



Etude de l'activité antifalcémiant de extraits de racines de *Leptadenia hastata* Decne. (Asclepiadaceae)

Matar SECK^{1*}, Cheikh SALL², Papa Madièye GUEYE³, Insa SECK¹,
Mbaye Diaw DIOUM¹, Zhou LEMBACHAR¹, Rokhaya Sylla GUEYE¹,
Djibril FALL¹, Mamadou FALL⁴ et Tandakha Ndiaye DIEYE⁵

¹Laboratoire de Chimie Organique et Thérapeutique, Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar, BP 5005, Dakar-Fann, Sénégal.

²Laboratoire de Chimie, UFR des Sciences de la Santé, Université de Thiès, BP 967 Thiès, Sénégal.

³Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar, BP 5005, Dakar-Fann, Sénégal.

⁴Laboratoire de Toxicologie et d'Hydrologie, Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar, BP 5005, Dakar-Fann, Sénégal.

⁵Laboratoire d'Immunologie, Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar, BP 5005, Dakar-Fann, Sénégal.

*Auteur correspondant, E-mail : matar.seck@ucad.edu.sn; Tel (221) 77 569 80 01

RÉSUMÉ

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antifalcémiant de extraits de racines de *Leptadenia hastata* sur des hémoglobines falciformes et d'identifier les principes actifs à l'origine de cette activité. La méthode employée étudie la réversibilité des drépanocytes, en fonction du temps d'incubation des extraits par rapport aux témoins (eau physiologique, phénylalanine et arginine) sur des échantillons de sang de patients drépanocytaires homozygotes. Des concentrations de 0,05; 0,5; 5 et 10 mg/ml de quatre extraits (méthanol, hexane, acétate d'éthyle et méthanol résiduel) ont été mises en contact avec des drépanocytes de type SS après avoir provoqué leur falciformation avec une solution à 2% de métabisulfite de sodium. L'évaluation a été effectuée toutes les 30 minutes pendant 120 minutes. Les différents extraits ont montré une activité dose-dépendante sur la réversibilité de la falciformation des globules rouges avec plus de 80% d'inversion en 120 minutes pour l'extrait méthanolique, le plus actif. Un screening phytochimique a permis de faire une corrélation entre les flavonoïdes et l'activité antifalcémiant des extraits de *Leptadenia hastata*.

© 2015 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés : Drépanocytose, hémoglobine, activité antifalcémiant, *Leptadenia hastata*, flavonoïdes.

INTRODUCTION

La drépanocytose ou anémie falciforme, est une affection génétique héréditaire grave, à transmission autosomale récessive dans laquelle les globules rouges ont une forme de faucille au lieu d'une forme de

disque. C'est une maladie génétique causée par une hémoglobine anormale (Hb S), qui polymérise sous état désoxygéné entraînant une déformation des globules rouges qui prennent une forme de croissant. C'est la maladie génétique la plus fréquente au monde,

elle atteint surtout les personnes d'ascendance africaine. Il a été estimé que 250 000 enfants naissent chaque année dans le monde avec la drépanocytose (Tim, 2008). Si au Sénégal, 10% de la population est porteuse du trait drépanocytaire, en République Démocratique du Congo, on arrive à 40%, ce qui entraîne une prévalence allant de 2% dans à 30% (Diagne, 2003). Les cas de décès dus aux complications de la drépanocytose sont surtout enregistrés chez les enfants de moins de cinq ans, les adolescents et les femmes enceintes (OMS, 2010). La drépanocytose est donc un problème de santé publique.

Sur la base d'enquêtes ethnobotaniques et d'entretiens avec des tradipraticiens de la pharmacopée sénégalaise, il ressort que le *Leptadenia hastata* (« Thiaxate » en Wolof) est une plante largement utilisée dans le traitement de plusieurs pathologies dont la drépanocytose (Balé et al., 2011; DIOP, 2012). A notre connaissance, les racines de cette plante n'ont pas encore fait l'objet d'études complètes et précises sur la drépanocytose. Le but de cette étude est donc de mettre en évidence l'activité antifalcémiant d'extraits de racines de *Leptadenia hastata* sur des globules rouges falciformes.

Le profil épidémiologique de la drépanocytose, qui touche surtout des populations pauvres, en fait une maladie tropicale négligée, qui profite très peu des innovations thérapeutiques. La cherté des traitements et de la prise en charge amène les populations africaines à faire de plus en plus appel aux traitements de cette pathologie par la médecine traditionnelle. Dans le but de trouver une alternative thérapeutique, moins chère et moins toxique pour la prise en charge de la drépanocytose, ce travail a pour objectif principal la recherche de nouveaux principes actifs qui pourront permettre de proposer de nouveaux médicaments pour la prise en

charge de la drépanocytose, à partir des plantes de la pharmacopée sénégalaise.

Cette étude bio-guidée est divisée en deux parties : un screening phytochimique des extraits de racines de *Leptadenia hastata* suivie de leur évaluation, *in vitro*, sur des drépanocytes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Échantillons de sang et réactifs

Du sang a été collecté avec consentement de patients dont la drépanocytose SS est confirmée par électrophorèse. Ces patients n'ont été ni transfusés ni traités à l'hydroxyurée durant les six derniers mois. L'âge des patients varie de 7 à 30 ans dans les deux sexes. Le prélèvement a été opéré au niveau du pli du coude des patients au Laboratoire de Biochimie du CHU de Fann et le sang a été recueilli dans des tubes EDTA.

Tous les produits chimiques et biochimiques utilisés dans ce travail, ont été obtenus auprès de différents fournisseurs (Prolabo, Scharlau, Aldrich ou Carlo Erba). Les solvants ont été distillés avant utilisation.

Matériel végétal

Les racines de *Leptadenia hastata* utilisées ont été achetées auprès des tradipraticiens du marché de Fass à Dakar. L'identification a été effectuée au Laboratoire de Pharmacognosie et Botanique de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar. Les racines, séchées à une température de 25 à 30 °C, sur une paillasse à l'ombre dans une pièce bien ventilée, ont été broyées et réduites en poudre à l'aide d'un broyeur de marque Brabender.

Préparation des extraits

Cent (100) g de poudre de racines de *Leptadenia hastata* ont été mis à macération pendant 48 h dans 200 ml de méthanol. Le

macéré est filtré et le résidu solide est repris puis remis à macérer deux fois dans 200 ml de méthanol. Les trois fractions sont regroupées, séchées avec du sulfate de magnésium, puis concentrées à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'extrait méthanolique brut (EM) ainsi obtenu est pesé pour déterminer le rendement.

La même opération est effectuée pour réaliser le fractionnement en utilisant un gradient de solvant. Ainsi, nous avons pu obtenir les extraits hexanique (EH), d'acétate d'éthyle (EAE) et méthanolique résiduel (EMR). Le résidu solide est séché à l'air libre avant de changer de solvant. Les extraits sont conservés dans un réfrigérateur à 4 °C jusqu'à utilisation.

Pour chaque extrait, une solution mère de 10 mg/ml dans une solution tampon à pH 7,4 est préparée. Les différentes concentrations (0,05; 0,5; 5 mg/ml) seront préparées à partir de ces solutions mères.

Screening phytochimique

Le screening phytochimique, test qualitatif, permet de mettre en évidence la présence ou non de familles de composés chimiques dans un produit végétal. Les groupes chimiques recherchés dans les quatre fractions sont : les alcaloïdes, les saponosides, les tanins, les anthracéniques et les flavonoïdes. Les références et les révélateurs utilisés sont respectivement : la quinidine et le réactif de Dragendorff pour les alcaloïdes, l'acide gallique et le chlorure ferrique pour les tanins, l'hémolidine et l'hydroxyde de potassium pour les anthracéniques et enfin la vitexine et le chlorure d'aluminium pour les flavonoïdes. Pour les saponosides l'indice de mousse a été déterminé.

Activité antifalciformiante

Le test *in vitro* utilisé pour évaluer l'activité des extraits de la poudre de racines de *Leptadenia hastata*, est celui d'Emmel (Emmel, 1933) selon un protocole décrit par Imaga et al. (2009). Le sang, de patients drépanocytaires SS confirmés, est lavé

pendant cinq minutes à 3 000 tr/min trois fois de suite pour éliminer le sérum surnageant. Par la suite 20 µl de globules rouges restant sont mélangés avec 20 µl d'une solution de métabisulfite de sodium à 2% pour provoquer la falciformation. A ce mélange, on rajoute 20 µl de solution de la fraction à évaluer à des concentrations comprises entre 0,05 et 10 mg/ml. L'ensemble est mis entre lame et lamelle. Quatre études indépendantes sont réalisées et chaque expérience est menée en double.

L'analyse morphologique des érythrocytes (100 cellules dans 4 à 5 champs) est réalisée, à l'aide d'un microscope à immersion, dès que les extraits sont mis en contact avec le sang, toutes les 30 minutes jusqu'à 120 minutes. Le taux de réversibilité des drépanocytes est déterminé dans chaque champ. La phénylalanine et l'arginine sont utilisés comme témoin positif et le milieu physiologique comme témoin négatif.

Analyse des données

Les résultats ont été évalués en pourcentage de drépanocytes résiduels. Pour le témoin négatif, puisque le nombre de drépanocytes augmente avec le temps, il a été considéré que le taux de 100% correspondra au nombre de drépanocytes obtenu à 120 minutes. Pour les autres, ce nombre diminue avec le temps donc le taux de 100% correspond au nombre de drépanocytes au temps initial T_0 .

L'évolution du pourcentage de drépanocytes résiduels en fonction du temps est donnée par la relation suivante :

$$PDR = \frac{\text{Moyenne des drépanocytes à } T_x}{\text{Moyenne des drépanocytes à } T_0}$$

PDR=Pourcentage de drépanocytes résiduels
 $T_x = 0, 30, 60, 90$ et 120 minutes; $T_0 =$ temps initial

L'analyse des données avec le logiciel Excel version 2011 a conduit aux résultats ci-après.

RÉSULTATS

D'après les résultats présentés dans le Tableau 1, l'extrait méthanolique total est obtenu avec un rendement de 5,00%, alors que le fractionnement par gradient de solvant conduit à un rendement total plus important de 5,85%. Nous constatons que la poudre de racine de *Leptadenia hastata* est constituée en grande partie par des substances polaires. Ceci est matérialisé par les rendements plus importants observés lorsque les solvants polaires sont utilisés.

Le screening phytochimique (Tableau 2), réalisé par mesure de l'indice de mousse pour les saponosides et par chromatographie sur couche mince (CCM) pour les autres groupes chimiques, montre que seuls les tanins et les flavonoïdes sont présents au niveau des racines de *Leptadenia hastata* parmi les cinq groupes étudiés. Les tanins sont présents en grande quantité dans toutes les fractions tandis que les flavonoïdes ne sont présents que dans les fractions méthanoliques.

La figure 1 présente les résultats de l'évaluation de l'activité *in vitro* des extraits de la poudre de racine de *Leptadenia hastata* à 0,05 mg/ml sur la falciformation des globules rouges provoquée par l'action du métabisulfite à 2%.

Ces résultats permettent de voir que tous les extraits étudiés ont une action plus ou moins significative sur la falciformation des globules rouges. En effet, ces extraits provoquent la réversibilité de la falciformation des globules rouges en comparaison avec le témoin négatif pour lequel le nombre de globules rouges falciformes augmente. Nous observons également une diminution de la falciformation en fonction du temps avec 75% de réversibilité en 120 minutes pour l'extrait méthanolique le plus actif. Alors que l'extrait hexanique le moins actif provoque une réversibilité de 45%.

Les résultats obtenus pour les concentrations de 10 mg/ml (Figure 2) des différentes fractions d'extrait de la poudre de racine de *Leptadenia hastata* confirment les tendances observées dans la Figure 1 avec une réversibilité de la falciformation comparable en fonction du temps. Il apparaît également un effet dose-dépendant : plus la concentration augmente plus la réversibilité de la falciformation est importante. En effet, le pourcentage de réversibilité est améliorée elle se situe dans une fourchette de 45 à 80%. Ces résultats confirment également les tendances observées dans les Figures 3 et 4.

Tableau 1 : Rendements des extractions (%).

Méthanol brut	Hexane	Acétate d'éthyle	Méthanol résiduel
5,00	0,66	1,62	3,50

Tableau 2 : Mise en évidence des groupes de composés chimiques présents dans la poudre de racine de *Leptadenia hastata*.

Alcaloïdes	Saponosides	Tanins	Anthracéniques	Flavonoïdes
EM	-	++	-	+
EH	-	-	++	-
EAE	-	-	++	-
EMR	-	-	++	-

EM = extrait méthanolique, EH = extrait hexanique, EAE = extrait d'acétate d'éthyle, EMR : extrait méthanolique résiduel - : absence ; + : présence ; ++ : forte présence.

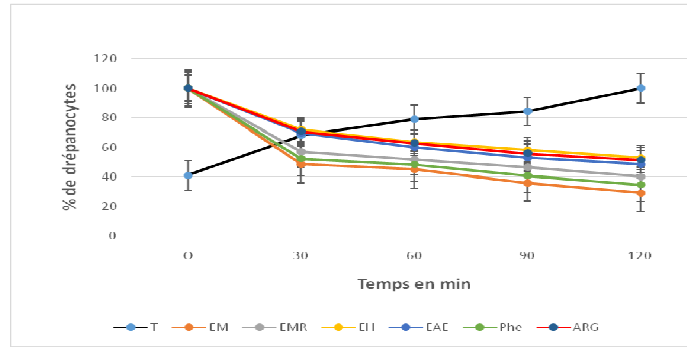


Figure 1 : Activité antifalcémiant *in vitro* à 0,05 mg/ml d'extraits de fractions de racines de *Leptadenia hastata*. Le résultat est la moyenne de quatre expérimentations différentes. T = témoin négatif, EM = extrait méthanolique, EH = extrait hexanique, EAE = extrait d'acétate d'éthyle, Phe = phénylalanine, ARG = arginine, EMR = extrait méthanolique résiduel.

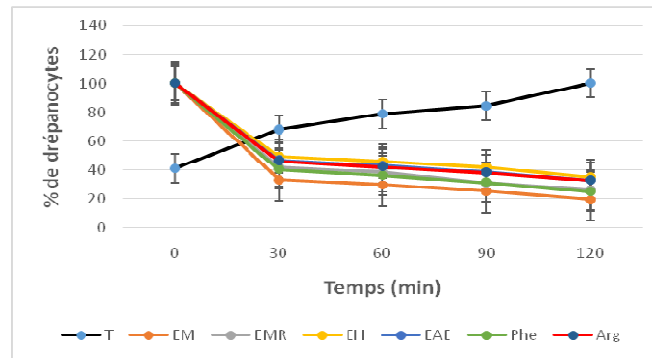


Figure 2 : Activité antifalcémiant *in vitro* à 10 mg/ml d'extrait de la poudre de racine de *Leptadenia hastata*. Le résultat est la moyenne de quatre expérimentations différentes. T = témoin négatif, EM = extrait méthanolique, EH = extrait hexanique, EAE = extrait d'acétate d'éthyle, Phe = phénylalanine, ARG = arginine.

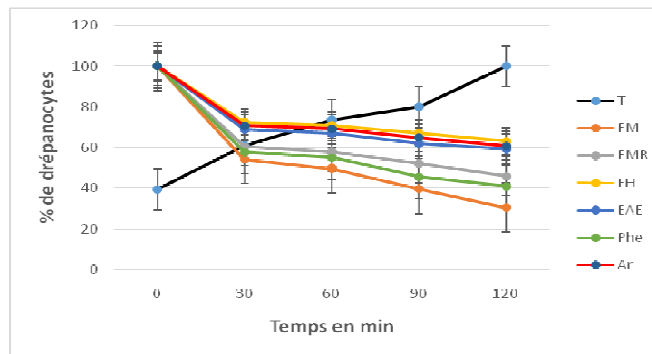


Figure 3 : Activité antifalcémiant *in vitro* à 0,5 mg/ml d'extrait de racines de *Leptadenia hastata*. Le résultat est la moyenne de quatre expérimentations différentes. T = témoin négatif, EM = extrait méthanolique, EH = extrait hexanique, EAE = extrait d'acétate d'éthyle, Phe = phénylalanine, ARG = arginine.

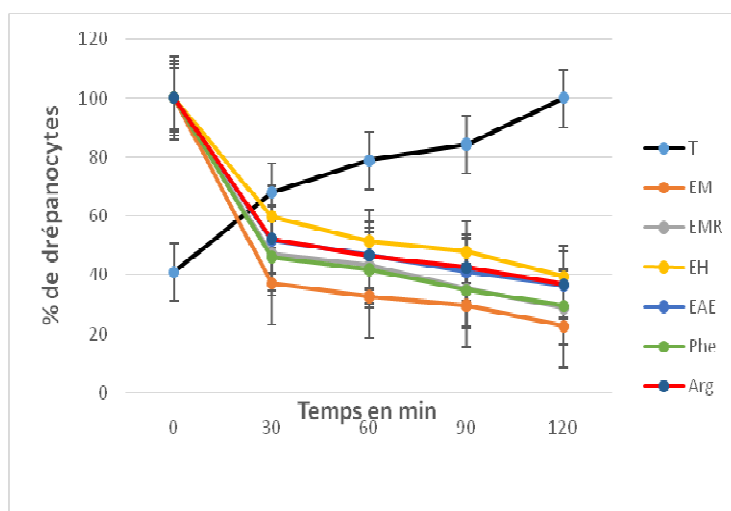


Figure 4 : Activité antifalcémiant *in vitro* à 5 mg/ml d'extraits de racines de *Leptadenia hastata*. Le résultat est la moyenne de quatre expérimentations différentes. T = témoin négatif, EM = extrait méthanolique, EH = extrait hexanique, EAE = extrait d'acétate d'éthyle, Phe = phénylalanine, ARG = arginine.

DISCUSSION

Maladie génétique, la drépanocytose ne peut être traitée durablement que par une greffe de moelle osseuse réservée aux personnes présentant une forme très sévère de la maladie ou ayant un risque de mortalité précoce. En effet, c'est une opération qui nécessite un traitement très lourd. De plus, elle peut entraîner des complications graves voire mortelles. La drépanocytose constitue un problème de santé publique majeur dans de nombreux pays en Afrique au sud du Sahara. Plusieurs auteurs ont démontré l'importance des plantes tropicales dans la prise en charge de la drépanocytose. L'activité de ces plantes serait liée à la présence d'une grande variété de substances biologiquement actives et parmi lesquelles des aminoacides capable d'inverser la falciformation (Sofowora, 1975; Ekeke et al., 1990).

Ces premiers résultats obtenus dans l'étude de l'activité des extraits de la poudre de racines de *Leptadenia hastata* confirment les résultats de l'étude ethnobotanique quant à l'utilisation de cette plante dans la prise en

charge de la drépanocytose. Tous les extraits se sont révélés actifs sur la réversibilité de la falciformation. L'extrait méthanolique (EM) la plus active provoque une réversibilité de 80% de la falciformation à 5 mg/ml en 120 minutes d'incubation alors que l'extrait hexanique la moins active inverse la falciformation de 60% (Figure 2). Ces résultats se comparent favorablement à ceux observés par Egunyomi (2009) étudiant l'effet de deux mélanges de plantes sur l'inhibition de la falciformation, avec 63,8 et 78,8% pour respectivement un mélange de 28 et de 7 plantes. On observe également des activités très proches pour toutes les concentrations entre les extraits hexaniques et l'arginine. Cette dernière est par ailleurs utilisée dans la prise en charge de la douleur car elle est le précurseur de l'oxyde nitrique, un puissant vasodilatateur et inhibiteur du remodelage vasculaire. Elle présente, également, des effets en cascade dans la prévention de l'activation des leucocytes, des plaquettes et des cellules endothéliales prévenant ainsi la diminution

des crises liées à la vaso-occlusion (Ogunbemi et al., 2013; Morris, 2013).

A toutes les concentrations (Figures 1-4), nous observons que la réponse évolue dans le même sens dans la mesure où la meilleure réponse est toujours observée pour l'extrait méthanolique, suivie de la référence phénylalanine, de l'extrait méthanolique résiduel. Les extraits acétate d'éthyle, arginine et extrait hexanique sont les moins actifs face à la réversibilité de la falciformation. La dominance de l'activité des fractions méthanoliques (EM et EMR) pourrait être liée à la présence dans ces seules fractions, des flavonoïdes qui sont de véritables antioxydants. Les flavonoïdes sont impliqués dans l'inhibition des effets délétères des espèces réactives de l'oxygène produites au cours de la drépanocytose. Dans la littérature (Aherne et al., 1999; Raison et al., 2013), il a été démontré que les flavonoïdes tels que la myricétine, la quercétine et la rutine ont des effets protecteurs contre les espèces réactives de l'oxygène. De plus, les flavonoïdes améliorent la fonction endothéliale en permettant l'activation de la synthèse de l'oxyde nitrique (Ghosh et al., 2009) vaso-relaxant pouvant donc jouer un rôle important dans le traitement de la drépanocytose. La vaso-relaxation entraîne une meilleure circulation sanguine, ce qui permet d'éviter la survenue de crises vaso-occlusives. Le témoin négatif ne montre aucune activité sur la réversibilité des drépanocytes. On observe un maximum de drépanocyte à 120 minutes.

Les propriétés antifalcémiantes des extraits de la poudre de racines de *Leptadenia hastata* pourraient être concentrées dans les fractions polaires et alcooliques de *Leptadenia hastata* comme le met en évidence les extraits méthanoliques (Figures 1-4). Cette étude montre également que la réversibilité de la falciformation est dose dépendante. En effet, à 10 mg/ml (Figure 2), en se référant à la fraction la moins active, on observe plus de

50% de retour de falciformation pour toutes les fractions après 30 min d'incubation alors que ce pourcentage diminue au fur et à mesure que la concentration diminue. Il est de 40% pour 5 mg/ml, 30% pour 0,5 mg/ml et 27% pour 0,05 mg/ml. Cette observation est confirmée au niveau de toutes les mesures, par conséquent, ces extraits ont un effet dose-dépendant. Par ailleurs, il a été démontré que la phénylalanine est présente dans les feuilles de *Leptadenia hastata* (Busson, 1965). Elle pourrait également être associée à l'importante activité antifalcémiant des extraits méthanoliques sur les érythrocytes. En effet, la phénylalanine est impliquée dans l'inhibition de la polymérisation des Hb S désoxygénés et à l'inversion de la falciformation (Kumpati, 1987). A la concentration de 5 mg/ml (Figure 4), on observe une superposition des courbes de la phénylalanine et de l'extrait méthanolique résiduel alors que l'extrait méthanolique brut reste plus actif, ceci pourrait s'expliquer par un effet synergique des différentes substances bioactives présentes dans l'extrait méthanolique brute.

Conclusion

Leptadenia hastata a été décrite lors d'une étude ethnobotanique par les tradipraticiens de la pharmacopée sénégalaise comme une plante ayant des vertus thérapeutiques sur la drépanocytose. Cette étude montre une activité très importante des extraits méthanoliques de *Leptadenia hastata* sur la réversibilité des drépanocytes (80% de réversibilité). De plus, nous avons montré que cette activité est dose-dépendante. Ainsi les résultats de cette étude corroborent l'utilisation ethnobotanique des racines de *Leptadenia hastata*. Des études complémentaires pour accéder et caractériser les principes actifs de racines de *Leptadenia hastata* responsables de cette activité de

même que l'étude de la cytotoxicité des extraits sont en cours.

REMERCIEMENTS

Les auteurs de cet article présentent leurs remerciements et leur sincère reconnaissance au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche du Sénégal pour avoir financé ce projet à travers le Fond d'Impulsion pour la Recherche Scientifique et Technique (FIRST).

RÉFÉRENCES

- Aherne SA, O'Brien NM. 1999. Protection by flavonoids Myricetin, Quercetin and Rutin against Hydrogen peroxide-induced DNA damage in Caco-2 and Hep G2 cell. *Nutrition and Cancer*, **34**(2):160-166.
- Balé B, Maria Teresa RP, Moussa Z, Benoit M, Laya S. 2002. Activité anti-androgénique de *Leptadenia hastata* (Pers.) Decne : effet compétitif des extraits aqueux de la plante et du propionate de testostérone sur des rats impubères castrés. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement*, **15**(2): 223-229.
- Busson FF. 1965. Étude chimique et biologique des végétaux alimentaires de l'Afrique noire de l'ouest dans leurs rapports avec le milieu géographique et humain, Thèse : Et. STS. Nat. Faculté des Sciences Naturelles : Marseille, Leconte.
- Diagne I, Diagne-Gueye ND, Signaté-Sy H, Camara B, Lopez-Sall P, et al. 2003. Prise en charge de la drépanocytose chez l'enfant en Afrique: expérience de la cohorte de l'hôpital d'enfants Albert Royer de Dakar. *Médecine Tropicale*, **63**(4-5): 513-520.
- Egunyomi A, Moody JO, Eletu OM. 2009. Antisickling activities of ethnomedicinal plant recipes used for management of sickle cell anemia in Ibadan, Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, **8**(1): 20-25.
- Ekeke GI, Shod FO.1990. Phenylalanine is the predominant antisickling agent in *Cajanus cajan* seed extract. *Planta Medica*, **56**: 41-43.
- Emmel VE. 1933. As red study of the erythrocytes in case of severe anemia with elongated and sickle and shape dred blood corpuscule. *Archives of Internal Medicine*, **7**: 769-789.
- Ghosh D, Scheepens A. 2009. Vascular action of polyphenols. *Molecular Nutrition & Food Research*, **53**: 322-331.
- Imaga NOA, Gbenle GO, Okochi VI, Akanbi SO, Edeoghon SO, Oigbochie V, Kehinde MO, Bamiro SB. 2009. Antisickling property of *Carica papaya* leaf extract. *African Journal of Biochemistry Research*, **3**(4): 102-106.
- Hankin J, Aygun B. 2009. Pharmacotherapy in sickle cell disease. State of the art and future prospects. *British Journal of Haematology*, **145**: 296-308.
- Kumpati J. 1987. Liposome-loaded phenyl alanine or tryptophan as sickling inhibitor : a possible therapy for sickle cell disease. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, **38**(2): 170-181.
- Morris CR. 2014. Alteration of the Arginine Metabolome in Sickle Cell Disease : A growing rationale for Arginine Therapy. *Hematology Oncology Clinic of North America*, **28**(2): 301-321.
- Ogungbemi SI, Anigbogu CN, Kehinde MO, Jaja SI. 2013. L-arginine increases nitricoxide and attenuates pressor and heart rate responses to change in posture in sickle cell anemia subjects. *Nigerian Journal of Physiological Sciences*, **28**(1): 45-50.
- OMS. 2010. Drépanocytose : une stratégie pour la région Africaine de l'OMS. Comité Régional de l'Afrique.

- Railson H, Michel FO, Aline EFF, Priscila H, Aguinaldo JDN, Maria SSL. 2013. Protective effect of flavonoids against reactive oxygen species production in sickle cell anemia patients treated with hydroxyurea. *Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia*, **35**(1): 52-55.
- Diop SM. 2012. Enquête ethnobotanique sur la prise en charge de la drépanocytose à Dakar et à Fatick. Thèse de Pharmacie Université Cheikh Anta Diop de Dakar.
- Sofowora EA, Isaac-Sodeye WA, Ogunkoya LO. 1975. African medicinal plants isolation and characterization of an anti-sickling agents from *Fagara zanthoxyloides* root. *Lloydia*, **34**: 169-174.
- Steinberg MH, Barton F, Castro O, Pegelo CH. 2003. Effect of Hydroxyurea on Mortality and Morbidity in Adult Sickle Cell Anemia: Risks and Benefits Up to 9 Years of Treatment. *Journal of the American Medical Association*, **289**: 1645-1651.