0 | S1 | S2 | S3 | S4 | S12 |
| Lot 1 : 0% (n = 3) | 304 ± 10 | 336 ± 18 | 346 ± 16 | 363 ± 24 | 381 ± 28 | 425 ± 51 |
| Lot 2: 20%(n = 3) | 420 ± 4 | 353 ± 1 | 361 ± 6 | 370 ± 2 | 376 ± 6 | 402 ± 9 |
| Lot 3: 35%(n = 3) | 362 ± 9 | 384 ± 4 | 392 ± 10 | 400 ± 6 | 405 ± 3 | 431 ± 10 |
| Lot 4: 50%(n = 3) | 334 ± 9 | 350 ± 14 | 360 ± 12 | 374 ± 18 | 381 ± 29 | 400 ± 20 |
| Femelles | | | | | | |
| Lot : 0% (n = 3) | 243 ± 1 | 252 ± 12 | 258 ± 11 | 261 ± 8 | 269 ± 6 | 275 ± 5 |
| Lot 2: 20%(n = 3) | 237 ± 2 | 250 ± 8 | 245 ± 3 | 252 ± 1 | 259 ± 4 | 250 ± 4 |
| Lot 3: 35%(n = 3) | 229 ± 7 | 241 ± 1 | 238 ± 7 | 244 ± 6 | 247 ± 3 | 254 ± 4 |
| Lot 4: 50%(n = 3) | 249 ± 3 | 256 ± 7 | 269 ± 19 | 268 ± 11 | 271 ± 10 | 277 ± 12 |

* Différence statistiquement significative par rapport au groupe contrôle (p < 0,05) ; 0% : Témoin ; n = nombre de rats ; ND : non détecté

L'analyse statistique du poids corporel moyen des rats (mâles et femelles) consommant le régime supplémenté avec des graines d'*Acacia colei* (50%, 35% et 20%) ne montre aucune différence significative comparé aux témoins consommant le régime standard (lot 1).

Tableau V : Evolution de la masse corporelle moyenne des animaux nourris avec le régime supplémenté avec des graines d'*Acacia saligna* en grammes (g) pendant 90 jours

| Mâles | | | | | | |
|----------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| % <i>Acacia saligna</i> | S0 | S1 | S2 | S3 | S4 | S12 |
| Lot 1 : 0% (n = 3) | 304 ± 10 | 336 ± 18 | 346 ± 6 | 363 ± 24 | 381 ± 28 | 425 ± 51 |
| Lot 5 : 20% (n = 3) | 399 ± 2 | 422 ± 10 | 430 ± 1 | 431 ± 4 | 432 ± 18 | 452 ± 20 |
| Lot 6 : 35% (n = 3) | 368 ± 7 | 362 ± 13 | 407 ± 12 | 413 ± 16 | 418 ± 20 | 440 ± 13 |
| Lot 7 : 50% (n = 3) | 353 ± 4 | 361 ± 8 | 379 ± 9 | 385 ± 4 | 388 ± 12 | 411 ± 6 |
| Femelles | | | | | | |
| Lot 1 : 0% (n = 3) | 243 ± 1 | 252 ± 13 | 258 ± 11 | 261 ± 8 | 269 ± 6 | 275 ± 5 |
| Lot 5 : 20% (n = 3) | 280 ± 13 | 271 ± 7 | 281 ± 5 | 283 ± 2 | 285 ± 7 | 291 ± 8 |
| Lot 6 : 35% (n = 3) | 232 ± 1 | 239 ± 11 | 241 ± 4 | 250 ± 11 | 245 ± 5 | 261 ± 4 |
| Lot 7 : 50% (n = 3) | 246 ± 8 | 252 ± 3 | 249 ± 7 | 253 ± 9 | 260 ± 1 | 267 ± 6 |

* Différence statistiquement significative par rapport au groupe contrôle ($p < 0,05$) ; 0% : Témoin ; n = nombre de rats ; ND : non détecté

Le poids moyen des animaux traités avec des graines d'*Acacia saligna* (50%, 35% et 20%) ne montre aucune différence statistique comparé aux témoins.

IV.2.2 Effet sur l'évolution des paramètres biochimiques sériques

Six paramètres biochimiques sériques sont suivis, le glucose, l'urée, la créatinine, l'ASAT, l'ALAT et la PAL. Après analyse, les résultats obtenus sont regroupés dans les tableaux suivants (tableaux V et VI).

Tableau VI : Variation de quelques paramètres biochimiques sériques chez des rats traités avec du régime supplémenté avec des graines d'*A.colei* pendant 90 jours.

| Mâles | | | | | |
|-------------------------------|---------------------------|------------------------|------------------------------|------------------------|-----------------------|
| %Acacia colei | Glycémie (g/l) | Urée (mg/l) | Créatinine (mg/l) | ASAT (UI/L) | PAL (UI/L) |
| Lot 1 : 0% (n = 3) | 3,6 ± 2,2 | 16,30±12,10 | 90,12 ± 43,74 | 12,06 ± 11,52 | 235,22 ± 55,96 |
| Lot 2: 20%(n = 3) | 1,5 ± 0,7 | 1,30 ± 1,53 | 41,95 ± 22,99 | 48,73 ± 20,00 | 158,67±135,54 |
| Lot 3: 35%(n = 3) | 2,1 ± 1,6 | 7,83 ± 12,09 | 64,37 ± 28,94 | 10,46 ± 5,91 | 213,35±170,67 |
| Lot 4: 50%(n = 3) | 1,5 ± 0,5 | 2,24 ± 0,74 | 81,79 ± 54,27 | 53,59 ± 55,34 | 191,24±114,34 |
| Femelles | | | | | |
| Lot 1 : 0% (n = 3) | 0,8 ± 0,1 | 5,74 ± 1,76 | 105,13 ± 84,40 | 18,01 ± 4,28 | 89,25 ± 5,34 |
| Lot 2: 20%(n = 3) | 2,5 ± 2,1 | ND | 31,44 ± 13,75 | 8,53 ± 10,50 | 61,24 ± 106,06 |
| Lot 3: 35%(n = 3) | 1,0 ± 0,3 | 2,26 ± 2,14 | 56,67 ± 31,62 | 54,39 ± 57,36 | 42,25 ± 38,87 |
| Lot 4: 50%(n = 3) | 1,2 ± 0,0* | 1,31 ± 0,70* | 38,57 ± 8,18 | 25,86 ± 16,48 | 86,64 ± 90,00 |

* Différence statistiquement significative par rapport au groupe contrôle (p <

0,05) ; 0% : Témoin ;

n = nombre de rats

ND : non détecté

Tableau VII : Evolution des paramètres biochimiques sériques suivis chez des rats nourris avec du régime supplémenté avec des graines d'*A.saligna* pendant 90 jours

| Mâles | | | | | |
|---------------------------|-------------------|---------------------|----------------------|---------------|-----------------------|
| % <i>Acacia saligna</i> | Glycémie (g/l) | Urée (mg/l) | Créatinine (mg/l) | ASAT (UI/L) | PAL (UI/L) |
| Lot 1 : 0% (n = 3) | 3,6 ± 2,2 | 16,30 ± 12,1 | 90,12 ± 43,74 | 12,06 ± 11,52 | 235,22 ± 55,96 |
| Lot 5: 20%(n = 3) | 1,9 ± 0,6 | 0,46 ± 00,0* | 80,44 ± 28,14 | 30,44 ± 11,76 | 156,49 ± 17,42 |
| Lot 6: 35%(n = 3) | 1,3 ± 1,2 | 0,25 ± 0,17* | 93,11 ± 68,69 | 39,43 ± 59,70 | 60,96 ± 55,34* |
| Lot 7: 50%(n = 3) | 1,7 ± 0,3 | 3,69 ± 4,40 | 123,58 ± 133,73 | 20,41 ± 15,25 | 142,01 ± 30,50 |
| Femelles | | | | | |
| Lot 1 : 0% (n = 3) | 0,8 ± 0,1 | 5,74 ± 1,76 | 105,13 ± 84,40 | 18,01 ± 4,28 | 89,25 ± 5,34 |
| Lot 5: 20%(n = 3) | 1,6 ± 0,1* | 3,72 ± 3,06 | 0,44 ± 0,02 # | 17,90 ± 1,27 | 121,45 ± 54,61 |
| Lot 6: 35%(n = 3) | 1,4 ± 0,3 | 0,56 ± 0,31* | 94,16 ± 66,01 | 41,29 ± 32,68 | 88,32 ± 25,20 |
| Lot 7: 50%(n = 3) | 1,7 ± 0,6* | 2,14 ± 0,15 | 67,45 ± 45,03 | 15,45 ± 5,32 | 52,21 ± 46,93 |

*Différence statistiquement significative par rapport au groupe contrôle ($p < 0,05$)

Valeur aberrante

0% : Témoin ;

n = nombre de rats

D'après les résultats obtenus, aucune différence significative de la concentration plasmatique en glucose chez les mâles traités par le *colei* ou par le *saligna* comparés au groupe témoin n'est observée, par contre, chez les femelles, une augmentation significative ($p < 0,05$) de ce paramètre au niveau des lots 4, 5 et 7 par rapport à leur témoin est enregistrée. Les résultats de la variation de la

créatinine, d'ASAT et de PAL chez l'ensemble des rats traités par les graines de *colei* ou des graines de *saligna*, ne montrent quasiment pas de différence significative comparativement à leurs témoins. Les valeurs de l'urée chez les rats ont indiqué une diminution significative au niveau des lots 5 et 6 chez les mâles, et au niveau des lots 4, et 6 chez les femelles, comparativement à leurs témoins respectifs.

Les valeurs trouvées pour l'ALAT (pas représentées dans les tableaux) sont aberrantes et cela aurait dû à la rupture de la chaîne de froid dans la conservation du réactif (kit de dosage).

IV.2.3 Effet sur la teneur urinaire en protéines et glucose

L'analyse des urines des rats effectuée chaque semaine, au cours des bilans nutritionnels (90 jours), pour la recherche du glucose et des protéines exprimés en g/l, n'a montré aucune présence de ces éléments dans ce milieu biologique.

IV.2.4 Effet sur les paramètres hématologiques

L'effet des graines de *colei* ou de *saligna* (supplémentées à 20%, 35% ou 50% au régime standard des animaux), sur quelques paramètres hématologiques est présenté dans les tableaux VII et VIII. Les résultats obtenus chez l'ensemble des rats testés ont montré des différences significatives sur certains paramètres hématologiques comparés à leurs témoins.

Les variations sont observées, chez les mâles, au niveau de l'hémoglobine ($15,10 \pm 1,05$) au lot 2 et ($14,00 \pm 0,56$) au lot 6 et ($14,00 \pm 0,56$) au lot 7 contre ($16,93 \pm 0,45$) pour le lot témoin. Aussi de la teneur globulaire moyenne en hémoglobine ($17,57 \pm 0,32$) au lot 4 contre ($19,63 \pm 0,87$) pour le lot témoin, du nombre de globules rouges ($7,47 \pm 0,44$) et de l'hématocrite ($43,20 \pm 1,54$), au niveau du lot 7 contre ($8,64 \pm 0,17$) et ($51,43 \pm 3,95$) pour leurs témoins respectifs. Par contre chez les femelles, les variations sont observées au niveau du nombre de globules

blancs ($6,51 \pm 1,94$) et ($6,51 \pm 1,94$) respectivement aux lots 3 et 4 contre ($3,01 \pm 1,00$) pour leur témoin, et au niveau du volume globulaire moyen ($527,00 \pm 63,64$), ($62,90 \pm 1,55$) et ($63,63 \pm 1,72$) aux lots 5, 6 et 7 contre leur témoin ($57,00 \pm 0,96$).

Tableau VIII : Evaluation des paramètres hématologiques chez les rats traités avec de l'aliment complémenté avec des graines d'*Acacia colei*.

| MALES | | | | |
|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <i>Acacia colei</i> | Lot 1 : 0% (n=3) | Lot 2 : 20% (n=3) | Lot 3 : 35% (n=3) | Lot 4 : 50% (n=3) |
| GB (10³/ul) | 8,7 ± 2,28 | 9,41 ± 4,82 | 10,40 ± 3,40 | 6,96 ± 4,14 |
| GR (10³/ul) | 8,64 ± 0,17 | 8,18 ± 0,79 | 8,84 ± 0,47 | 9,14 ± 0,31 |
| HB (g/dL) | 16,93 ± 0,45 | 15,10 ± 1,05* | 16,65 ± 0,21 | 16,07 ± 0,57 |
| HCT (%) | 51,43 ± 3,95 | 46,90 ± 4,42 | 51,50 ± 3,82 | 50,57 ± 2,98 |
| VGM (fL) | 59,53 ± 4,04 | 57,43 ± 0,31 | 58,30 ± 1,27 | 55,30 ± 2,20 |
| CCMH (g/dL) | 33,07 ± 2,85 | 32,27 ± 1,35 | 32,30 ± 1,98 | 31,83 ± 0,83 |
| TGMH (pg) | 19,63 ± 0,87 | 18,50 ± 0,75 | 18,85 ± 0,78 | 17,57 ± 0,32* |
| FEMELLES | | | | |
| GB (10³/uL) | 3,01 ± 1,00 | 3,14 ± 1,15 | 6,51 ± 1,94* | 7,11 ± 0,36* |
| GR (10³/uL) | 6,70 ± 1,05 | 6,84 ± 3,34 | 7,00 ± 0,50 | 7,95 ± 0,49 |
| HB (g/dL) | 13,20 ± 2,25 | 12,57 ± 0,85 | 13,67 ± 0,76 | 15,53 ± 1,10 |
| HCT (%) | 38,20 ± 6,48 | 40,53 ± 0,51 | 41,50 ± 2,65 | 48,03 ± 4,16 |
| VGM (fL) | 57,00 ± 0,96 | 59,40 ± 3,10 | 59,40 ± 0,72 | 60,43 ± 2,26 |
| CCMH (g/dL) | 34,57 ± 2,11 | 31,07 ± 2,44 | 32,90 ± 0,26 | 32,30 ± 0,78 |
| TGMH (pg) | 19,67 ± 1,33 | 18,43 ± 1,55 | 19,50 ± 0,36 | 19,50 ± 0,87 |

*Différence statistiquement significative par rapport au groupe contrôle (p<0,05)

0% : Témoin ;

n = nombre de rats

Tableau IX : Evaluation des paramètres hématologiques chez les rats traités avec de l'aliment complémenté avec des graines d'*Acacia saligna*.

| MALES | | | | |
|-------------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| <i>Acacia saligna</i> | Lot 1 : 0% (n=3) | Lot 5 : 20% (n=3) | Lot 6 : 35% (n=3) | Lot 7 : 50% (n=3) |
| GB (10³/uL) | 8,7 ± 2,28 | 8,34 ± 1,58 | 4,02 ± 1,27 | 6,69 ± 1,65 |
| GR (10³/uL) | 8,64 ± 0,17 | 8,13 ± 0,53 | 7,47 ± 0,44* | 7,84 ± 0,09 |
| HB (g/dL) | 16,93 ± 0,45 | 15,57 ± 0,65 | 14,00 ± 0,56* | 14,63 ± 0,06* |
| HCT (%) | 51,43 ± 3,95 | 47,83 ± 1,96 | 43,20 ± 1,54* | 45,37 ± 1,32* |
| VGM (fL) | 59,53 ± 4,04 | 58,87 ± 1,40 | 57,90 ± 1,93 | 57,83 ± 2,25 |
| CCMH (g/dL) | 33,07 ± 2,85 | 32,50 ± 0,44 | 32,37 ± 0,40 | 32,27 ± 0,91 |
| TCMH (pg) | 19,63 ± 0,87 | 19,13 ± 0,46 | 18,77 ± 0,81 | 18,67 ± 0,23 |
| FEMELLES | | | | |
| GB (10³/uL) | 3,01 ± 1,00 | 4,85 ± 2,81 | 4,69 ± 1,02 | 4,17 ± 1,09 |
| GR (10³/uL) | 6,70 ± 1,05 | 7,11 ± 0,33 | 6,82 ± 0,25 | 6,96 ± 0,33 |
| HB (g/dL) | 13,20 ± 2,25 | 14,07 ± 0,98 | 13,83 ± 0,31 | 14,27 ± 0,84 |
| HCT (%) | 38,20 ± 6,48 | 44,00 ± 2,52 | 42,87 ± 0,55 | 44,33 ± 3,20 |
| VGM (fL) | 57,00 ± 0,96 | 61,87 ± 1,18* | 62,90 ± 1,55* | 63,63 ± 1,72* |
| CCMH (g/dL) | 34,57 ± 2,11 | 31,97 ± 0,68 | 32,30 ± 0,53 | 32,17 ± 0,85 |
| TCMH (pg) | 19,67 ± 1,33 | 19,80 ± 0,44 | 20,33 ± 0,55 | 20,43 ± 0,51 |

*Différence statistiquement significative par rapport au groupe contrôle (p < 0,05)

; 0% : Témoin ;

n = nombre de rats

V. DISCUSSION

L'objectif de ce travail était d'étudier la toxicité, chez les rats albinos de type *Wister* mâles et femelles, de deux espèces d'*Acacia* australien, *Acacia colei* et *Acacia saligna*, sur une période de 14 jours pour la toxicité aigüe et sur une période de 90 jours pour la toxicité subchronique.

En effet les graines de ces deux espèces sont considérées comme sources importantes pour améliorer la sécurité alimentaire dans les régions semi-aride d'Afrique. Toutefois l'acide djenkolique, substance néphrotique et anti-nutritive (0,49% chez l'*A.colei* et 1,9% chez l'*A.saligna*), semble limiter la consommation de ces graines, d'où la nécessité de les traiter, par cuisson ou par grillage, pour minimiser le taux de ce toxique. (Boughton et al, 2012)

Les doses, 70% et 90% des graines d'*A.saligna* à l'état cru et grillé supplémentées au régime standard des rats, utilisés pour la toxicité aiguë (par le biais de la DL50) n'ont entraîné aucune mortalité et aucun effet cliniquement observable. Aucun autre changement n'a été observé sur tout le reste de la durée d'observation, ni aucune diminution de la prise de poids.

Ces résultats suggèrent donc que les graines d'*A.saligna*, supplémentées au régime normal, à la dose limite testée, ne présentent pratiquement pas de risques pour la santé en administration per os à de fortes doses ou tout au moins en cas de surconsommation de ces graines. Ces résultats sont semblables à ceux de Yates et al (2014), qui ont montré que les régimes supplémentés avec des graines d'*Acacia saligna* grillées, à 10%, 30%, 50%, 70% et 60%, ne présentent aucune toxicité.

Pour identifier les risques pour la santé humaine d'une exposition répétée à la nourriture supplémentée par des graines grillées d'*Acacia colei* et d'*Acacia saligna*, un test de toxicité subchronique a été réalisé chez le rat. Lors de l'exposition répétée des aliments traités aux animaux, aux doses 20%, 35%, et

50% pendant 90 jours, tous les 42 animaux (témoins et tests), initialement sélectionnés pour l'étude de la toxicité subchronique des graines de *colei* et de *saligna*, ont survécu et n'ont montré aucun signe clinique durant toute la période d'observation.

Les résultats obtenus pour cette étude n'ont montré aucune influence sur l'évolution du poids corporel des animaux, donc une croissance pondérale normale avec un gain moyen quotidien normal durant toutes les semaines d'observation. Nos résultats sont à peu près en accord avec d'autres travaux antérieurs de Yetes et al. (2014) après l'évaluation de la toxicité de l'acide djenkolique dans les graines de *colei* et de *saligna* complémentées, à 30% et à 60%, au régime normale des rats.

Les paramètres biochimiques sont aussi analysés chez les rats afin de déterminer l'effet de ces graines sur le métabolisme au cours de l'alimentation. L'urée, la créatinine, le glucose (urinaire) et les protéines constituent d'excellents marqueurs de la fonction rénale, leur augmentation, leur diminution ou même leur présence (cas du glucose dans les urines) reflète un dysfonctionnement rénal. Les transaminases (ASAT et ALAT) et la phosphatase alcaline (PAL), déterminées dans le sérum ou le plasma, sont aussi des indicateurs sensibles des dommages hépatocellulaire (Chapatwala et al, 1982). Elles sont des enzymes ayant une activité métabolique importante à l'intérieur des cellules. Leur augmentation sérique reflète une lésion cellulaire, en particulier au niveau hépatique (Kew, 2000).

Nos résultats ont montré que l'enrichissement du régime standard des animaux par des graines d'*Acacia colei* ou d'*Acacia saligna*, à 20%, 35% ou 50%, n'a pas provoqué de différence significative des paramètres biochimiques sériques (créatinine, ASAT, PAL) et urinaires (glucose, protéines) dosés chez les rats de test comparativement au lot témoin. Les valeurs obtenues pour l'urée ont révélé

que les doses 20% et 35% d'*Acacia saligna* induiraient une diminution significative de ce paramètre chez les mâles comparés au lot témoin. Chez les femelles, les doses 50% d'*Acacia colei* et 35% d'*Acacia saligna* ont induit une diminution significative de l'urée par rapport au témoin. Par ailleurs, le métabolisme glucidique a révélé, pour la glycémie, une augmentation significative ($p < 0,05$) chez les femelles pour les doses de 20% et de 50% de *saligna*.

Le système hématopoïétique est parmi les cibles les plus sensibles des toxiques, ce qui fait des affections de ce système un bon indice de toxicité d'une substance, comme l'est la diminution du poids corporel (Adeneye et al, 2006). Selon les résultats d'analyse de l'hémogramme, les graines d'*Acacia* complémentées à l'aliment de base des rats n'ont pas entraîné de modification significative particulière des paramètres hématologiques évalués chez tous les animaux testés comparativement à leurs témoins. Toutefois, chez les mâles, une augmentation significative de l'hématocrite et de l'hémoglobine aux doses de 35% et 50% d'*Acacia saligna*, a pu être constatée.

Chez les femelles, un accroissement significatif du volume globulaire moyen (aux doses 20%, 35% et 50% d'*Acacia saligna*) a été observé, des résultats un peu similaires ont été signalés par Diker et al, (2006) chez une personne hospitalisée après avoir consommé du thé à base de *Datura*.

CONCLUSION

L'objectif de ce travail de recherche était de montrer la pertinence d'utilisation des graines d'*Acacia colei* et d'*Acacia saligna*, espèces australiennes, dans l'alimentation humaine. Il était question alors de faire des tests de toxicité de ces graines afin de déterminer leur sécurité en tant qu'aliment.

Les tests de toxicité aigüe (14 jours) et subchronique (90 jours) de ces graines, n'ont entraîné aucune mort et aucun signe clinique d'intoxication lié à la consommation d'aliments supplémentés par des graines de *saligna* crues ou grillées. Tous les paramètres mesurés, que ça soit les paramètres biochimiques, hématologiques ou pondéraux, n'ont pas, pratiquement, révélé de danger à la consommation de ces graines.

Ces résultats semblent être en faveur de l'utilisation des graines d'*Acacia colei* et d'*Acacia saligna*, surtout dans les pays semi-aride d'Afrique, pour améliorer la sécurité alimentaire. Cependant d'autres travaux tels qu'une enquête épidémiologique permettant de mettre en relation le mode de consommation de ces graines et le risque de développer certaines pathologies, la recherche de biomarqueurs d'effet spécifiques à l'acide djenkolique méritent d'être menés à l'effet de confirmer leur caractère relativement sans risque toxique à la consommation.

BIBLIOGRAPHIE

Adeneye, A. A.; Ajagbonna, O. P.; Adeleke, T. I.; Bello, S. O. (2006). Preliminary toxicity and phytochemical studies of the stem bark aqueous extract of *Musanga cecropioides* in rats. *J. Ethnopharmacol.*, 105: 374-379.

Adewusi, S.R.A., Falade, O. S. and Harwood, C. (2003). Chemical composition of *Acacia colei* and *Acacia tumida* seeds-potential food sources in the semi arid topics. *Food Chemistry*; 80(2):187-195.).

Areekul S , Kirdudom P , Chaovanapracha K Studies on djenkol bean poisoning (djenkolism) in experimental animals.The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health [01 Dec 1976, 7(4):551-558]

Boughton, B., Reddy, P., Boland, M., Roessner, U., Yates (2012) P. In Press. Ddjenkolic acid in acacia seed and processing methods to minimise toxicity. *Food and Chemical Toxicology*.

Brand, J. and Maggiore, P. (1992). The nutritional composition of Australian Acacia seeds. In: House, A.P.N. and Harwood, C.E. (eds), Australian dry-zone acacias for human food, pp. 54-67. Australian Tree Seed Centre, Canberra.

Carruthers J., Robin L., Hattingh J., Kull C., Rangan H., Van Wilgen B. W., 2011. A native at home and abroad: the history, politics, ethics and aesthetics of Acacia. *Diversity and Distributions*, 17: 810-821.

Chapatwala K.D, Boykin M.A, Rajanna B (1982). Effects of intraperitoneally injected cadmium on renal and hepatic glycogenic enzymes in rats. *Drug Chem. Toxicol.* 5 :305-317.

FAO 1980. Gi Ressource Genetique d'Essence Arborées des zones Arides et semis-Aride.

George, A.S. (1971), The plants seen and collected in north-western Australia by William Dampier, *W. Austral. Naturalist* 11: 173–178.

Featherby, T and Yates, P., Forthcoming. (2014). An in-vivo assessment of sub-acute toxic effects of the seed of four species of Acacia seed with a comparison to similar levels of synthetic djenkolic acid. *Food and Chemical Toxicology*.

Ghouila H, Meksi N, Haddar W, Mhenni MF, Jannet HB. Extraction, identification and dyeing studies of isosalipurposide a natural chalcone dye from *Acacia cyanophylla* flowers on wool. *Ind Crops Prod*. 2012;35:31–36.

Harwood, C. (1994), Human food potential of the seeds of some Australian dry-zone *Acacia* species, *J. Arid Environm.* 27: 27–35.

Harwood, C., Rinaudo, T. and Adewusi, S. (1999). Developing Australian Acacia seeds as human food for the Sahel. *Unasylva*, 50(196):57-64.

<http://worldwidewattle.com/infogallery/utilisation/summary.php>;
consulté le 08/12/2017

<https://www.australia-australie.com/articles/les-plantes-natives-australiennes/>;
consulté le 08/12/2017

Kaplan A et al., 1984. Aspartate aminotransferase. Clin Chem The VC Mosby Co.St Louis. Toronto. Princeton.1112-116.

Kew M.C., Serum aminotransférase concentration as evidence of hepatocellular damage, Lancet, 2000 ; 355: 591-592.

Lapointe, G. (2004). Notion de Toxicologie. Commission de la santé et de la sécurité du Travail de Québec, Québec. 67p.

Maslin B.R., Tomson, L.A.J., McDonland, M.W, Homilton, B, S. (1998). Edible Wattle Seeds of Southern Australia. A review of species for use in Semi arid region. CSIRO Forestry and Forest products- Western Australia Department of conservation and land management (CALM), CSIRO Publishing.).

OCDE. (2006). Toxicité orale aiguë - Méthode par classe de toxicité aiguë. In *Lignes directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques* Vol 1, number 4, pp 1-14. OCDE, Paris.

OCDE. (2008a). Étude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs. In *Lignes directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques* Vol 1, number 4, pp 1-14. OCDE, Paris.

OCDE. (2008b). Toxicité orale aiguë - Méthode de l'ajustement des doses. In *Lignes directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques* Vol 1, number 4, pp 1-29. OCDE, Paris.

Olivier J. A. (1986). Opportunities for using fewer anomalies in acute toxicity studies. In Chemical Testing and animal welfare (The National Chemicals Inspectorate), pp 119-142. Solna, Sweden.

Poynton R. J., 2009. Tree planting in southern Africa. Vol. 3. Other genera. Pretoria, Afrique du Sud, Department of Agriculture, Forestry and Fisheries.

Shumuye B, Yayneshet T (2011). Effect of feeding treated Acacia Saligna (Labill.) H.L. Wendl. leaves on growth performance and digestibility in goats. *J. Dryland Agric.* 4(2):341-347.

Thompson, L., Harwood, C., & Rinaudo, A. (1996). Australian Acacias: Untapped genetic resources for human food production in dry tropical sub-Saharan Africa. *Forest Genetic Resources*.

Trevan, J.(1927). The error of determination off toxicity. *Proc. Roy. Soc.*, 101B : 483-514.

UNESCO ; Les Plantes médicinales des régions arides ;Arid zone research ;Vol :13 ; 1960

Van Veen, G., & Hyman, A. (1933). On the toxic component of the djenkol bean.

Vincent du Vigneaud and Wilbur I. Patterson .the synthesis of djenkolic acid. *J. Biol. Chem.* 1936, 114:533-538.

Yates, P. 2014. Australian Acacias for food security in semi-arid Africa: A multidisciplinary assessment. Doctorate in Tropical Environmental Management, Charles Darwin University.