

**Profilage phytochimique par chromatographie sur couche mince haute performance d'extraits de flavonoïdes totaux du Drepanoalpa® et évaluation de leur activité anti-drépanocytaire *in vitro***  
***In vitro evaluation of anti-sickling activity of crude flavonoid extracted from Drepanoalpa® and their phytochemical profiling by high performance thin layer chromatography***

Benjamin Zoawe Gbolo<sup>1</sup>, Bobette Nkongolo Ciala<sup>1</sup>, Jean-Paul Koto-Te-Nyiwa Ngbolua<sup>1</sup>, Damien Sha-Tshibey Tshibangu<sup>2</sup>, Dorothée Dinangayi Tshilanda<sup>2</sup>, Patrick Bondo Memvanga<sup>3</sup>, Pius Tshimankinda Mpiana<sup>2</sup>

**Correspondance**

Jean-Paul Koto-Te-Nyiwa Ngbolua, Ph D

Courriel : jpngbolua@unikin.ac.cd

ORCID ID : 0000-0002-0066-8153

Téléphone : (+243) 81 68 79 527

Département des Sciences de la Vie, Faculté des Sciences & Technologies, Université des Kinshasa, B.P. 190, Kinshasa XI, République démocratique du Congo

**Summary**

*Context and objective.* The most important challenge in Sickle cell disease is to improve the health status of patients in developing countries. One of the best solutions is the development of phytomedicine based on the knowledge of the traditional pharmacopoeia. This study aimed to evaluate the anti-sickling activities of crude flavonoids extracted from the phytomedicine Drepanoalpa® on the one hand and to determine their chemical profiling by high performance thin layer chromatography on the other hand. *Methods.* Crude flavonoids were obtained by fractionation of the methanolic extract by flash chromatography (PURIFLASH COLUMN 30 SILICA HP - 12.0 g) and purified using a cartridge (Polymeric Reversed Phase) then characterized and assayed by high performance thin layer chromatography (HPTLC). The anti-sickling activity was carried out using Emmel, polymerization, Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> ratio, hemolysis and membrane osmotic fragility tests. *Results.* Drepanoalpa® powder contained an amount of total flavonoids of 8.14 mg quercetin eq/g extract. The total flavonoids extracted from Drepanoalpa® have an antisickling activity (with a maximum reversibility rate of about 90% and a minimum reversibility concentration of 11.4 µg/mL), an increase rate of the Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> ratio of 97.0%, an antihemolytic activity with a corpuscular membrane fragility of erythrocytes (FCM) of 0.73 and a polymerization inhibition rate of 77.5%. *Conclusion.* Findings from the present study confirm flavonoids as a phytomarker

**Résumé**

*Contexte et objectif.* Le défi le plus important dans la drépanocytose consiste à améliorer l'état de santé des patients dans les pays en développement. L'une des meilleures solutions est donc le développement de la phytomédecine basée sur la connaissance de la pharmacopée traditionnelle. L'objectif de la présente étude était d'évaluer les activités anti-drépanocytaires des flavonoïdes totaux extraits du phytomédicament Drepanoalpa® d'une part et déterminer leur profilage chimique par chromatographie sur couche mince haute performance d'autre part. *Méthodes.* Les flavonoïdes totaux ont été obtenus par fractionnement de l'extrait méthanolique par chromatographie flash (PURIFLASH COLUMN 30 SILICA HP - 12,0 g) et purifiés à l'aide d'une cartouche (Polymeric Reversed Phase) puis caractérisés et dosés par chromatographie sur couche mince haute performance (CCMHP). L'activité anti-drépanocytaire a été mise en évidence grâce aux tests d'Emmel, de polymérisation, de rapport Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>, d'hémolyse et de la fragilité osmotique membranaire. *Résultats.* La poudre du Drepanoalpa® contenait une quantité de flavonoïdes totaux de 8,14 mg équivalent de quercétine/g d'extrait. Les flavonoïdes totaux extraits du Drepanoalpa® possèdent une activité antifalcémiant (avec le taux maximal de normalisation d'environ 90 % et une concentration minimale de normalisations de 11,4 µg/mL), un taux d'augmentation du rapport Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> de 97,0 %, une activité anti-hémolytique avec une fragilité corpusculaire membranaire des érythrocytes (FCM) de 0,73 et un taux d'inhibition de la polymérisation de 77,5%. *Conclusion.* La pertinence des résultats de cette étude permet de confirmer les flavonoïdes comme phytomarqueur pour le contrôle de qualité et de standardisation de cet alicament.

**Mots-clés :** Drépanocytose, Hémoglobine S, Polymérisation, Méthémoglobine, Flavonoïdes

Reçu le 31 mai 2022

Accepté le 17 septembre 2022

**Introduction**

La drépanocytose est l'une des maladies génétiques à transmission autosomique récessive induites par des mutations des gènes codant pour la synthèse de l'hémoglobine (1). Cette anémie à cellules falciformes est due à une mutation ponctuelle dans le gène codant pour sa chaîne bêta (2) entraînant la substitution de l'acide glutamique par la valine conduisant ainsi à la



for the quality control and standardization of Drépanoalpha®.

**Keywords:** Drépanoalpha®, Sickle cell disease, Hemoglobin S, Polymerization, Methemoglobin, Flavonoids

<https://dx.doi.org/10.4314/aamed.v16i1.3>

Received: May 31th, 2022

Accepted: September 17th, 2022

1 Département des Sciences de la Vie, Faculté des Sciences & Technologies, Université des Kinshasa, B.P. 190, Kinshasa XI, République démocratique du Congo

2 Département de Chimie & Industries, Faculté des Sciences & Technologies, Université de Kinshasa, B.P. 190, Kinshasa XI, République démocratique du Congo

3 Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Université de Kinshasa, B.P. 212, Kinshasa XI, République démocratique du Congo

En République démocratique du Congo (RDC) comme dans beaucoup de pays de l'Afrique Sub-saharienne l'accès aux soins classiques appropriés est un problème majeur pour les habitants vivants dans les zones rurales à cause de la pauvreté. L'une des meilleures solutions pour ces populations est le développement de la phytothérapie basée sur la connaissance de la pharmacopée traditionnelle (10). C'est notamment le cas de Drepanoalpha®, un médicament traditionnel amélioré (MTA) appartenant à la classe thérapeutique des anti-drépanocytaires. C'est un mélange 50-50 (p/p) de poudre des feuilles de deux plantes alimentaires, *Justicia secunda* Vahl (Acanthaceae ; Herbar MNHN-P-P00719831) et *Moringa oleifera* Lam (Moringaceae ; Herbar MNHN-P-P05401821). Il se présente sous forme de poudre dans un sachet de 100 g. Sa formulation est basée sur les résultats de bioguidage où les plantes les plus actives *in vitro* ont été sélectionnées. Ce remède amélioré à base des plantes médicinales alimentaires de la RDC, a une posologie quantifiée. Par ailleurs son efficacité est scientifiquement confirmée aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* et ses limites de toxicité ont été déterminées confirmant ainsi son innocuité (5,11–14).

synthèse d'hémoglobine S (HbS) au lieu de l'hémoglobine normale (HbA) (3-4). Dans leurs formes oxygénées, l'HbA et l'HbS ont la même solubilité mais, dans leurs formes désoxygénées, la solubilité de l'HbA diminue de moitié alors que celle de l'HbS diminue de 50 fois, ce qui entraîne sa précipitation et sa polymérisation intracellulaire modifiant ainsi la structure des globules rouges qui prennent une "forme de faucille". Ces drépanocytes ont tendance à se lyser mais aussi à s'agréger et à obstruer les petits vaisseaux sanguins, entraînant des complications majeures (5-6).

Le défi le plus important dans cette maladie consiste à ce jour à améliorer l'état de santé des patients dans les pays en développement. L'aspect principal de la prise en charge globale des patients est l'intervention précoce en cas de problèmes évitables, grâce à des médicaments contre la douleur, des antibiotiques, une alimentation, une supplémentation en acide folique et un apport élevé en liquides (7–9).

Le phytomédicament Drepanoalpha® est administré à une dose choisie en fonction de l'âge des patients de sorte que de (6 mois à 2 ans, ½ cuillère à café ; 3 à 8 ans, 1 cuillère à café ; 9 à 10 ans, 1,5 cuillères à café ; adultes, 2 cuillères à café) de poudre est infusée dans environ 80 mL d'eau bouillante, que l'on couvre hermétiquement et que l'on remue de temps en temps pendant 20 min avant de la filtrer ; 60 mL de cette solution sont administrés par voie orale en deux prises (2 × 30 mL ) par jour. Les travaux de (5) sur la composition chimique et biochimique des extraits à l'acétate d'éthyle, au MeOH et à l'éther de pétrole du Drepanoalpha® ont révélé la présence de nombreux métabolites secondaires et nutriments notamment les polyphénols totaux dont les flavonoïdes et les anthocyanes. Ces travaux attribuent l'activité pharmacologique *in vitro* de ce MTA aux polyphénols.

Dans la présente étude, notre choix a porté sur les polyphénols dont les flavonoïdes car la production excessive de radicaux libres et la peroxydation lipidique *in vivo* sont connues pour être à l'origine de nombreux types de maladies comme le cancer, le diabète sucré, l'inflammation, plusieurs maladies dégénératives chez l'homme et la drépanocytose (15). Ces

derniers se révèlent être de puissants piègeurs de radicaux libres, des antioxydants, des agents anti-inflammatoires, anticarcinogènes, antidépresseurs et antifalcémiantes, mais les propriétés antioxydantes restent le principal sujet d'investigation de ces dernières années (16-17) alors que les propriétés antifalcémiantes sont de moins en moins exploitées. Ainsi donc, l'objectif de la présente étude était d'extraire et analyser au moyen de la chromatographie sur couche mince haute performance les flavonoïdes totaux contenus dans le phytomédicament Drépanoalpha® d'une part. D'autre part, l'étude a évalué leurs effets antifalcémiant, anti-hémolytique, leur taux de normalisation sur les globules rouges falciformes et a déduit le profil de polymérisation des hémoglobines S en tactoïdes et leurs effets sur le rapport  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$

## Méthodes

### *Produits chimiques et réactifs*

Le méthanol utilisé pour l'extraction des échantillons a été acheté chez VWR Chemicals et était de qualité analytique. Le méthanol employé lors des expériences d'isolement et de purification a été fourni par VWR Chemicals et était de qualité HPLC. L'éthanol absolu ( $\geq 99,8\%$ ), la méthyléthylcétone (98 %), l'acide formique (98 %) et l'acétate d'éthyle (98 %) étaient de qualité analytique et ont été fournis par Chem-Lab. L'eau ultra-pure a été obtenue à l'aide d'un système Purelab Flex (Veolia).

Tous les réactifs étaient de qualité analytique. Le diphénylborinate de 2-aminoéthyle (97 %), l'hydrate de quercétine ( $\geq 95\%$ ) ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich (Merck) ; le polyéthylène glycol 400 (PEG 400) (pour usage en laboratoire) a été obtenu auprès de VWR Chemicals. Une solution de 10 g/L d'ester 2-amino éthylique d'acide diphénylborique (réactif NP) et une solution de 50 g/L de PEG 400 ont été préparées dans du méthanol pour la détection des polyphénols.

### *Matériel végétal*

Le phytomédicament Drepanoalpha®, a été fourni par Research for Sustainable Development (RESUD, Kinshasa, RDC),

producteur et distributeur agréé du phytomédicament.

### *Le sang*

L'échantillon de sang d'hémoglobine S homozygote utilisé pour évaluer les activités antirépanocytaires a été obtenu auprès de patients drépanocytaires venus en consultation au "Centre de Médecine Mixte et d'Anémie SS", situé à la place Mangué, n°9, Quartier Yolo-Sud, dans la Commune de Kalamu, ville-Province de Kinshasa, en RDC. Pour être inclus dans l'étude, le sang devrait provenir des malades dont le statut drépanocytaire a été prouvé par la technique d'électrophorèse d'hémoglobine et n'ayant pas été transfusé dans les quatre mois qui précèdent la prise de sang. Tous les tests biologiques antirépanocytaires ont été effectués avec du sang fraîchement prélevé. Les échantillons ont été conservés dans un réfrigérateur à  $\pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La manipulation de ces échantillons de sang et le protocole utilisé a été approuvé par le Comité d'éthique et le Comité Scientifique de la Faculté de Médecine de l'Université de Kinshasa (Approbation N° : ESP/CE/237/2019 du 14 août 2019).

### *Contrôle de qualité botanique et physicochimique de la poudre*

#### *Examen macroscopique et microscopique*

L'examen macroscopique de la poudre des échantillons a porté sur la description des caractères organoleptiques tels que la couleur et l'odeur.

Quant à l'examen microscopique, 10 mg de la poudre ont été prélevés à l'aide d'une spatule et placés dans un verre de montre, puis la poudre a été triturée avec le réactif de Gadzet du Chatelier. Une petite quantité de ce mélange a été montée sur une lame de verre propre ensuite recouverte avec une lamelle. La préparation a été examinée au microscope optique (de marque OPTIKA) à l'objectif 40X puis un appareil photo numérique (marque LEICA ICC50 W) couplé à l'ordinateur a été utilisé pour enregistrer les images microscopiques des érythrocytes obtenus.

Densité de la poudre

Au moyen d'une balance analytique de précision (0,0001g) modèle (OHAUS) le récipient (pycnomètre) vide (P1) ensuite le pycnomètre rempli d'eau (P2) et enfin le pycnomètre rempli de la poudre (échantillon) (P3) ont été pesés ; la densité de la poudre a été déterminée selon la formule suivante :

$$d = \frac{P_3 - P_1}{P_2 - P_1}$$

Avec d = densité

#### *Extraction*

L'extrait sec (rapport poudre-extrait, 28,46/0,785) a été obtenu par percolation de 28,46 g de poudre de Drepanoalpha® dans 280 mL de MeOH, répartis dans 8 tubes Eppendorf de 50 mL puis extraits sous agitation à 3000 tpm pendant 10 minutes à l'aide d'un agitateur électrique (Retsch®, MM400, Retsch GmbH, Germany), et ensuite centrifugé à l'aide d'une centrifugeuse (Herolab Unicen MR, GmbH Laborgeräte, Germany) à 4000 g pendant 20 minutes. Les surnageants ont été récupérés et rassemblés puis filtrés sur ouate et sable dans une boule à décanter. L'extrait a été concentré au rotavapor (Büchi R-210) à 40 °C puis sécher à l'étuve (à 40 °C pendant 2 heures).

#### *Fractionnement de l'extrait brut et purification des flavonoïdes*

L'extrait méthanolique sec (785,2 mg) a été mélangé à du gel de silice (2,0 g), puis soumis à une chromatographie flash (PURIFLASH COLUMN 30 SILICA HP - 12,0 g) en utilisant Intrechim, Puriflash215. Un gradient binaire a été appliqué à un débit de 5 mL /min. La phase mobile était composée d'heptane (solvant A) et d'acétate d'éthyle+méthanol 1-7 (solvant B). Le programme de gradient était le suivant : A = 30%, B = 70% à t = 0 min ; A = 30%, B = 70% à t = 25 min ; A = 25%, B = 75% à t = 25 min 03 ; A = 25%, B = 75% à t = 30 min 03 ; A = 20%, B = 80% à t = 30 min 06 ; A = 20%, B = 80% à t = 35 min 06 ; A = 15%, B = 85% à t = 35 min 09 ; A = 15%, B = 85% à t = 40 min 09 ; A = 10%, B = 90% à t = 40 min 12 ; A = 10%, B = 90% à t = 45 min 12 ; A = 5%, B = 95% à t = 45 min 15 ;

A = 5%, B = 95% à t = 50 min 15 ; A = 0%, B = 100% à t = 50 min 18 ; A = 0%, B = 100% à t = 65 min. Un total de 18 fractions nommées C1-C18 ont été récupérées dont 7 retenues (C2-C8) compte tenu de leur profil et leur pic. Après concentration sous vide, les fractions ont été pesées et soumises au test au 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH°) en utilisant des tubes à essai (test de bioguidage : C3 et C4 étaient actifs), puis une chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée sur les fractions précédemment concentrées. Les fractions C3-C4 ont été regroupées (m=63,1 mg) et ont été mélangées avec du gel de silice et ont été soumises à une chromatographie flash (PURIFLASH COLUMN 30 SILICA HP - 4,0 g) en utilisant Intrechim, Puriflash215 et éluées avec un système de solvant à gradient comme suit : Acétate d'éthyle (Solvant A) ; Méthyléthylcétone (Solvant B) et mélange Isopropanol-eau 1:1 (Solvant D) à un débit de 5 mL/min pendant 140 minutes pour obtenir les sous-fractions nommées Sous Fraction C (SFC). Le programme de gradient était le suivant : A = 100%, B = 0%, D= 0% à t = 0 min ; A = 80%, B = 20%, D= 0% à t = 15 min ; A = 75%, B = 25%, D= 0% à t = 15 min 03 ; A = 0%, B = 100%, D= 0% à t = 40 min 52 ; A = 0%, B = 30%, D= 70% à t = 56 min 52 ; A = 0%, B = 30%, D= 70% à t = 100 min 53 ; A = 0%, B = 10%, D= 90% à t = 110 min 53 ; A = 0%, B = 0%, D= 100% à t = 120 min 53 ; A = 0%, B = 0%, D= 100% à t = 130 min 53 ; A = 60%, B = 30%, D= 10% à t = 135 min 53 ; A = 60%, B = 30%, D= 10% à t = 140 min 53. 29 sous-fractions ont été collectées mais 11 sous-fractions ont été retenues sur base des pics (SFC2-7, 16, 17, 19, 24 et 29). Après concentration sous vide, pesée et CCMHP, les sous-fractions SFC6 et SFC7 ont été regroupées (selon le profil de similarité sur CCMHP), concentrées, pesées (8,6 mg) et réfractionnées dans les mêmes conditions. 23 fractions ont été collectées et nommées Sous-Sous Fraction C (SSFC) mais seuls 3 fractions (SSFC1, 4 et 21) ont été retenues sur base leur pic d'absorption au signal LSD. Après CCMHP, la fraction SSFC4 (1,6 mg) a donné un profil intéressant mais avec

une bande de chlorophylle au-dessus. Elle a donc été récupérée et purifiée en utilisant une cartouche.

#### *Caractérisation des extraits/fractions par chromatographie sur couche mince haute performance (CCMHP)*

Les analyses CCMHP ont été réalisées sur des plaques CCMHP en verre silicagel 60 F254 (20 x 10 cm ; 0,20 mm ; Merck, Darmstadt, Allemagne). 5 µL de chaque concentration du standard ont été injectées en duplicata. Quant à l'échantillon, 15-25 µL des fractions, sous fractions et/ou sous-sous fraction (1mg/mL) ont été injectés sur la même plaque que le standard. Au total 13-20 dépôts sont appliqués à un taux de 150 nL/s sous forme de bande (9 mm de largeur) à l'aide d'un échantillonneur automatique CCM ATS4 (Camag, Muttenz, Suisse). La distance entre les pistes était de 12,4 mm, la distance du côté gauche de la plaque était de 20 mm et la distance du bord inférieur de la plaque était de 8 mm. Les plaques ont été développées dans une chambre de développement automatique ADC2 (Camag, Muttenz, Suisse) avec contrôle de l'humidité (10 min, 33 % d'humidité relative), préalablement saturée (20 min), en utilisant comme phase mobile acétate d'éthyle-méthyléthylcétone-acide formique-eau (60:30:5:5, v/v/v/v). La longueur de développement était de 70,2 mm et le temps de développement d'environ 12 min 5s. Après le développement, les plaques ont été séchées et la dérivation a été effectuée en utilisant un derivatisateur automatique en pulvérisant la plaque consécutivement avec 2 mL d'une solution de NP (Nozzle vert, niveau 3 suivie d'un chauffage à 100 °C pendant 3 min sur une plaque chauffante CCM) et de 2 mL de polyéthylèneglycol (PEG) (Nozzle bleu, niveau 2). Les plaques ont été photographiées immédiatement après la dérivation, en utilisant un système de visualisation (Camag, Muttenz, Suisse), sous UV à 366 nm et au visible.

#### *Analyse quantitative de Drepanoalpha® par CCMHP*

Afin d'estimer la concentration en équivalent de Quercétine prise comme standard pour les flavonoïdes dans l'échantillon du Drepanoalpha, cinq concentrations de quercétine (80, 160, 240, 320 et 400 µg/mL) ont été préparées ainsi qu'une concentration pour l'échantillon.

Les analyses CCMHP ont été réalisées comme décrites ci-haut. La méthode de mesure de la surface des pics a été utilisée. La courbe d'étalonnage CCMHP a été construite en traçant les surfaces des pics en fonction des concentrations de quercétine.

#### *Evaluation des activités anti-drépanocytaires in vitro*

##### Test d'hémolyse

Certains constituants des plantes tels que les saponines peuvent présenter un risque d'hémolyse pour les globules rouges. Nous avons à cet effet évalué l'hémolyse des globules rouges en mesurant l'absorbance à 540 nm après contact avec la solution des flavonoïdes totaux de Drepanoalpha®. Ainsi, les globules rouges dans le NaCl 0,9 % sont considérés comme 0% d'hémolyse (contrôle négatif), tandis que ceux dans l'eau distillée sont considérés comme une hémolyse à 100 % (contrôle positif).

De façon concrète, nous avons incubé 1,5 mL d'érythrocytes à 2,5 % en suspension dans du NaCl 0,9 % avec 1 mL de la solution des flavonoïdes totaux de Drepanoalpha® en suspension dans du NaCl 0,9 % (2 mg/mL) à 37 °C pendant 30 min, pour obtenir une concentration finale des extraits de flavonoïdes totaux de 1 mg/mL. Après centrifugation (380 g, 5 min), la teneur en hémoglobine dans le surnageant (triplicatas de 2 mL) a été mesurée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Jenway 7315, Laboratoires Humeau, France).

Les activités hémolytiques potentielles des drogues végétales sont examinées uniquement à la concentration élevée de 1 mg/mL. L'hémolyse a été quantifiée à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{hemolysis} = \frac{A_{\text{extrait}} - A_{\text{contrôle négatif}} (\text{NaCl } 0,9\%)}{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{contrôle négatif}}} \times 100$$

Ce test peut être recommandé comme indicateur principal de sélection et de confirmation dans le choix des extraits des plantes devant être utilisés pour la prise en charge de la drépanocytose. Ainsi donc, pour qu'un extrait soit pris en compte, son activité hémolytique devrait être inférieure ou égale à 5 % afin de ne pas introduire des biais dans les résultats attendus en modifiant la quantité des globules rouges lors des expérimentations.

#### *Induction et inhibition de la falciformation*

L'hypoxie et la falciformation sont créées en utilisant du  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  2 % et du vernis incolore. En bref, 950  $\mu\text{L}$  de sang total préalablement dilué sont mélangés à 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  2 % et homogénéisés. 5  $\mu\text{L}$  du mélange sont placés sur une lame et recouverts d'une lamelle couvre-objet, puis badigeonnés de vernis transparent. L'effet du  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  2 % sur la falciformation est observé par microscopie optique au temps zéro et au temps 60 minutes. Un appareil photo numérique (marque LEICA ICC50 W) couplé à l'ordinateur est utilisé pour enregistrer les images microscopiques des érythrocytes obtenus. Les cellules falciformes et les cellules totales sont comptées à partir de cinq champs microscopiques différents sur la lame. Le pourcentage de cellules falciformes est calculé à l'aide de la formule :

$$F(\%) = \frac{ND}{NT} \times 100$$

où F : pourcentage de cellules falciformes ; ND : nombre des drépanocytes et NT : nombre totale des globules rouges.

Ainsi, pour qu'un échantillon de sang soit pris en compte, le rapport doit être supérieur ou égale à  $80 \pm 5$  %.

La solution mère des extraits des flavonoïdes totaux de Drepanoalpha<sup>®</sup> utilisés lors de ces expérimentations sont préparées par dissolution de 5,5 mg de ces extraits dans 5,5 mL de l'eau physiologique.

L'effet de ces extraits sur la falciformation des globules rouges a été observé comme décrit ci-haut. Le pourcentage d'inhibition de la falciformation a été calculé à l'aide de la formule :

$$\% I = \frac{NT - ND}{NT} \times 100$$

où I est le pourcentage d'inhibition de la falciformation, ND : Nombre des drépanocytes et NT : Nombre Total des globules rouges.

#### *Détermination de la concentration minimale de normalisation (CMN)*

Pour la détermination de la CMN, nous avons ajouté à 990  $\mu\text{L}$  de sang drépanocytaire (GR SS) 10  $\mu\text{L}$  d'une solution de flavonoïdes totaux ou de Cromoglycate de sodium à différentes concentrations (10  $\mu\text{g/mL}$ -1000  $\mu\text{g/mL}$ ). L'expérience a été suivie comme mentionné ci-dessus. Le pourcentage d'inhibition de la falciformation a été calculé tant pour le témoin que pour chaque concentration et ce pourcentage a été déterminé de la même manière. Ces pourcentages ont permis de calculer le taux de normalisation de chaque concentration selon la formule suivante :

$$R(\%) = \frac{R_0 - R_n}{R_0} \times 100$$

(R) de « Reversibility » en anglais est le taux de normalisation (%), (R<sub>0</sub>) est le pourcentage initial d'inhibition de la falciformation (ou de normalisation) pour le témoin ou contrôle négatif et (R<sub>n</sub>) est le pourcentage maximum d'inhibition de la falciformation (ou de la normalisation) obtenu avec différentes concentrations de 10 à 1000  $\mu\text{g/mL}$

Les courbes dose-effet ont été obtenues à l'aide du logiciel Origin 6.1.

#### *Inhibition de la polymérisation de l'HbS*

La polymérisation a été évaluée en mélangeant 4,4 mL de métabisulfite de sodium à 2 % en tant qu'agent réducteur ou désoxygénant avec 0,5 mL de la solution physiologique (NaCl 0,9 %) ;

0,1 mL de la solution d'hémoglobine (préparé comme suit : la solution d'hématies lavés et dilués avec le NaCl 0,9 % a été centrifugé à 3000 tours par minute pendant 10 minutes. Le culot de globules rouges a été ensuite hémolysé avec de l'eau distillée, à 1: 2 (v/v) et incubé. Le mélange a ensuite été centrifugé à 3500 tours/minute pendant 5 minutes ; le culot constituant la membrane érythrocytaire et le surnageant, la solution d'hémoglobine ; ont été introduits dans la cuvette et insérés dans le spectrophotomètre puis la lecture a été effectué à 700 nm à un intervalle de 60 minutes pendant 240 minutes.

Pour la solution à tester, 0,5 mL de la solution physiologique (NaCl 0,9 %) a été remplacée par 0,5 mL de la solution des flavonoïdes totaux (100 µg/mL); l'eau distillée a été utilisée comme le blanc. Les taux de polymérisation ont été calculés ; le pourcentage relatif de polymérisation et le pourcentage relatif d'inhibition ont été déterminés par rapport au témoin ; ces paramètres ont tous été déterminés à partir de la formule ci-dessous (18) :

$$\text{Taux de polymérisation} = R_p = \frac{DO_f - DO_i}{t}$$

où = Taux de polymérisation, =Densité optique finale, = Densité optique initiale, t=temps.

Le taux d'inhibition de la polymérisation est estimé en calculant la tangente du graphique donnant la variation de l'absorbance dans le temps.

#### *Evaluation de la fragilité osmotique membranaire*

10µL des hématies lavées ont été diluées dans 1990µl d'une série des solutions hypotoniques tamponnées à différentes concentrations (0,2-0,8% de NaCl). 10µL des drogues végétales/Cromoglycate de sodium (contrôle positif) ou NaCl 0,9 % (témoin) ont ensuite été ajoutés au mélange.

L'effet des flavonoïdes totaux de Drepanoalpha® sur l'hémolyse dans chaque concentration a été

observé par microscopie optique au grossissement 40X. Un appareil photo numérique (marque LEICA ICC50 W) couplé à l'ordinateur est utilisé pour enregistrer les images microscopiques des érythrocytes obtenus. Les cellules totales ont été comptées à partir de cinq champs microscopiques au temps zéro et au temps 60 minutes. Le pourcentage d'hémolyse a été calculé à l'aide de la formule ci-dessous :

$$\% \text{hémolyse} = \frac{N_0 - N_{60}}{N_0} \times 100$$

où  $N_0$  est le nombre de globules rouges au temps  $t=0$  et  $N_{60}$  est le nombre de globules rouges au temps  $t=60$  minutes.

La fragilité corpusculaire membranaire (FCM) qui est la concentration en NaCl qui cause 50 % d'hémolyse des érythrocytes a été calculée sur base de l'analyse par régression linéaire des paires de concentration en NaCl-% hémolyse à l'aide du logiciel ORIGIN 6.1.

#### *Evaluation du rapport $Fe^{2+}/Fe^{3+}$*

Le culot de globules rouges a été hémolysé avec de l'eau distillée, dans un rapport 1 : 2 (v/v), et centrifugé (1500 g, 10 min). L'hémolysât a été incubé à température ambiante, en présence ou en absence des flavonoïdes bruts/cromoglycate disodique, et l'évolution des absorbances a été mesurée à 540 et 630 nm pour l'hémoglobine ( $Fe^{2+}$ ) et la méthémoglobine ( $Fe^{3+}$ ), respectivement, à l'aide d'un spectrophotomètre (Jenway 7315, Laboratoires Humeau, France).

La proportion de méthémoglobine a été calculée à chaque instant comme suit :

$$Fe^{3+} = \frac{(A_{630})^2}{(A_{540})^2 + (A_{630})^2} \times 100$$

où  $Fe^{3+}$ ,  $A_{630}$ ,  $A_{540}$  et  $A_{630}$  sont la proportion de méthémoglobine et les absorbances à 540 et 630 nm, respectivement.

Pour apprécier la cinétique de la réaction en présence ou en l'absence d'extrait, des courbes, - temps ont été obtenues en ajustant les données à l'équation suivante  $y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^p} + A_2$  en utilisant le logiciel Origin 8.5.



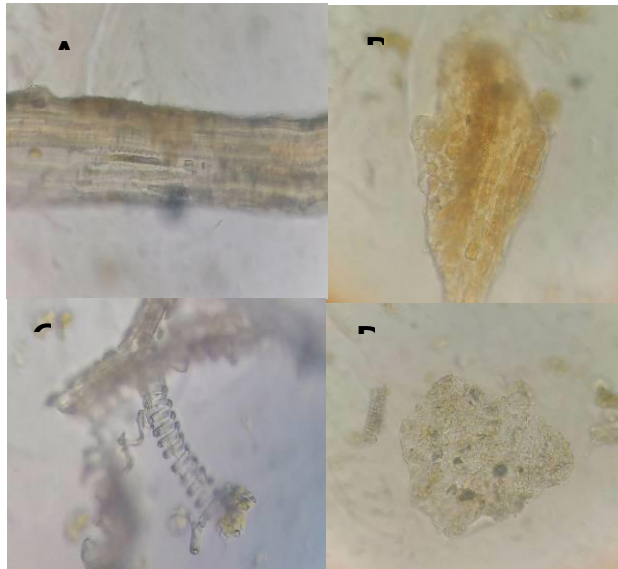
## Résultats

### Paramètres physicochimiques

Les analyses des caractères organoleptiques, la macroscopique dans la lumière visible et la densité de l'échantillon de poudre de Drepanoalpha® montre que ce phytomédicament a une couleur vert sombre, une odeur semblable au chromolaena odorata et une densité de 0,275.

### Caractéristiques microscopiques de la poudre du matériel végétal

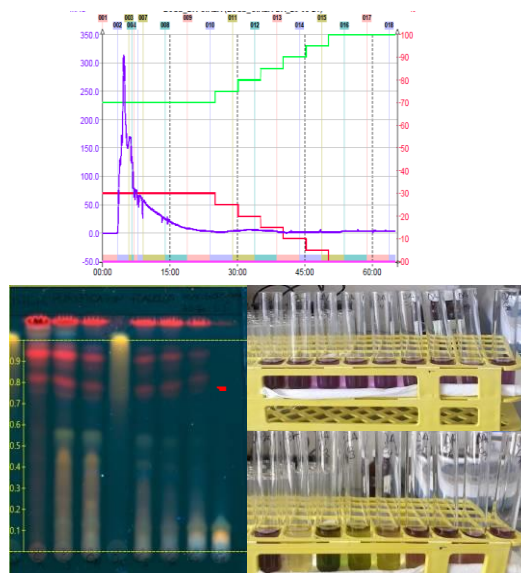
Les caractéristiques microscopiques de la poudre de Drepanoalpha® sont reprise sur la figure 1.



**Figure 1.** Caractéristiques microscopique de la poudre du Drepanoalpha®

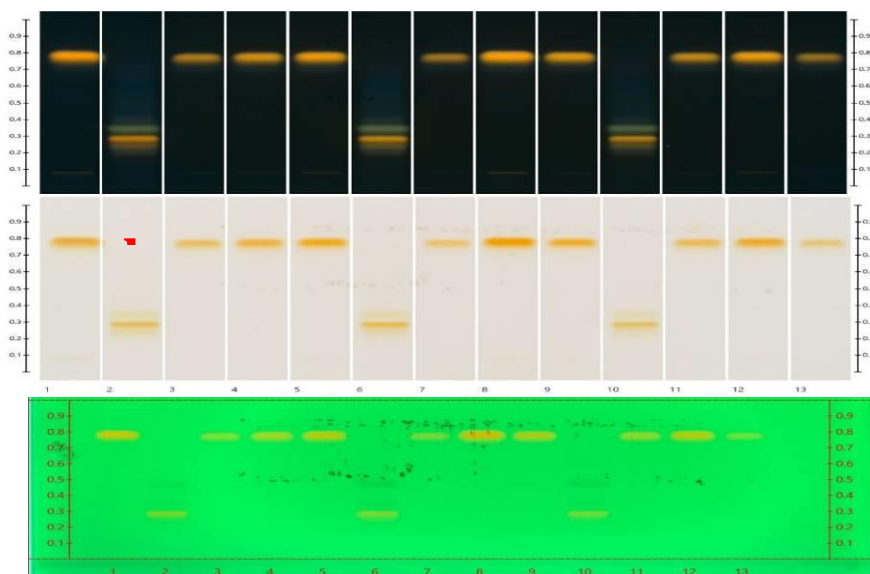
### Analyse qualitative de Drepanoalpha®

La figure 2 présente le chromatogramme flash, le profil CCM, les conditions d'éluion des fractions retenues ainsi que les chromatogrammes HPTLC de la sous-fraction 4 purifié.



**Figure 2.** Chromatogrammes flash (a), CCM (b) et analyse qualitative au radical DPPH° (c) des fractions de l'extrait méthanolique brut du Drepanoalpha®. Recherche des Flavonoides (Système d'éluion : AcOEt-MEK-AF-EAU 60/30/5/5 %/%%/%%/%% ; Révélateur : NP, PEG, UV-360 nm)





**Figure 3.** Empreintes CCMHP des flavonoïdes dans l'extrait de Drepanoalpha®. Tracks: 1-Quercétine 0,40 mg/mL, 2-SSFC4, 3- Quercétine 0,32 mg/mL, 4- Quercétine 0,24 mg/mL, 5- Quercétine 0,16 mg/mL, 6-SSFC4, 7- Quercétine 0,08 mg/mL, 8- Quercétine 0,40 mg/mL, 9- Quercétine 0,24 mg/mL, 10- SSFC4, 11- Quercétine 0,32 mg/mL, 12- Quercétine 0,16 mg/mL, 13- Quercétine 0,08 mg/mL. Phase mobile : MEK-AcOEt-AF-EAU 30/60/5/5 %/%/%/% ; Révélateur : NP (chauffage à 100 °C pendant 3 min), PEG, (a) UV-360 nm, (b) Visible, (c) UV-254 nm

#### Quantification des Flavonoïdes dans Drepanoalpha®

Les résultats de l'analyse quantitative de la poudre Drepanoalpha® sont repris dans le tableau 1.

**Tableau 1 : Teneur en Quercétine dans l'échantillon de Drepanoalpha® réalisée par CCMHP**

| Paramètres                           | Drepanoalpha® |               |             |
|--------------------------------------|---------------|---------------|-------------|
|                                      | Application 1 | Application 2 | Moyenne     |
| Volume injecté                       | 2 µL          | 5 µL          | 3,5 µL      |
| Concentration                        | 87,54 µg/MI   | 46,89 µg/mL   | 67,22 µg/mL |
| Coefficient de variation             | 42,76 %       |               |             |
| Quantité                             | 175,1 ng      | 234,5 ng      | 204,8 ng    |
| Qualité (en mg eq Querc/g d'extrait) | <b>8,14</b>   |               |             |

#### Évaluation des activités anti-drépanocytaires in vitro

Evaluation des effets hémolytiques des flavonoïdes totaux extraits du Drepanoalpha®

Les résultats des effets hémolytiques des extraits des flavonoïdes totaux de Drepanoalpha® sur les globules rouges sont repris dans le tableau 2.

**Tableau 2 : Effet hémolytique des flavonoïdes extraits de Drepanoalpha® et le cromoglycate de sodium**

| Extraits                                      | Absorbance (n=3) | % Hémolyse |
|---|------------------|------------|
| H <sub>2</sub> O distillée (contrôle positif) | 0,45 ± 0,2       | 100,0      |
| NaCl 0,9 % (contrôle négatif)                 | 0,003 ± 0,0      | 0,0        |
| Cromoglycate de sodium (Test positif)         | 0,012 ± 0,0      | 2,1        |
| Flavonoïdes totaux                            | 0,004 ± 0,0      | 0,1        |

Nos résultats montrent que l'activité hémolytique est faible pour ces deux extraits 0,1 % et 2,1 % pour les flavonoïdes totaux et le cromoglycate de sodium respectivement. A cet effet, l'hémolyse survenue

lors de l'exposition au cromoglycate de sodium (2,1 %) peut être considérée comme négligeable. Ainsi, ces deux extraits peuvent être appliqués aux globules rouges sans induire de biais dans le test, c'est-à-dire sans modifier la quantité des globules rouges au fond des tubes pour le même hématocrite.

#### Activité antifalcémiant

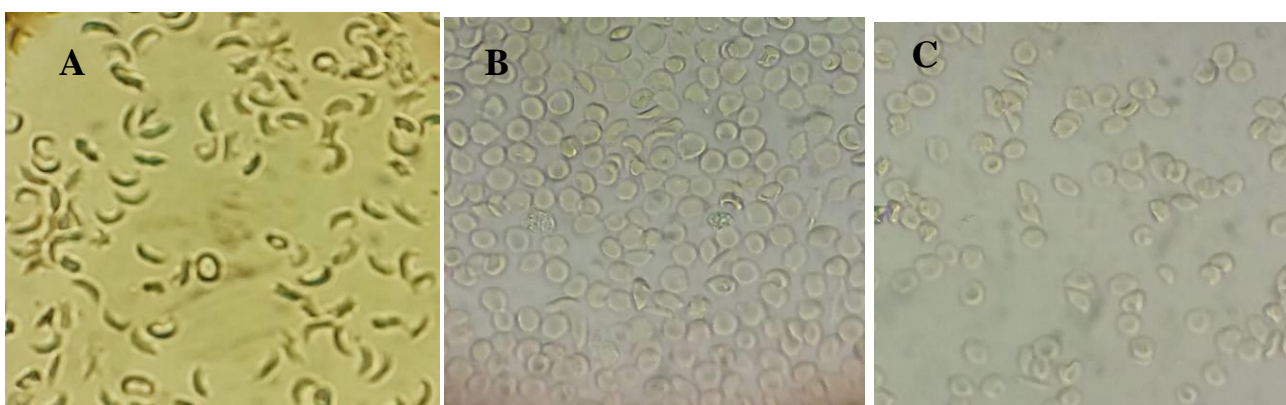
Les figures 4 ci-dessous donnent les micrographies phénotypiques des drépanocytes non traités (témoin) et traités avec le Cromoglycate de sodium et les flavonoïdes totaux extraits du Drepanoalpha® dans les mêmes conditions (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 2%).

| Extraits                                      | Absorbance (n=3) | % Hémolyse |
|---|------------------|------------|
| H <sub>2</sub> O distillée (contrôle positif) | 0,45 ± 0,2       | 100,0      |
| NaCl 0,9 % (contrôle négatif)                 | 0,003 ± 0,0      | 0,0        |
| Cromoglycate de sodium (Test positif)         | 0,012 ± 0,0      | 2,1        |
| Flavonoïdes totaux                            | 0,004 ± 0,0      | 0,1        |

Nos résultats montrent que l'activité hémolytique est faible pour ces deux extraits 0,1 % et 2,1 % pour les flavonoïdes totaux et le cromoglycate de sodium respectivement. A cet effet, l'hémolyse survenue lors de l'exposition au cromoglycate de sodium (2,1 %) peut être considérée comme négligeable. Ainsi, ces deux extraits peuvent être appliqués aux globules rouges sans induire de biais dans le test, c'est-à-dire sans modifier la quantité des globules rouges au fond des tubes pour le même hématocrite.

#### Activité antifalcémiant

Les figures 4 ci-dessous donnent les micrographies phénotypiques des drépanocytes non traités (témoin) et traités avec le Cromoglycate de sodium et les flavonoïdes totaux extraits du Drepanoalpha® dans les mêmes conditions (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 2%).

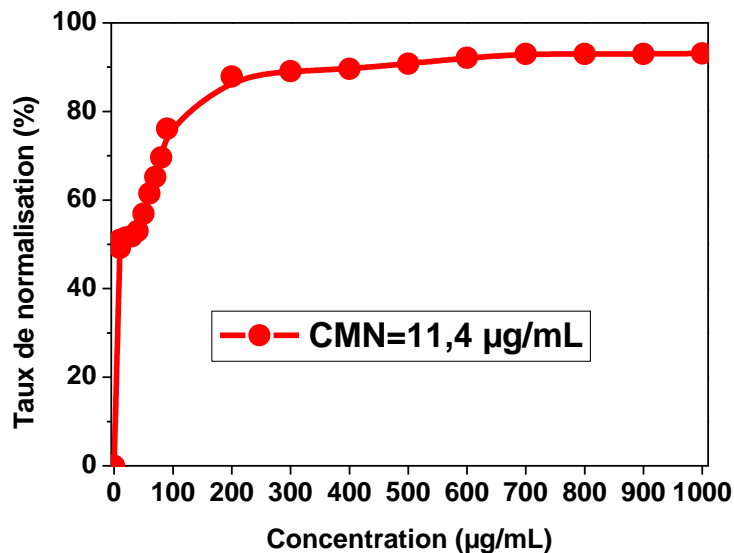


**Figure 4.** Micrographie phénotypique des drépanocytes (A) non traités (NaCl 0,9%), et traités respectivement avec flavonoïdes totaux extraits du Drepanoalpha® (B : 100µg/mL) et le Cromoglycate de sodium (C : 250 µg/mL).

La figure 4A montre que la majorité des globules rouges sont falciformes cela confirme la nature du sang SS utilisé. Mais lorsque le cromoglycate de sodium (contrôle positif, Figure 4B) ou les extraits de flavonoïdes (figure 4 C) sont ajoutés, les GRs présente une forme circulaire (biconcave) et normale.

#### Détermination de la concentration minimale de Normalisation

La figure 5 ci-après donne l'évolution du taux de normalisation des érythrocytes SS en fonction des concentrations des flavonoïdes totaux extraits du Drepanoalpha®.



**Figure 5.** Evolution du taux de normalisation des érythrocytes en fonction de différentes concentrations des flavonoïdes totaux extraits du Drepanoalpha®

Il ressort de cette figure 5 que le taux de normalisation des drépanocytes en condition hypoxique augmente avec la concentration en flavonoïdes totaux jusqu'à atteindre le seuil maximum au-dessus duquel ce taux de normalisation reste constant quelle que soit l'augmentation de la concentration.

Le taux maximal de normalisation (TN max) et la concentration en extrait pour laquelle 50 % des drépanocytes sont normalisés (ED50) ont été évalués par régression non linéaire grâce au logiciel ORIGIN 6.1.

Il faut noter que les flavonoïdes extraits du Drepanoalpha® ont présenté un taux TN max au-delà de 85 % et une CMN largement inférieure à 100 µg/mL. Ceci montre que l'activité antidrépanocytaire de ce phytomédicament serait due entre autres à la présence de ces polyphénols qui ont déjà prouvé leur activité antifalcémiant par Lukyamuzi *et al.* (16).

#### Profil d'inhibition de la polymérisation de l'hémoglobine drépanocytaire

Le tableau 3 ci-après donne le profil d'inhibition de polymérisation des drépanocytes

**Tableau 3: Taux de polymérisation de l'HbS et son inhibition par les flavonoïdes extraits de Drepanoalpha® et le cromoglycate de sodium** (n = 3 réplicats techniques)

| Extraits                                    | Taux de polymérisation | % Relatif de polymérisation | de % Relatif d'Inhibition |
|---|------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| Contrôle négatif                            | 0,67 ± 0,4             | 100 ± 0,0                   | 0,0 ± 0,0                 |
| Cromoglycate de sodium de sodium (250µg/mL) | 0,15 ± 0,2             | 22,5 ± 0,3                  | 77,5 ± 0,7                |
| Flavonoïdes totaux C (100µg/mL)             | 0,15 ± 0,7             | 22,5 ± 1,0                  | 77,5 ± 0,0                |

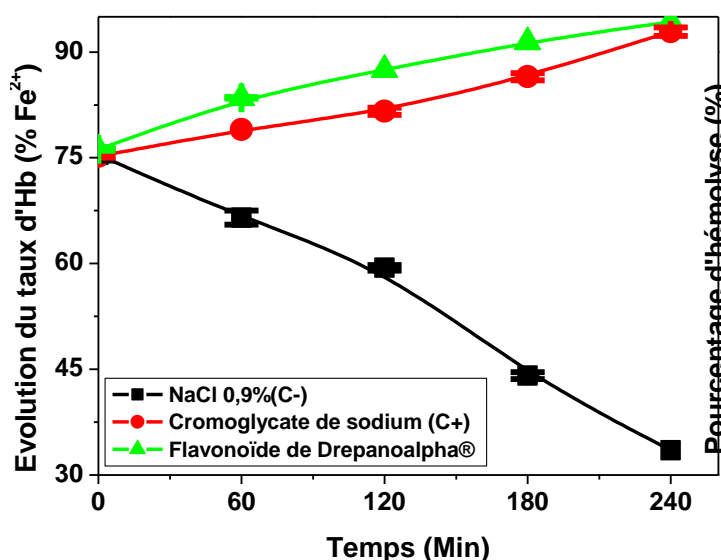
Il découle du tableau 3 ci-dessus, que les flavonoïdes extraits du Drepanoalpha® (100µg/mL) réduisent sensiblement la polymérisation d'hémoglobine drépanocytaire avec un taux d'inhibition de 75,5 % identique à celui du cromoglycate de sodium (témoin positif : 75,5%).

#### Evaluation du rapport $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ dans les hémoglobines S *in vitro*

La figure 6 et le tableau 4 présentent la modulation de la formation de méthémoglobine en présence les flavonoïdes totaux extraits de Drepanoalpha® et de cromoglycate de sodium

**Tableau 4 : Modulation de la formation de méthémoglobine en présence des flavonoïdes totaux extraits de Drepanoalpha® et de cromoglycate de sodium (moyenne ± SD ; n = 3 réplicats techniques)**

| Echantillon                        | % Hb (Fe <sup>2+</sup> ) | % MétHb (Fe <sup>3+</sup> ) | Fe <sup>2+</sup> /Fe <sup>3+</sup> | % d'augmentation |
|------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|------------------------------------|------------------|
| Contrôle Négatif                   | 33,5 ± 0,0               | 66,5 ± 1,0                  | 0,50 ± 0,0                         | 0,0 ± 0,0        |
| Cromoglycate de sodium (250 µg/mL) | 92,9 ± 0,6               | 7,1 ± 0,6                   | 13,1 ± 1,5                         | 96,1 ± 1,0       |
| Flavonoïdes totaux (100 µg/mL)     | 94,3 ± 0,0               | 5,7 ± 1,0                   | 16,62 ± 0,01                       | 97,0 ± 0,0       |

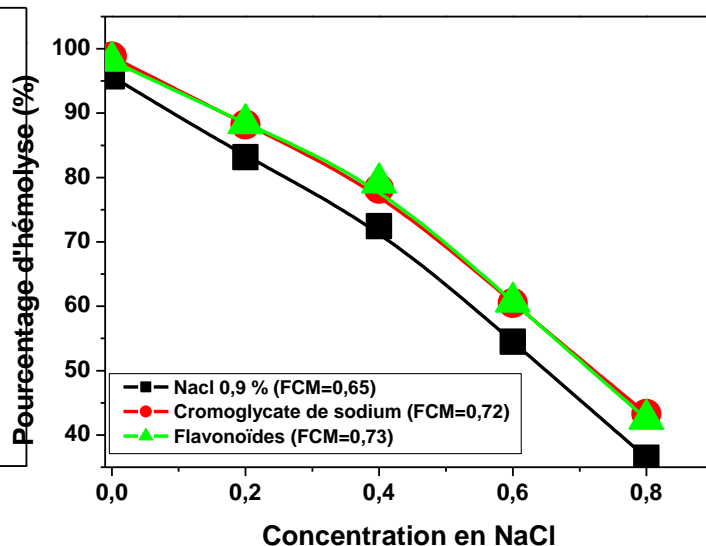


**Figure 6.** Evolution du taux d'Hb en fonction du temps

Comme illustré dans la figure 6 et le tableau 4, les flavonoïdes totaux extraits du Drepanoalpha® (100µg/mL) ont réduit la teneur en méthémoglobine et augmenté les valeurs du rapport Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>.

Evaluation de la fragilité osmotique de la membrane des drépanocytes

La figure 7 donne les résultats du test de fragilité osmotique des drépanocytes non traités et traités aux flavonoïdes totaux extraits du Drepanoalpha® (100µg/mL).



**Figure 7.** Évolution comparée du taux d'hémolyse en fonction de la concentration de NaCl (FCM : la Fragilité Corpusculaire Médiane)

On constate sur ce graphique que le taux d'hémolyse des érythrocytes diminue avec l'augmentation de la concentration en NaCl. A partir de ces graphiques, nous avons déterminé par interpolation les valeurs de la Fragilité Corpusculaire Médiane (FCM) qui est la concentration de NaCl pour laquelle 50% des érythrocytes sont hémolysés.

## Discussion

La présente étude avait pour objectif d'évaluer l'effet des flavonoïdes totaux extraits du Drepanoalpha® sur la falciformation, la polymérisation, l'induction ou non de l'hémolyse et le rapport Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> du sang Hb S. Les caractères organoleptiques et physiques des poudres de Drepanoalpha® dans le visible montre après analyse que cette poudre possède une couleur vert sombre dans le visible et une

odeur semblable au *Chromolaena odorata* la densité est de 0,275 (inférieure à celle de l'eau à +4°C).

L'analyse de cette poudre révèle la présence de plusieurs types de tissus pouvant permettre de faire un contrôle qualité sur le plan microscopique en cas de doute sur la nature de l'échantillon. On peut citer le fragment de fibre (Fig. 1A), les parenchymes (Fig. 1B), les cellules épidermiques allongées (Fig. 1C), et les stomates (Fig. 1D).

L'analyse par CCMHP des poudres de Drepanoalpha® a confirmé la présence de flavonoïdes (figures 2), ce qui était attendu. Ces résultats ont montré que les fractions C3 et C4 (track 3 et 4, figure 2b) ont un profil similaire sur CCM. L'apparition de la bande jaune et verte (c) pour les deux fractions confirme la présence des flavonoïdes comme l'indique aussi le témoin positif, la quercétine utilisée (track 4). Ces résultats ont été confirmés par le test qualitatif au DPPH° réalisé en tube (figure 2d). Les deux fractions (puits 4 et 5, figure 2d) ont réduit le radical DPPH° contrairement aux autres fractions. En effet, le DPPH° est largement utilisé comme technique standard pour l'évaluation de l'activité anti radicalaire.

C'est un radical stable de couleur mauve ou violette qui peut être réduit en Diphényl picrylhydrazine de couleur jaune lorsqu'il est mis en présence d'un antioxydant. Ces résultats sont confirmés par ceux de la quercétine (puit 2) indiquant que les fractions C3 et C4 contiennent des flavonoïdes.

La cinétique de la réaction entre le DPPH° et la quercétine s'est avérée plus rapide que celle des fractions. Cela serait dû à leur impureté caractérisée entre autres par la présence des chlorophylles (couleur rouge) dans l'échantillon. En outre, ces résultats montrent que Drepanoalpha® contient des flavonoïdes totaux mais parmi ceux-ci on peut compter la quercétine (tableau 4). Ces résultats corroborent ceux obtenus par Gbolo *et al.* (5) qui ont trouvé dans l'extrait éthanolique de Drepanoalpha® 286,1±14,2 mg équivalent de quercétine. La teneur élevée en composés phénoliques dont la quercétine confère à Drepanoalpha® les

propriétés antiradicalaires. Ces composés pourraient également agir comme anti-inflammatoires, anticoagulants et stimulant de l'immunité (5).

Il faut aussi noter que les flavonoïdes qui sont plus abondants dans Drepanoalpha® peuvent être choisis comme phytomarqueurs pour le contrôle de qualité et de la standardisation de cet alicament.

La bioactivité a été évaluée en fonction de la falciformation des globules rouges (GR) comme marqueurs de phénotype (figure 4 A). Cette figure montre que la majorité des globules rouges sont falciformes. Cela confirme que le sang utilisé est vraiment du sang SS.

Lorsque le cromoglycate de sodium (contrôle positif) est ajouté, les GRs montrent une forme circulaire (biconcave) et normale (figure 4 B). Les flavonoïdes totaux extraits du Drepanoalpha® ont montré des effets remarquables d'inhibition de la falciformation. Les érythrocytes drépanocytaires traités présentent un phénotype/morphologie très similaire à celui des érythrocytes normaux (figure 4 C). Le changement morphologique est similaire à celui du contrôle positif, ce qui confirme l'effet antifalcémiant de Drepanoalpha® (5).

Les résultats de la figure 5 montrent que le taux de normalisation moyen de NaCl 0,9 % utilisé comme contrôle négatif est nul. Cependant, il a été constaté que les flavonoïdes totaux extraits du Drepanoalpha® montrent une forte inhibition de la falciformation au même titre que le cromoglycate de sodium utilisé comme contrôle positif. La comparaison de ces différentes valeurs avec celle du NaCl 0,9 % prouve que le NaCl 0,9 % ne contient aucun principe actif capable d'inhiber la formation des drépanocytes alors que les flavonoïdes totaux possèdent une activité antifalcémiant prouvée et que le cromoglycate de sodium possède une molécule active bien connue (16,19).

La falciformation des globules rouges est un processus qui résulte de la polymérisation de l'Hb S dans des conditions d'hypoxie et de déshydratation cellulaire par perte d'ions ( $K^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Mg^{++}$ ) et d'eau (20-21). La crise vaso-occlusive

(CVO) au cours de la drépanocytose résulte de la falciformation des globules rouges sous l'effet du stress oxydatif au cours duquel l'hémoglobine se polymérise au sein du globule rouge rendant difficile sa déformation et obstruant les capillaires sanguins avec pour conséquence directe, l'obstruction des capillaires sanguins jusqu'à l'os, ce qui provoque des infarctus osseux particulièrement douloureux qui amènent les patients drépanocytaires aux urgences (22-23). Or, les flavonoïdes ont la capacité de réhydrater les globules rouges falciformes et donc d'empêcher l'augmentation de la concentration intracellulaire en Hb S.

Cette capacité des flavonoïdes totaux extraits du Drepanoalpha® à inhiber la polymérisation (tableau 3) justifie son pouvoir sur la réversibilité des drépanocytes (figure 4). Ces potentialités confirment donc l'utilisation du Drepanoalpha® dans la prise en charge de la drépanocytose en RDC (11-12). Il est bien établi que le globule rouge dense et déshydraté peuvent contenir des polymères d'HbS dans des conditions d'hypoxie modérée et joue ainsi un rôle crucial dans les manifestations aiguës et chroniques de la drépanocytose basées sur les vaso-occlusions et la réduction du flux sanguin dans les vaisseaux en conséquence de la falciformation dans les petits vaisseaux (20).

Dans nos conditions expérimentales, il a été trouvé que les valeurs FCM des globules rouges drépanocytaires traités avec le cromoglycate de sodium et les flavonoïdes totaux extraits du Drepanoalpha® sont plus élevées que celles des globules rouges drépanocytaires non traités (figure 7). Cela montre que les flavonoïdes totaux extraits du Drepanoalpha® améliorent la capacité d'hydratation des drépanocytes. La capacité des flavonoïdes totaux extraits du Drepanoalpha® à améliorer l'hydratation des globules rouges facilite la réduction de la concentration intra-érythrocytaire d'HbS, prolongeant ainsi le temps de retard de la polymérisation de l'Hb S ce qui confirme donc leur effet sur l'inhibition de la polymérisation.

Certaines enzymopathies érythrocytaires telle que le déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G-6-PD, généralement associé

à la drépanocytose), provoquent l'oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine conduisant à la perte de sa propriété à se combiner avec l'oxygène (24–26). Cette oxydation de l'hémoglobine ( $Fe^{2+}$ ) en méthémoglobine ( $Fe^{3+}$ ) est due au stress oxydatif élevé dans les globules rouges drépanocytaires (27). A cet effet, la concentration de méthémoglobine peut être utilisée comme un bioindicateur du stress oxydatif dans les érythrocytes drépanocytaires. Ainsi, une plante qui diminue le profil de méthémoglobine a un effet antioxydant sur les globules rouges drépanocytaires (28).

Les résultats du tableau 4 montrent que dans le tube à essai non traité, le rapport  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  est faible, confirmant la diminution de l'affinité de l'HbS pour l'oxygène, ce qui conduit à sa polymérisation et à la falciformation des globules rouges. Cependant, dans les tubes à essai de sang SS traités avec le cromoglycate de sodium et les flavonoïdes totaux extraits du Drepanoalpha®, on observe une augmentation de ce rapport. Cette action du cromoglycate de sodium et des flavonoïdes sur l'amélioration du rapport  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  est assimilée à une inversion de l'état fonctionnel des érythrocytes drépanocytaires vers leur structure biconcave d'origine, augmentant ainsi l'affinité des drépanocytes pour l'oxygène. Ces résultats indiquent effectivement que les flavonoïdes totaux extraits du Drepanoalpha® empêcheraient la falciformation des érythrocytes et l'oxydation *in vitro* de l'hémoglobine. Cette capacité du cromoglycate de sodium et des flavonoïdes totaux extraits du Drepanoalpha® à réduire la méthémoglobine en hémoglobine *in vitro* a été suggérée pour indiquer leur activité antioxydante, bien connue pour les polyphénols dont les flavonoïdes (5, 29). Ainsi, la présence de ce métabolite secondaire dans le Drepanoalpha® pourrait protéger les érythrocytes contre le vieillissement prématuré et l'apoptose induite par les radicaux libres chez les drépanocytaires.

#### *Forces et faiblesses de l'étude*

La détermination de la capacité d'un phytomédicament à normaliser ou protéger les

globules rouges contre la falciformation et le fait de combiner tous les tests anti-drépanocytaires afin d'évaluer son efficacité *in vitro* n'avaient pas encore été réalisés au paravent ; ceci constitue la force de cette étude. Cependant, elle a comme limite le fait d'avoir utilisé les extraits totaux des flavonoïdes à la place d'un type spécifique de molécule pure extrait de ce phytomédicament.

### Conclusion

Il ressort de la présente étude que la poudre du Drépanoalpha® contient un équivalent égale à 8,14 mg/g d'extrait; sa densité est de 0,275 et est composée des fragments de fibre, parenchymes, cellules épidermiques allongées et stomates. En outre, les flavonoïdes totaux extraits du Drépanoalpha® possèdent une activité antifalcémiant (avec le taux maximal de normalisation d'environ 90% et une concentration minimale de normalisations de 11,4 µg/mL), un taux d'augmentation du rapport Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> de 97,0%, une activité réhydratante avec une fragilité corpusculaire membranaire des érythrocytes (FCM) de 0,73, un taux d'inhibition de la polymérisation de 77,5% et n'induisent pas l'hémolyse des globules rouges (% d'hémolyse 0,1 %). L'étude a donc permis de confirmer les flavonoïdes comme phytomarqueur pour le contrôle de qualité et de standardisation de ce phytomédicament.

### Conflit d'intérêt

Les auteurs déclarent qu'il n'y a pas de conflit d'intérêts.

### Contribution des auteurs

Gbolo B.Z. a conçu et réalisé l'étude, mené les expériences, analysé les données et rédigé le manuscrit. Memvanga P.B., Mpiana P.T., Tshilanda D.D., Tshibangu S.T.D. et Ngbolua K.N. ont aidé à concevoir l'étude et l'ont supervisée. Ciala B.N. a participé à la collecte des échantillons et aux expériences. Tous les auteurs ont lu et approuvé le manuscrit final.

### Remerciements

Nous remercions l'Académie de la recherche et de l'enseignement supérieur (ARES) grâce à qui ce projet a été financé à travers son programme " Appui institutionnel (AI) 2018-2020 " (Numéro de subvention : COOP-CONV-18-004, AI ARES UNIKIN). Les auteurs tiennent à remercier Monsieur Didier Bosolo Efunda, chef de service d'hématologie et parasitologie, du centre de Médecine Mixte et d'Anémie SS (CMMASS) de Yolo-Sud (Mabanga) pour sa disponibilité à nous fournir au temps voulu du sang drépanocytaire.

### Références

1. Mbassi ADH, Dongmo F, Ngo US, Mafo FV, Alima YA, Nlend NEA, *et al.* Aspects Épidémiologiques, Cliniques et Thérapeutiques des Crises Vaso- Occlusives chez les Enfants Drépanocytaires en Milieu Hospitalier à Yaoundé Epidemiological, clinical and therapeutic aspects related to the occurrence of vaso - occlusive crises in. *Heal Sci Dis.* 2017; **18** (4): 89–97.
2. Mattioni S, Stojanovic KS, Girot R, Lionnet F. La drépanocytose en France. *Rev Francoph des Lab.* 2016; **481**: 61–66.
3. Ashle KA, Yang Q, S.Olney R. Sickle Hemoglobin (Hb S) Allele and Sickle Cell Disease: A HuGE Review. *Am J Epidemiol* [Internet] 2000; **151** (9):839–845. Available in <https://academic.oup.com/aje/article-abstract/151/9/839/50321>.
4. Iweala EEJ, Uhegbu F., Ogu G. Preliminary *in vitro* Antisickling Properties of Crude Juice. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2010; **7**(2):113–117.
5. Gbolo BZ, Asambo LS, Bongo GN, Tshibangu DST, Kasali F, Memvanga P, *et al.* Bioactivity and Chemical Analysis of Drepanoalpha: An Anti-Sickle Cell Anemia Poly-Herbal Formula from Congo-Kinshasa. *Am J Phytomedicine Clin Ther.* 2017; **5** (1):1–7.
6. Lionnet F, Stankovic K, Girot R. Drépanocytose de l'adulte. *Hématologie* [Internet]. 2009;13 (006-D-16):1–19. Available in [http://dx.doi.org/10.1016/S1155-1984\(09\)49949-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1155-1984(09)49949-7).



7. Abere TA, Egharevba CO, Chukwurah IO. Pharmacognostic evaluation and antisickling activity of the leaves of *Securinega virosa* Roxb. ex Willd. (Euphorbiaceae). *African J Biotechnol.* 2014; **13**(40): 4040–4045.
8. Imaga NA. Phytomedicines and nutraceuticals: Alternative therapeutics for sickle cell anemia. *Sci World J.* 2013; **2013**:1–12.
9. Okoh MP, Alli LA, Tolvanen MEE, Nwegbu MM. Herbal Drug use in Sickle Cell Disease Management; Trends and Perspectives in Sub-Saharan Africa - A Systematic Review. *Curr Drug Discov Technol.* 2019; **16**(4): 372-385.
10. Ngbolua KN, Mpiana TP, Gbolo ZB. Etudes chimique et toxicologique de Drepanoalpha, une formulation traditionnelle améliorée pour la prise en charge de la drépanocytose en République Démocratique du Congo. Paris: Editions Universitaires Européennes; 2020. 137 p.
11. Gbolo ZB, Tshibangu D, Asamboia L, Bongo G, Kasali F, Feza V, *et al.* Sickle Cell Anemia Therapeutic Approach Based on Drepanoalpha<sup>®</sup> : About 34 Sickle Cell Anemia Therapeutic Approach Based on Drepanoalpha<sup>®</sup> : About 34 Cases. *J Complement Altern Med Res.* 2017; **4**(2): 1–8.
12. Gbolo ZB, Tshibangu STD, Memvanga BP, Bongo NG, Kasali MF, Ngbolua KN, *et al.* Assessment of the Efficacy and Tolerance of Drepanoalpha<sup>®</sup> in the Management of Sickle Cell Disease in Kinshasa (DR Congo): About Ten Cases. *Int J Med Pharm Case Reports* 2017; **9**(2):1–10.
13. Ngbolua KN, Mpiana PT, Tshibangu D, Mazasa P., Gbolo BZ, Atibu EK, *et al.* *In vitro* Antisickling and Radical Scavenging Activities of a Poly-herbal Formula (Drepanoalpha<sup>®</sup>) in Sickle Cell Erythrocyte and Acute Toxicity Study in Wistar Albino Rats. *European J Med Plants* 2014; **4**(10): 1251–1267.
14. Mpiana P, Kasali F, Bwirhonde F, Gbolo B, Tshibangu D, Ngbolua K, *et al.* Acute and Sub-acute Oral Toxicity Study of Drepanoalpha<sup>®</sup> (A Poly-Herbal Formula Used in the Management of Sickle Cell Disease) in Guinea-pigs. *Br J Pharm Res.* 2016; **10**(5): 1–8.
15. Tine Y, Yang Y, Renucci F, Costa J, Wélé A, Paolini J. LC-MS/MS analysis of flavonoid compounds from *Zanthoxylum zanthoxyloides* extracts and their antioxidant activities. *Nat Prod Commun.* 2017; **12**(12): 1865-1868.
16. Lukyamuzi EJ, Oweta OJN, Dominguez GM, Betancourt MV, Rodríguez OM. Antisickling effect of crude flavonoids in the methanolic leaf extract of *Persea americana* Mill. *Rev Cuba Plantas Med.* 2019; **23**(2): 1–11.
17. Fabre N, Rustan I, Hoffmann E de, Quetin-Leclercq J. Determination of Flavone, Flavonol, and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2001; **12**: 707–715.
18. Nwaoguikpe R, Ujowundu C, Igwe C, Dike P. The Effects of Moringa oleifera Leaves Extracts on Sickle Cell Hemoglobin. *J Sci Res Reports* 2015; **4**(2):123–132.
19. Bizumukama L, Ferster A, Gulbis B, Kumps A, Cotton F. *In vitro* inhibitory effects of disodium cromoglycate on ionic transports involved in sickle cell dehydration. *Pharmacology* 2009; **83**(5): 318–322.
20. Brugnara C, De Franceschi L. New therapeutic approaches to sickle cell disease. *Hématologie.* 2006; **12**(4): 239-245.
21. Ravelojaona M. Analyse histologique des répercussions musculaires, structurales, énergétiques et microvasculaires chez des hommes et des femmes drépanocytaires. Thèse de Sciences Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du diplôme de Doctorat en Biologie Médecine Santé, Spécialité : Biologie et Physiologie de l'Exercice. Université Jean Monnet Saint Etienne, France. [Saint-Etienne]: Université Jean Monnet - Saint-Etienne; 2014. Disponible sur <https://www.these.fr>
22. Driss A, Asare KO, Hibbert JM, Gee BE, Adamkiewicz T V, Stiles JK. Sickle cell disease in the post-genomic era: A monogenic disease with a polygenic phenotype. *Genomics Insights* 2009; **2**(1): 23-48.
23. Nwaoguikpe R. The phytochemical, proximate and amino acid compositions of the extracts of two varieties of tiger nut (*Cyperus esculentus*) and their effects on sickle cell. *J Med Med Sci* [Internet]. 2010; **1**(11): 543–549. Available from: <http://interesjournal.org/JMMS/Pdf/2010/December/Nwaoguikpe.pdf>
24. Nanfack P, Biapa N, Pieme C, Ama-Moor V, Moukette B, Yonkeu JN. The *in vitro* antisickling and antioxidant effects of aqueous extracts *Zanthoxylum heitzii* on sickle cell disorder. *BMC Complement Altern Med.* 2013; **13**(162): 1–7.

25. Richard AM, Diaz JH, Kaye AD. Reexamining the risks of drinking-water nitrates on public health. *Ochsner J* [Internet]. 2014; **14**(3): 392–398. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25249806> %0A<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4171798>.
26. Baraka A, Sunday AE, Sani I, Abdulaziz H. *In vitro* methaemoglobin reducing potential of crude methanolic extract and fractions of sterculiassetigera leaf on human sickled red blood cells. *Bayero J Pure Appl Sci* [Internet]. 2018; **11**(1): 255-258. Available from: <http://dx.doi.org/10.4314/bajopas.v11i1.42S>.
27. Mpiana PT, Ngbolua KTNN, Bokota MT, Kasonga TK, Atibu EK, Tshibangu DST, *et al.* *In vitro* effects of anthocyanin extracts from *Justicia secunda* Vahl on the solubility of haemoglobin S and membrane stability of sickle erythrocytes. *Blood Transfus.* 2010; **8**(4) :248–254.
28. Kambale J, Ngbolua K, Mpiana P, Mudogo V, Tshibangu D, Wumba D, *et al.* Evaluation *in vitro* de l'activité antifalcémiant et effet antioxydant des extraits d'*Uapaca heudelotii* Baill. (Euphorbiaceae). *Int J Biol Chem Sci.* 2013; **7**( 2): 523–534.
29. Mpiana P, Misakabu F, Yuma P, Tshibangu D, Ngbolua K, Mwanyishay C, *et al.* Antisickling Activity and Ph ysico- chemical Stability of Anthocyanin Extracts from *Ipomoea batatas* Leaves. *J Med Life* 2014; **2**(1): 25–31.

Voici comment citer cet article : Gbolo BZ, Ciala BN, Ngbolua JKN, Tshibangu DS, Tshilanda DD, Memvanga PB *et al.* Profilage phytochimique par chromatographie sur couche mince haute performance d'extraits de flavonoïdes totaux du *Drepanoalpha*<sup>®</sup> et évaluation de leur activité antidrépanocytaire *in vitro*. *Ann Afr Med* 2022; **16** (1): e4882-e4898. <https://dx.doi.org/10.4314/aamed.v16i1.3>