

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AMPc :	adénosine monophosphate cyclique
AVC :	Accident vasculaire cérébral
DésoxyHbs :	Désoxyhémoglobine S
DPG :	Diphosphoglycérate
EDTA :	Ethylène diamine tétraacétique
GR :	Globule rouge
Hb :	Hémoglobine
Hb A :	HémoglobineA
Hb F :	Hémoglobine foetale
HbS :	Hémoglobine S
HLA :	human leukocyte antigen
ICAM :	Intercellular Adhesion Molecule
IRM :	Imagerie par résonance magnétique
ISCs:	Irreversibly Sickled Cells
NADPH:	Nicotinamide adenine dinucléotide
NaCl :	Chlorure de sodium
NO :	Monoxyde d'azote
Pa :	Pascal
pH :	Potentiel hydrogène
PO2 :	Pression partielle de l'oxygène
SCA :	Sickle cell anemia
TFA :	Anhydride trifluoroacétique
OMS :	Organisation mondiale de la santé
VIH :	Virus de l'immunodéficience humaine

LISTES DES FIGURES

Figure 1: Mécanisme de nucléation et de croissance.....	6
Figure 2: Hémoglobine cristalline en faisceaux d'aiguilles.....	7
Figure 3 : drépanocyte rempli de fibres de HbS.....	7
Figure 4 : effet de forme sur l'écoulement des globules suspendus dans le Plasma.....	8
Figure 5: déformation des globules dans la microcirculation.....	9
Figure 6: effet de l'hématocrite sur la viscosité sanguine.....	9
Figure 7: cercles vicieux de la drépanocytose.....	13
Figure 8 : structure de l'hémoglobine.....	16
Figure 9 : Physiopathologie de l'anémie drépanocytaire.....	17
Figure 10: les drépanocytes se groupent en rosettes sur une plaque autour des cellules endothéliales.....	19
Figure 11 : Physiopathologie de l'anémie drépanocytaire.....	20
Figure 12 : obstruction de vaisseau par des drépanocytes.....	22
Figure 13: drépanocytes.....	28
Figure 14: elliptocytes.....	29
Figure 15 : falciformation type Baledent.....	29
Figure 16 : résultats du test de falciformation.....	30
Figure 17 : Description botanique d' <i>hibiscus sabdariffa</i>	46
Figure 18 : appareil électrophorétique Minicap.....	57
Figure 19 : Balance de précision.....	60
Figure 20 : Distillateur.....	60
Figure 21 : Broyeur RM 100.....	61
Figure 22 : Evaporateur rotatif.....	61
Figure 23 : Microscope binoculaire.....	62
Figure 24 : Rhéomètre cône-plan.....	62
Figure 25 : <i>Hibiscus sabdariffa</i> , variété <i>sabdariffa</i>	64

Figure 26 : Schéma du processus de préparation de l'extrait d'hibiscus sabdariffa.....	67
Figure 27 : Illustration de résultats de tests d'Emmel.....	72
Figure 28 : Nombre moyen de drépanocytes par champ à l'état basal.....	77
Figure 29 : Effets de l'extrait d'Hibiscus sabdariffa (1 mg/ml).....	78
Figure 30 : Effets de l'extrait d'Hibiscus sabdariffa (10^{-1} mg/ml)	79
Figure 31 : Effets de l'extrait d'Hibiscus sabdariffa (10^{-2} mg/ml).....	80
Figure 32 : Effets dose-dépendants de l'extrait d'Hibiscus sabdariffa.....	81
Figure 33 : Valeur moyenne de la viscosité sanguine à l'état basal des AS, SS et AA.....	82
Figure 34 : Effet de l'extrait d'Hibiscus sabdariffa à 1 mg/ml sur la viscosité sanguine des AS.....	83
Figure 35 : Effet de l'extrait d'Hibiscus sabdariffa à 1 mg/ml sur la viscosité sanguine des SS.....	84
Figure 36 : Effet de l'extrait d'Hibiscus sabdariffa à 1 mg/ml sur la viscosité sanguine des AA.....	85
Figure 37 : Résultats cumulatifs des effets de l'extrait d'Hibiscus sabdariffa à 1 mg/ml.....	86

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Indications de l'hydroxyurée chez les adultes drépanocytaires atteints de formes graves.....	41
Tableau II : Indications de l'hydroxyurée chez les enfants drépanocytaires atteints de formes graves.....	42
Tableau III : Principales caractéristiques de l'extrait sec et de l'extrait hydroalcoolique d'<i>Hibiscus sabdariffa</i>	70

SOMMAIRE

<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>PREMIERE PARTIE : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</u>	4
Chapitre I : RHEOLOGIE DU SANG	5
I.1. Généralités	5
I.2. Modification moléculaire de l'hémoglobine S	5
I.3. Condition d'écoulement	8
I.4. Hématocrite	9
I.5. Hydratation des globules rouges	10
I.6. Facteurs plasmatiques	11
I.7. Altération du passage vasculaire	11
I.8. Modifications membranaires des globules rouges	11
Chapitre II : LA DREPANOCYTOSE	14
II.1. Généralités	14
II.2. Physiopathologie	15
II.2.1 Rappel sur la structure de l'hémoglobine	15
II.2.2. Polymérisation de l'hémoglobine et falciformation	16
II.2.3. L'interaction des GR SS avec l'endothélium vasculaire	18
II.2.4. La crise vaso-occlusive et ces conséquences	21
II.3. Diagnostic	25
II.3.1. Signes cliniques	25
II.3.2. Signes biologiques	28
II.4. Traitement	32
II.4.1. Médecine moderne	32
II.4.2. Phytothérapie	44
Chapitre III : Rappel bibliographique sur Hibiscus sabdariffa	45
III.1. Dénomination	45
III.2. Description de la plante	45

III.3.Classification.....	46
III.4. Composition chimique des calices.....	47
III.5.Utilisations.....	50
DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL.....	51
I. Matériels et méthodes.....	52
I.1. Cadre d'étude.....	52
I.2. Population d'étude.....	52
I.3. Les prélèvements.....	53
I.4. Matériels.....	53
I.5. Déroulement du protocole.....	66
I.5.1. Préparation des extraits bruts d'Hibiscus sabdarrifa.....	66
I.5.2. Caractérisation de l'activité antifalciformante de l'extrait.....	71
I.5.3. Mesure de la viscosité sanguine.....	75
I.6. Analyses statistiques.....	76
II. Résultats.....	77
III. Discussion.....	87
Conclusion.....	92
Références bibliographiques.....	96



INTRODUCTION

La drépanocytose ou anémie falciforme est une maladie génétique touchant les globules rouges. Elle constitue un véritable fléau et reste la plus fréquente des hémoglobinopathies affectant plus de 4% de la population mondiale [OMS ., 2006]

Sa prévalence sur le continent Africain atteint 5% à 7% de la population et sa fréquence est maximale en Afrique sub-saharienne [Gentilini et al., 1986] où elle constitue un véritable problème de santé publique. Au Sénégal, Les études épidémiologiques effectuées en milieu scolaire ont retrouvé une prévalence de 10% de porteur de l'hémoglobine S [Gaye et al ., 1986].

La meilleure connaissance de la maladie a entraîné d'incontestables progrès depuis trente ans tant au plan fondamental que clinique.

Cette pathologie est caractérisée par des perturbations hémorhéologiques. Parmi celles-ci, on trouve une hyperviscosité sanguine chez les porteurs du trait drépanocytaire (AS) en revanche chez les drépanocytaires SS, on note une diminution de la viscosité sanguine comparée aux porteurs du trait drépanocytaire [Lemonne et al .,2012].

On note également une agrégation érythrocytaire légèrement augmentée et une déformabilité érythrocytaire légèrement diminuée par rapport à des sujets à hémoglobine normale (HbA) [Connes et al ., 2008 ; Connes et al .,2005].

Ces anomalies pourraient être partiellement liées à un stress oxydant plus important chez les porteurs du trait drépanocytaire par rapport aux sujets à hémoglobine normale [Ray et al ., 2007]. Plusieurs auteurs ont avancé l'hypothèse selon laquelle ces désordres hémorhéologiques pourraient être à l'origine des rares complications observées à l'exercice dans cette population [Tripette et al., 2007 ; Austin et al.,2007] mais aussi favorables à des complications de type thromboembolique [Austin et al .,2009 ;Austin et al., 2007] ou encore oculaire comme dans le cas des hyphema traumatiques [Connes et al. 2008]. Néanmoins, la majorité des porteurs du trait drépanocytaire sont asymptomatiques [Ascroft et al., 1976].

Par ailleurs, une étude a montré qu'une préparation obtenue à partir de 2 plantes, *Fagara xanthoxyloides* (*Rutaceae*) et *Calotropis procera* (*Asclepiadaceae*), traditionnellement utilisée dans le traitement de la drépanocytose ; présentait des propriétés antifalciformantes, anti-inflammatoires, analgésiques, antipyrétiques et myorelaxantes (Bruneton et al., 2009). Ces propriétés ont été évaluées non seulement sur la recette, mais également sur chaque plante prise séparément à partir des extraits aqueux et hydro-alcooliques très riche en polyphénols et les résultats obtenus sont satisfaisants [Lyons et al., 2005].

Des études ont également rapporté qu'*Hibiscus sabdariffa* (*Malvaceae*) , une plante à usage alimentaire fréquemment utilisée en Afrique connue pour ses propriétés thérapeutiques notamment sur les maladies cardiovasculaires, était riche en polyphénols et possédait des propriétés vasorelaxantes [Sakaly et al. 2008 ; Cissé et al. 2008].

L'objectif général de notre étude est de caractériser les effets hémorhéologiques et antifalciformantes *in vitro* d'extraits bruts d'*Hibiscus sabdariffa* chez des sujets porteurs du trait drépanocytaire AS et des sujets drépanocytaires SS.

Les objectifs spécifiques consistent à :

1. Déterminer les propriétés antifalciformantes par la réalisation d'un test d'Emmel en présence et en absence d'extrait d'*Hibiscus sabdariffa*.
2. Déterminer le niveau de viscosité sanguine des sujets porteurs du trait drépanocytaire AS et des sujets drépanocytaires SS en présence et en absence d'extrait d'*Hibiscus sabdariffa*.



PREMIERE PARTIE :

RAPPELS

BIBLIOGRAPHIQUES

Chapitre I : RHEOLOGIE DU SANG

I.1. Généralités

La rhéologie décrit l'écoulement de tout type de matériau, en particulier des fluides, incluant leurs caractéristiques propres et celles des canaux par lesquels ils s'écoulent. **Poiseuille [1841]** démontre que l'écoulement volumétrique est directement proportionnel à la différence de pression le long d'un tube et à la quatrième puissance du rayon du tube soit: $R = \frac{8\eta l}{7\pi r^4}$, si r est constant (" η " est le coefficient de viscosité). Les unités utilisées sont le Pascal-seconde [**Pa·s**], d'anciennes unités sont toujours utilisées, le Poiseuille [**1 Pl = 1 Pa·s**] ou la poise [**1 Po = 0,1 Pl = 0,1 Pa·s**].

I.2. Modification moléculaire de l'hémoglobine S

Le milieu intra-érythrocytaire est un fluide paracristallin de haute viscosité. Les 270 millions de molécules d'Hb contenues dans chaque hématie sont pratiquement en contact les unes avec les autres; des forces répulsives les empêchent de polymériser. **Murayama [1966]** énonce les premières hypothèses concernant les bases moléculaires de la gélation de la désoxyHbS en structures fibreuses tubulaires, à l'intérieur des hématies: les molécules échangent des liaisons et forment un gel constitué de longues chaînes [**Murayama et al., 1966**] déformant les globules en forme de faucille.

Après désoxygénation la cinétique de la gélation de HbS est en accord avec un seuil de nucléation [**Behe et al. , 1978**]. **Hofrichter et al. [1974]** l'interprètent en terme de limite de nucléation, suivie de croissance rapide des microtubules.

Les agrégats pré nucléaires, cinétiquement instables, sont susceptibles de dissociation rapide, si ce n'est qu'à l'étape de formation du noyau (HN) la réversibilité est abolie et le noyau capable de soutenir une croissance rapide.

Le schéma le plus simple pour produire un noyau suffisant, implique l'adjonction séquentielle de molécule d'HbS à un nombre grandissant d'ensembles de pré nucléation (fig. 1).

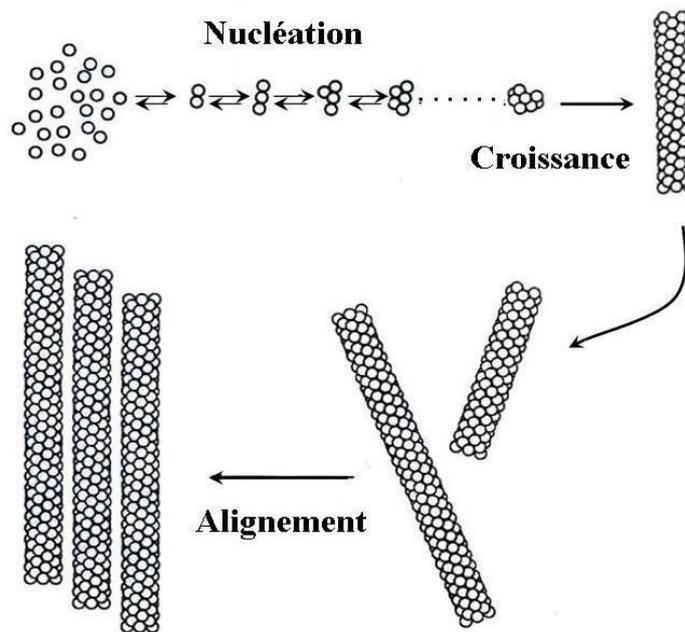


Figure 1: mécanisme de nucléation et de croissance [modifié de Dean et al., 1978]

- **L'hémoglobine S dans les globules rouges entraîne trois conséquences:**
 - la diminution de la solubilité de l'Hb par réduction de la saturation en O₂ entraînant la formation d'agrégats polymériques et de fibres de molécules d'HbS qui déforment et fragilisent les érythrocytes;
 - les agrégats polymériques d'HbS dans les globules fixent peu ou pas d'oxygène (la diminution de l'affinité pour O₂ des globules porteurs de l'HbS est aggravée par l'élévation importante de la 2,3-DPG);
 - la rigidification des globules par polymérisation intracellulaire des molécules d'HbS (fig. 2; 3).

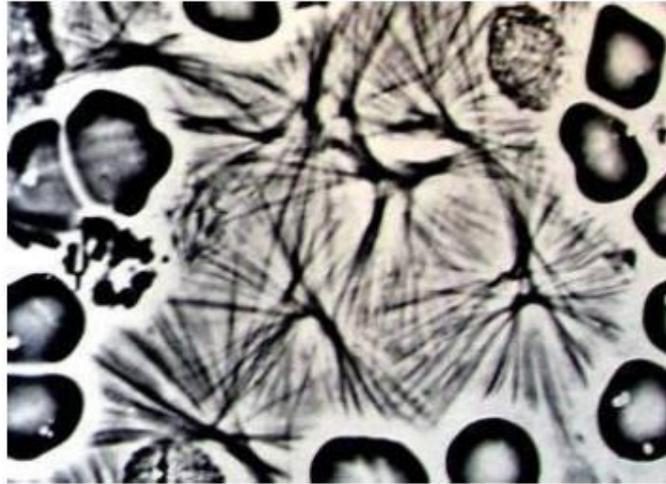


Figure 2: hémoglobine cristalline en faisceaux d'aiguilles [Bessis et al., 1958]

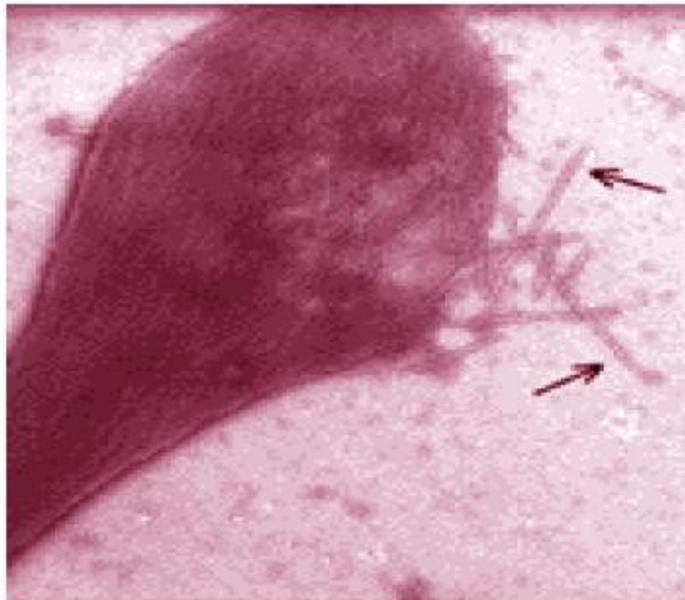


Figure 3: drépanocyte rempli de fibres de HbS (plusieurs fibres (flèches) perforent la paroi cellulaire, gel formé de cristaux allongés longs de 1 à 15 μm . [Lewis et al., 1994; Barrère et al., 2001]

I.3. Condition d'écoulement

Si les hématies s'allongent et s'effilent "en bancs de poissons" leur profil altère peu la dynamique de l'écoulement et permet aux hématies de franchir des vaisseaux de petit calibre.

La viscosité fonction de la désoxygénation présente une hystérèse dans les cycles de "gelling/ungelling" [Briehl et al., 1994]. Une rhéologie anormale des drépanocytes régule le débit dans la microcirculation.

La drépanocytose, par polymérisation de la désoxyHbS sous forme d'un gel extrêmement visqueux rend les érythrocytes susceptibles d'obstruer la microvascularisation [Evans et al., 1984; Wang et al., 2002]. Les ISC ("Irreversibly Sickled Cells"), rigides, tourbillonnant en tous sens, créant des rouleaux, sont très anormales sur le plan rhéologique: peu déformables, susceptibles d'adhérer à l'endothélium, surtout dans les secteurs vasculaires soumis à inflammation. Plus important que sa dimension réelle, le "volume efficace" d'une particule dépend de sa forme et de son comportement dans le courant: l'asymétrie et les oscillations augmentent le volume du milieu affecté et son influence sur la viscosité (fig. 4, 5); [Baskurt et al., 2003].

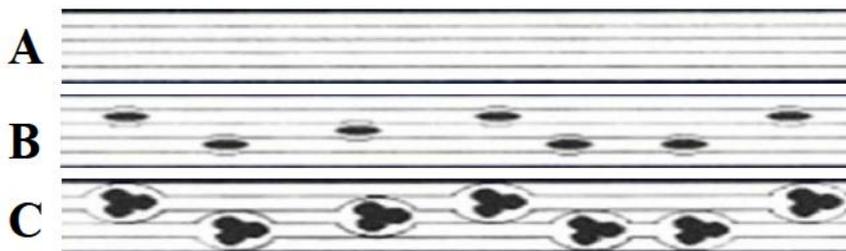


Figure 4: effet de forme sur l'écoulement des globules suspendus dans le plasma

(A) écoulement du plasma sans globule (écoulement laminaire)

(B) distorsion minime (globules déformables)

(C) écoulement tourbillonnaire (agrégats de globules, volume affecté)

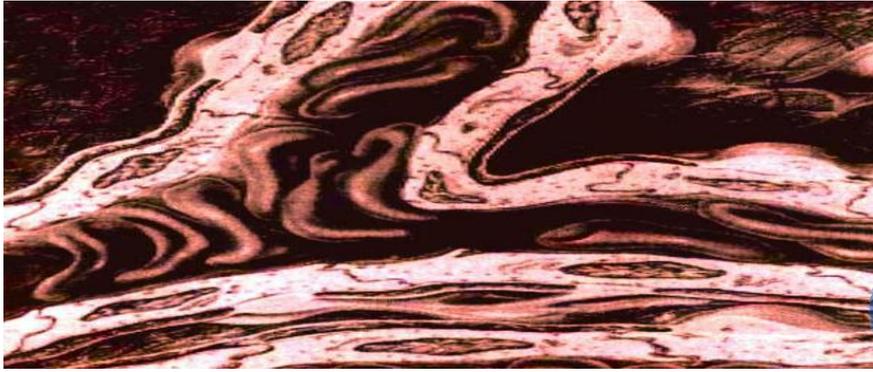


Figure 5: déformation des globules dans la microcirculation [Baskurt et al., 2003]

I.4. Hématocrite

La viscosité du sang est liée à la valeur de l'hématocrite, à la viscosité du plasma (phase portante) et aux propriétés rhéologiques des globules (99% des éléments cellulaires (fig. 6) ; [Baskurt et al., 2003]. Pour un hématocrite de 25%, une diminution de la saturation en O₂ de 92% à 46% augmente peu la viscosité, alors qu'à une valeur d'hématocrite de 45%, une réduction semblable de la saturation d'oxygène augmente significativement la viscosité.

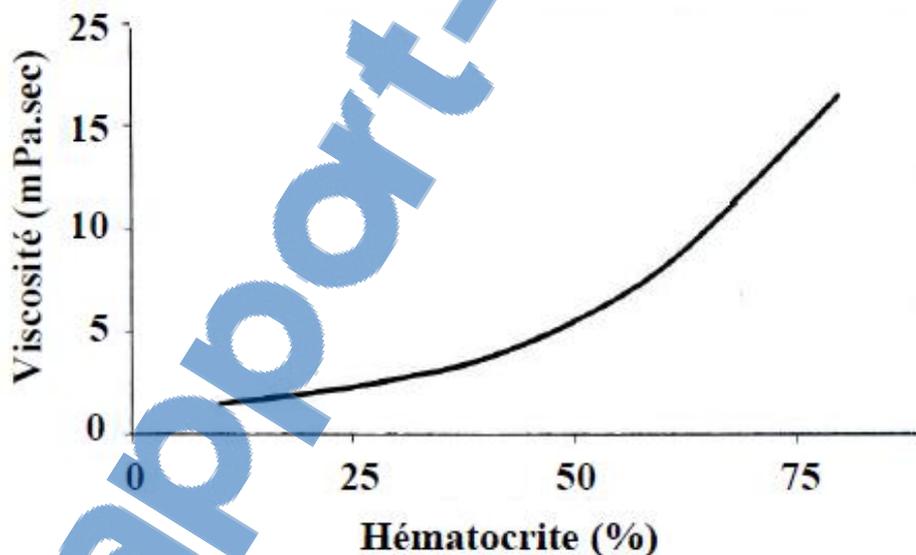


Figure 6: effet de l'hématocrite sur la viscosité sanguine [modifié de Baskurt et al., 2003]

I.5. Hydratation des globules

Les propriétés rhéologiques des drépanocytes déshydratés ne sont que partiellement réversibles par hydratation, suggérant des changements squelettiques membranaires permanents, impliqués dans le processus de rigidification. Néanmoins, la réduction de la concentration d'hémoglobine de cellule par leur dilatation ou la prévention de la génération de cellules déshydratées devrait améliorer leur compétence rhéologique.

Clark et al. [1980] étudient la déformabilité cellulaire de populations de ISC pour conclure que la déshydratation et l'augmentation de la viscosité interne sont responsables des anomalies rhéologiques, progressives et cumulatives.

La concentration d'hémoglobine cytoplasmique semble avoir un effet prépondérant. La déshydratation influence la rigidité en augmentant la concentration d'hémoglobine via un gel réversible de l'hémoglobine associé à la membrane, en augmentant sa viscosité cytoplasmique. Le risque augmenté de polymérisation dans les cellules est la conséquence du temps de transit plus long dans des zones de basse tension d'oxygène: les cellules rigides retardent ou bloquent l'écoulement capillaire [**Linderkamp et al., 1982**] par:

- liaison augmentée de HbS avec la membrane, aux concentrations d'hémoglobine élevées, formant un gel;
- une augmentation du "cross-link" des protéines squelettiques.

Propriété rhéologique importante, la récupération de la forme cellulaire après déformation lente (quelques minutes) évalue la tendance des cellules à maintenir une déformation permanente, plus longue que le temps de transit capillaire, qui pourrait être impliquée dans la production d'ISCs. La rhéologie anormale du drépanocyte peut changer cette distribution et, dans les cas sévères, provoquer une occlusion capillaire, quand leur déformation devient irréversible. Les contributions relatives de la membrane et du cytoplasme dans la déformabilité des drépanocytes sont mal connues.

Il est vraisemblable que la déformabilité module le taux d'admission des érythrocytes dans les capillaires et influence la perte de pression quand ils sont de calibre inférieur au diamètre de la cellule [Evans et al., 1984].

I.6. Facteurs plasmatiques

Un taux élevé de fibrine augmente la viscosité plasmatique et favorise rouleaux et agrégats cellulaires. Dans le même sens, agissent les protéines inflammatoires déséquilibrant l'électrophorèse des protéines [Baskurt et al., 2003].

A l'inverse, la diminution de l'albumine, souvent observée au cours de l'hyperviscosité, est également active, facilitant l'interaction cellulaire et les désordres ioniques au niveau des membranes des cellules.

I.7. Altération du passage vasculaire

Au niveau des capillaires, tout concourt à réaliser de mauvaises conditions rhéologiques: hémocrite élevé, pO₂ basse (25 à 40 mmHg), temps de transit long, pouvant conduire à la gélotion de HbS et à la falciformation en un temps extrêmement court. L'altération majeure du sang drépanocytaire est la diminution de la déformabilité des globules, par polymérisation de HbS, à ses lésions membranaires et à l'hyperviscosité liée à l'augmentation de la concentration intracellulaire des molécules d'hémoglobines polymérisées.

I.8. Modifications membranaires des globules rouges

La principale manifestation de l'atteinte membranaire par la falciformation est une déformation du globule, due à la polymérisation de l'hémoglobine, affectant la membrane mécaniquement fragilisée.

Les propriétés rhéologiques qui caractérisent l'érythrocyte incluent la déformabilité de la membrane (rigidité statique) et un "recoverability factor" qui décrit le comportement anélastique après déformation, réduit pour les cellules déshydratées. Le facteur "récupération", mesure de l'étendue du comportement anélastique.

Un gel d'hémoglobine, réversible, adjacent à la membrane serait responsable du comportement anélastique. **Eisinger et al [1982]** ont montré que la concentration en hème dans la couche limite membraneuse était plus grande que celle à l'intérieur de cellule. Les agressions morphologiques répétées s'accompagnent d'un phénomène de vésiculation de la membrane, comparable à un vieillissement accéléré: les lésions deviennent rapidement irréversibles (la maladie est qualifiée de "maladie de la membrane érythrocytaire" [**Hebel et al., 1980; Allen et al., 1981**]). Au début l'agression mécanique de la membrane des drépanocytes par les cristaux d'hémoglobine, conduit à des lésions partiellement réversibles. Les agressions morphologiques répétées vont lentement entraîner une rigidification complète et irréversible. Elle est aussi considérée comme une "maladie rhéologique". La polymérisation de HbS dans le globule rouge induit des modifications de la membrane. La déformation physique de la cellule entraîne la libération des microvésicules [**Eaton et al., 1979; Evans et al., 1984**]. L'évaluation des réponses aux déformations pourrait aider à comprendre les rôles relatifs de la membrane et du cytoplasme dans la rhéologie cellulaire. La rigidité, la déformabilité cellulaire dépendent de facteurs intrinsèques et extrinsèques. Les variables importantes qui influencent les propriétés micro-rhéologiques des globules normaux et des drépanocytes sont les propriétés intrinsèques.

Elles incluent l'extension membranaire et la déformabilité, la réponse en valeur temps de la membrane à l'extension et à la déformation, la récupération de forme après déformation et les propriétés cytoplasmiques (viscosité et élasticité). Les érythrocytes pénétrant dans de petits capillaires sont étirés, "tordus et pliés", déformations qui produisent:

- une extension de la membrane sans changement de surface (carré devenant rectangle sans changer d'aire);
- une extension ou torsion membranaire;
- un cisaillement du cytoplasme.

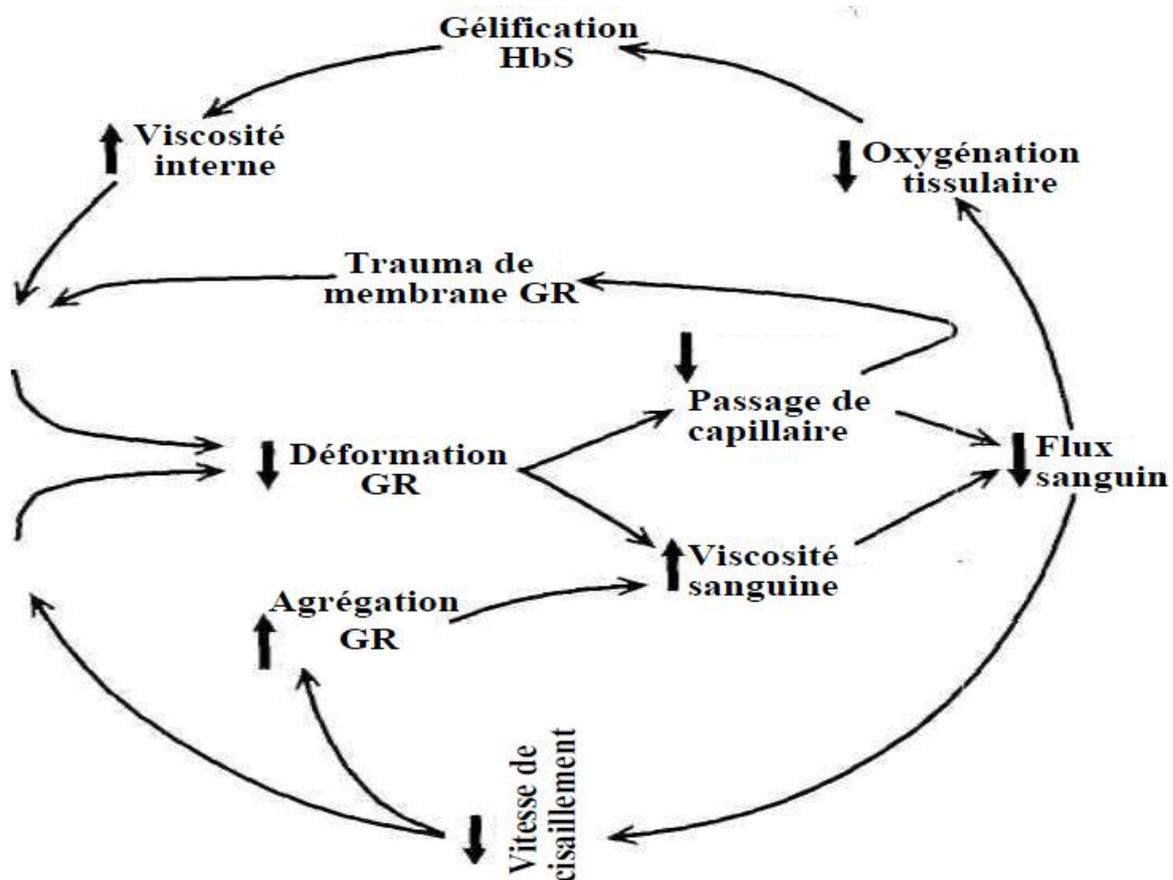


Figure 7: cercles vicieux de la drépanocytose [modifié de Chien, 1977]

Chapitre II : LA DREPANOCYTOSE

II.1. Généralités

La drépanocytose ou sickle-cell anemia (SCA) a été décrite pour la première fois en 1910 par JB Herrick à Chicago aux USA chez un étudiant noir Jamaïcain. Elle est l'hémoglobinopathie génétique la plus répandue. Selon l'OMS on estime qu'environ 100 millions d'individus portent le trait drépanocytaire et qu'il naît chaque année au moins 100.000 enfants homozygotes SS dans le monde. Les migrations néandertaliennes et bantous de l'ère chrétienne expliquent selon H. Lehmann la répartition mondiale et africaine de la tare. Sur le plan hématologique, la drépanocytose est caractérisée par la présence d'une hémoglobine S qui diffère par sa structure et ses propriétés de l'hémoglobine normale. Cette hémoglobine se définit sur le plan biochimique par la substitution de l'acide glutamique par la valine en position 6 de la chaîne Bêta de la globine. A pH alcalin, l'hémoglobine S migre plus lentement que l'hémoglobine A1 ;

ce qui permet de l'identifier facilement. Les sujets porteurs homozygotes de la tare possèdent une fraction hémoglobinique majoritaire constituée de l'hémoglobine S ; les porteurs hétérozygotes possèdent deux fractions : une fraction A1 et une fraction S. Les hématies drépanocytaires présentent la propriété de prendre une forme particulière évoquant une faucille ou un croissant de lune lorsqu'elles sont privées d'oxygène. Cette déformation est réversible dès que le sang est oxygéné suffisamment et les hématies reprennent leur forme discoïde normale. Les drépanocytes sont des cellules rigides peu adaptées à la circulation dans les petits vaisseaux ; leur présence à un pourcentage élevé peut provoquer des thromboses susceptibles d'entraîner des infarctus ou des nécroses ischémiques. Les médecins africains et le personnel sanitaire ayant à charge les enfants doivent connaître les particularités diagnostiques et thérapeutiques de cette maladie génétique [M Beyeme Owono et al ., 2004].

II.2. Physiopathologie

II.2.1. Rappel sur la structure de l'hémoglobine

L'hémoglobine est une protéine (chaîne d'acides aminés) complexe pigmentée située dans les globules rouges et responsable de la couleur rouge du sang des vertébrés. Elle est constituée de deux paires de chaînes de globuline (aspect tridimensionnel de globe, les plus grosses protéines du sang par opposition à l'albumine qui évoque étymologiquement le blanc de l'oeuf : albus en latin voulant dire blanc d'où albinos...) et de 4 molécules métallo organiques (tout ce qui est à base de carbone, d'hydrogène, d'oxygène et d'azote) appelées hème ayant en leur centre un ion ferreux Fe^{2+} à l'état normal (ou ferrique Fe^{3+} donnant la méthémoglobine pathologique), responsable du transport du dioxygène O_2 par les globules rouges (hématies) destiné aux tissus des organismes vivants en vue des réactions d'oxydation indispensables à la vie. On parle ainsi du pouvoir oxyphorique (transport de dioxygène) de l'hémoglobine. Ceci correspond à la quantité de dioxygène (O_2) qu'elle peut fixer. Cette valeur est d'environ 1,34 ml d' O_2 /g d'hémoglobine. On distingue des chaînes de globuline α , β , γ , δ . L'hémoglobine normale de l'Adulte est constituée de 2 chaînes alpha et de 2 chaînes bêta. Elle est symbolisée par HbA1 qui représente 98%, les 2% restants sont constitués d'hémoglobine HbA2 constituée de 2 chaînes alpha et de 2 chaînes delta. Chez le fœtus et le nouveau-né, on a deux chaînes alpha et deux chaînes gamma de globuline, c'est l'hémoglobine fœtale HbF, qui a la propriété d'avoir une plus grande affinité pour le dioxygène

[www.togocity.com/IMG/pdf/DREPANOCYTOSE].

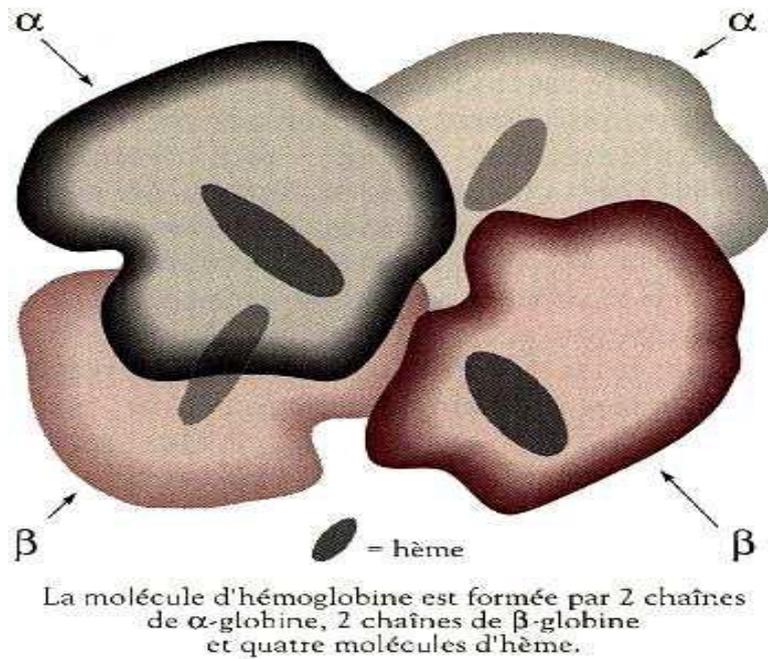


Figure 8 : structure de l'hémoglobine

II.2.2. Polymérisation de l'hémoglobine et falciformation

Par une mutation ponctuelle du codon 6 du gène de la globine bêta du chromosome 11, une valine hydrophobe s'est substituée à la glutamine hydrophile dans l'hémoglobine falciforme HbS. Les globines étant entourées par un film d'eau, la présence d'un site hydrophobe crée un point de "collage" entre deux molécules d'hémoglobines voisines. Celui-ci s'établit entre la leucine 88 et la phénylalanine 85 d'une chaîne alpha d'une molécule d'hémoglobine et la valine 6 de la chaîne b de l'hémoglobine voisine, d'où création d'une structure cristalline en fibres.

Met	Val	His	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	HbA
ATG	GTG	CAC	CTG	ACT	CCT	GAG	GAG ...	
ATG	GTG	CAC	CTG	ACT	CCT	GTG	GAG ...	
Met	Val	His	Leu	Thr	Pro	Val	Glu	HbS

En raison des interactions hydrophobes de l'HbS dans son état désoxygéné, les molécules d'hémoglobine se polymérisent et interagissent également avec la membrane des érythrocytes, formant ainsi les hématies falciformes. Celles-ci présentent une résistance mécanique et une élasticité amoindries, et mènent à l'occlusion vasculaire et à l'hémolyse (figure 9). Le porteur hétérozygote d'HbS, quant à lui, possède suffisamment d'HbA pour contrer la polymérisation dans l'état désoxygéné [Steinberg et al., 2006 ; Redding et al., 2006]. Depuis quelques années, on sait comment les érythrocytes, dans un processus continu d'hémolyse, interfèrent avec le métabolisme du monoxyde d'azote (NO) de l'endothélium vasculaire.

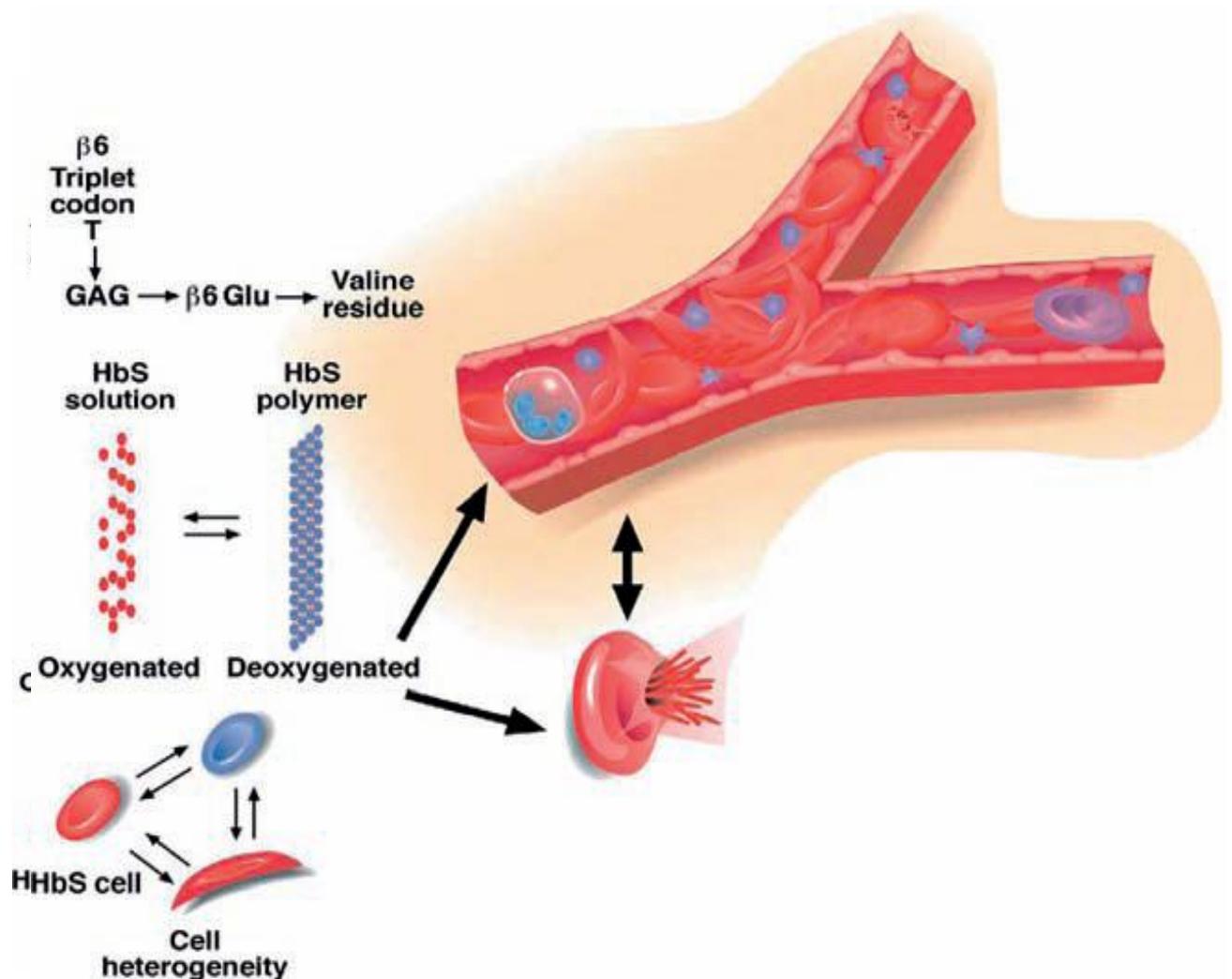


Figure 9 : Physiopathologie de l'anémie drépanocytaire.

L'hémoglobine drépanocytaire HbS présente une mutation ponctuelle dans le sixième codon du gène de la globine bêta sur le chromosome 11, substituant la valine hydrophobe à la glutamine, qui est un acide aminé hydrophile. A l'état désoxygéné, les molécules d'HbS se polymérisent et mènent à la formation d'érythrocytes falciformes, dont la moindre résistance mécanique favorise la vaso-occlusion et l'hémolyse [Gaye et al . ,1986].

II.2.3. L'interaction des globules rouges SS avec l'endothélium vasculaire

L'adhésion des hématies aux cellules endothéliales déclenche des crises, souvent répétées. Le concept d'interaction entre drépanocytes et endothélium a été avancé [Hebbel et al., 1980], suggérant un lien entre la nature inflammatoire de la drépanocytose et l'état microvasculaire. L'hypoxie ou un état inflammatoire, augmentent les interactions à caractère adhésif dans le complexe endothélium-leucocytes-érythrocytes à l'étage post-capillaire, amorçant l'occlusion.

La forme et la rigidité des érythrocytes drépanocytaires sont tenues responsables des occlusions microvasculaires sans que n'existe pour autant une corrélation entre l'expression clinique et la présence de globules falciformés [Hebbel et al., 1980].

Le drépanocyte pourrait adhérer plus à l'endothélium que les globules normaux: sur les plaques de culture les globules normaux sont distribués au hasard, alors que les drépanocytes se groupent autour des cellules endothéliales. L'adhérence du drépanocyte augmente considérablement avec la densité cellulaire, phénomène qui s'expliquerait par l'accumulation de dommages membranaires en cours de vieillissement [Rice-Evans et al., 1986]. Les drépanocytes adhèrent aux groupes de cellules endothéliales confluentes (fig.10) [Hebbel et al., 1980].

Dans la micro circulation, cette attraction peut prolonger le temps de passage des globules, favoriser l'hypoxie et amorcer le "sickling" [Kaul et al., 2004]. L'augmentation de l'AMPc intracellulaire accroît l'adhésion des GRs SS, sans affecter les globules normaux. Parmi la famille ICAM de protéines adhésives, ICAM-4 est unique dans son expression sur les cellules rouges. ICAM-4 s'attache à un réseau d'intégrines, plusieurs αV intégrines, $\beta 2$ intégrines et $\alpha 4\beta 1$ intégrines, suggérant de multiples fonctions pour cette molécule d'adhésion.

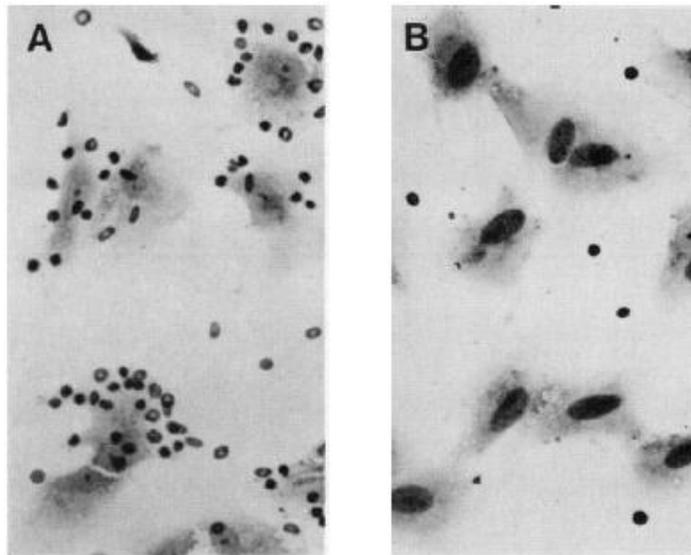


Figure 10: (A) les drépanocytes se groupent en rosettes sur une plaque autour des cellules endothéliales
(B) distribution (au hasard) des rares GR normaux restant après cinq lavages [Hebbel et al., 1980]

Divers processus, en particulier la liaison du NO avec l'HbS et l'arginase libérées dans le plasma après l'hémolyse, peuvent entraîner une forte chute de concentration de NO dans le système vasculaire. Comme le NO synthétisé par l'endothélium agit sur la musculature vasculaire lisse comme un puissant facteur de vasodilatation physiologique et d'inhibition de l'activation des thrombocytes, les basses concentrations de NO peuvent induire une vasoconstriction d'origine biochimique et une activation thrombocytaire accélérée chez le patient atteint de SCA (**fig. 11**) [Steinberg et al., 2006 ; Gladwin et al., 2005].

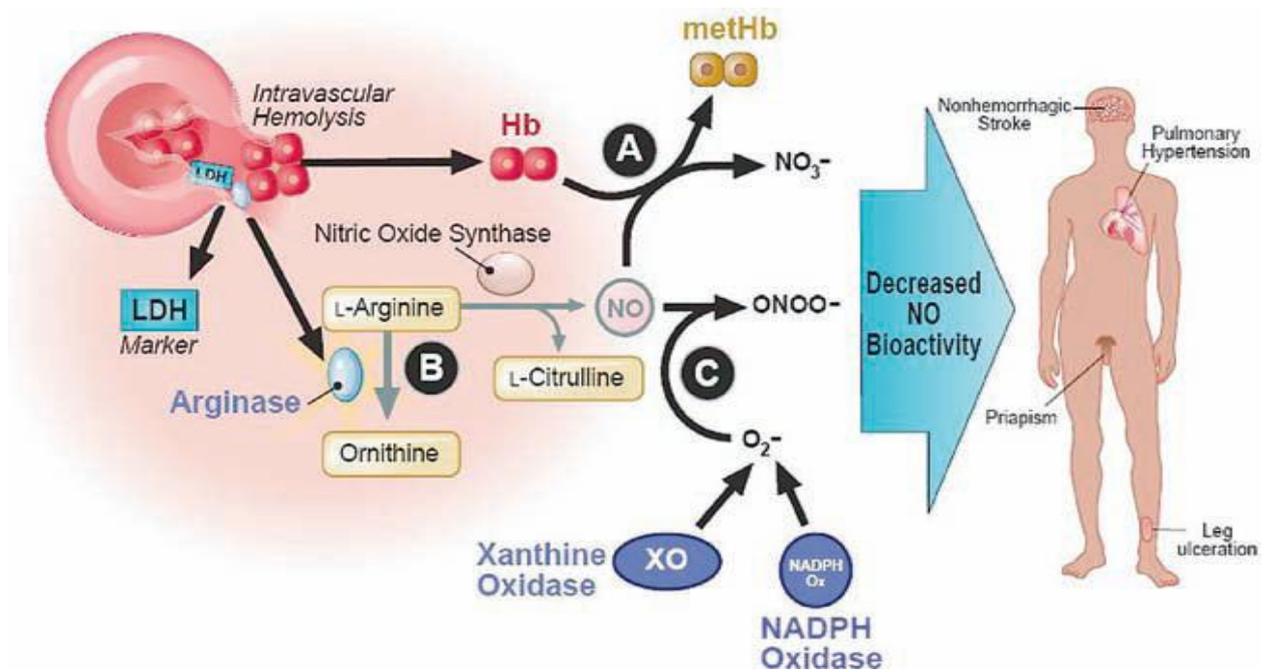


Figure 11 : Physiopathologie de l'anémie drépanocytaire

✚ Causes et effets de l'activité biologique réduite du NO dans l'endothélium, induite par l'hémolyse :

L'hémoglobine libre et l'arginase libérées par l'hémolyse se répandent dans le plasma. La liaison de l'hémoglobine libre au NO est environ 1000 fois plus forte que celle de l'hémoglobine intracellulaire. L'arginase dégrade l'arginine nécessaire à la synthèse du NO. De plus, le taux accru de xanthine-oxydase et de NADPH-oxydase (libérées par les hépatocytes nécrosés) dans le plasma y entraîne des concentrations élevées de radicaux d'oxygène, dont la réaction avec le NO produit du nitrite et du nitrate. La combinaison de ces processus provoque une forte chute de la concentration de NO. La réduction de la concentration du vasodilatateur NO dans les vaisseaux conduit à une vasoconstriction qui, au niveau clinique, peut à son tour entraîner l'infarctus cérébral, l'hypertension pulmonaire, le priapisme ou l'ulcération [Expere et al., 2001].

II.2.4. La crise vaso-occlusive et ces conséquences

Au cours de la drépanocytose, les globules rouges prennent une forme anormale de faucille. Cette déformation les rend rigides (alors qu'ils sont souples et déformables normalement) : ils peuvent former des « bouchons » et obstruer les petits vaisseaux sanguins dans lesquels les globules rouges normaux circuleraient sans problème. En empêchant le sang d'irriguer correctement les organes et donc de leur apporter suffisamment de nutriments et d'oxygène, ces obstructions sont responsables de crises vaso-occlusives.

Selon le lieu de l'obstruction, les organes qui ne sont plus ou mal irrigués sont différents:

- lorsqu'un os est touché : si l'obstruction est trop longue, l'os est privé d'oxygène pendant trop longtemps et des lésions irréversibles apparaissent: on parle d'infarctus osseux ou d'ostéonécrose.

A terme, et si la zone touchée est proche d'une articulation, l'ostéonécrose peut entraîner une déformation de l'articulation ce qui conduit à l'arthrose.

- lorsque les vaisseaux des os des mains et des pieds sont bouchés, cela provoque le syndrome pied-main.
- Lorsqu'une ou des artères des poumons sont bouchées (thrombose artérielle pulmonaire), cela provoque le syndrome thoracique aigu. Celui-ci peut également apparaître suite à une infection (surtout chez l'enfant), ou à la combinaison d'une obstruction des artérioles et d'une infection. Ce phénomène est une complication grave de la maladie car les poumons n'exercent plus efficacement leur fonction qui est de fournir de l'oxygène à tous les organes du corps.

[www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/Drepanocytose-FR.pdf / Mars 2011]

Lorsque les vaisseaux qui amènent le sang au cerveau sont obstrués, ce dernier n'est plus assez oxygéné ce qui peut provoquer des accidents graves, appelés accidents vasculaires cérébraux (AVC) ou « attaques cérébrales ».

Ces AVC peuvent correspondre à un arrêt de la circulation dans le cerveau (ischémie).

Les manifestations sont souvent transitoires lorsque le vaisseau obstrué se débouche rapidement (on parle d'accident ischémique transitoire). Mais les AVC peuvent aussi être dus à la rupture d'un vaisseau du cerveau (une hémorragie cérébrale)

[www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/Drepanocytose-FRfrPub125v01.pdf / Mars 2011]

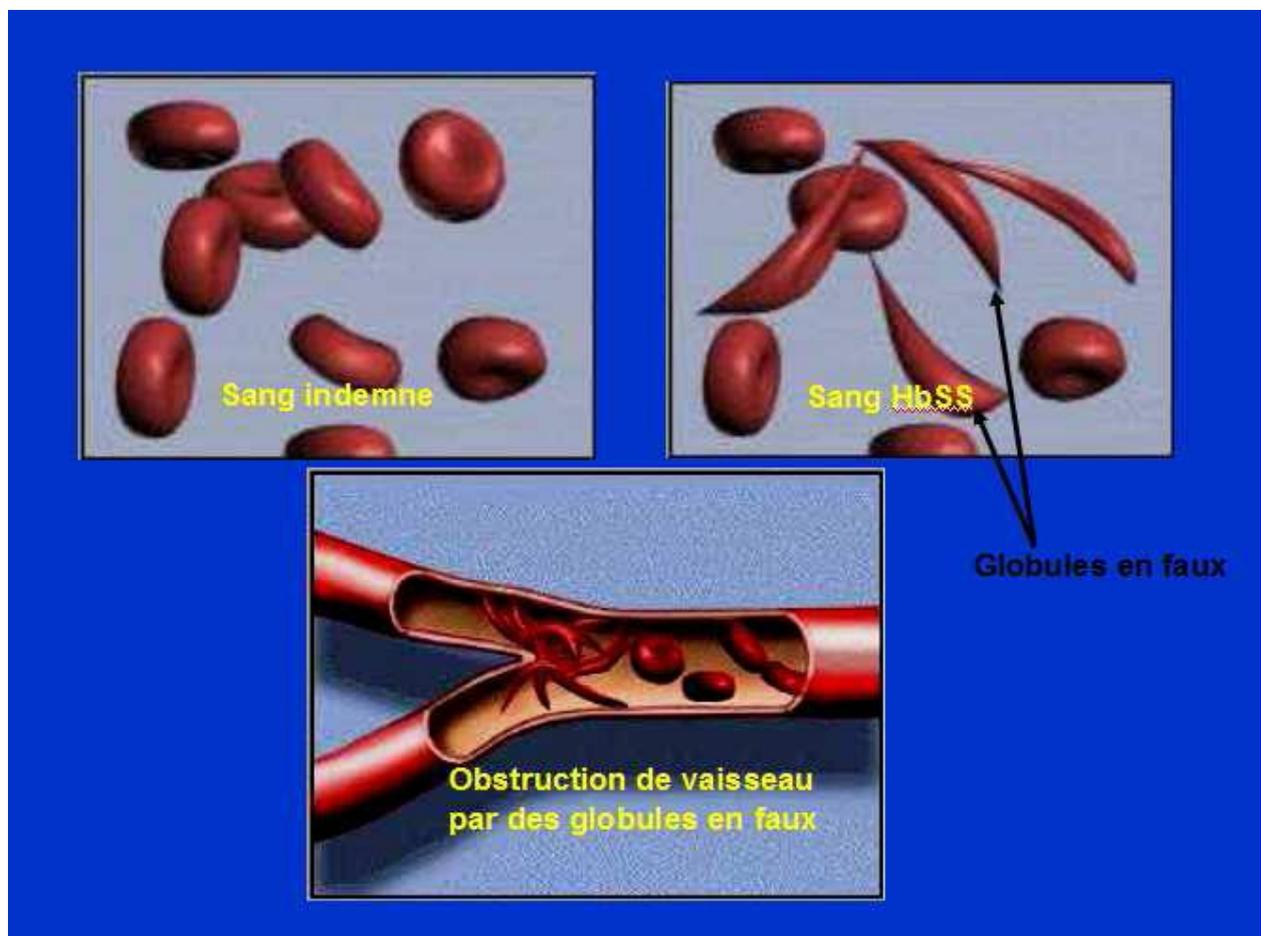


Figure 12 : obstruction de vaisseau par des drépanocytes

Susceptibilité accrue aux infections

Cela est dû au fait que la rate, qui a un rôle important dans le processus de défense contre les bactéries, est quasiment toujours endommagée chez les malades. En effet, chez une personne drépanocytaire, elle travaille beaucoup et finit par s'user ou par être elle-même victime d'un manque d'oxygène :

Elle ne remplit plus son second rôle qui est un rôle de défense contre certains microbes, un rôle de défense immunitaire (notamment le pneumocoque, responsables d'infections potentiellement graves). C'est ce déficit immunitaire qui provoque la susceptibilité accrue aux infections.

Complications chroniques

Les complications chroniques sont une conséquence des crises vaso-occlusives qui apparaissent pendant l'enfance. La répétition et l'accumulation de ces crises peuvent à la longue endommager les différents organes et entraîner des séquelles pulmonaires, cardiaques, rénales, oculaires, cutanées...

hypertension artérielle pulmonaire

L'atteinte des vaisseaux pulmonaires provoque à terme une résistance à l'écoulement du sang, ce qui oblige le cœur à « pousser » plus fort en augmentant la pression pour continuer à assurer une bonne circulation dans les poumons. C'est l'hypertension artérielle pulmonaire.

L'obstruction des petits vaisseaux peut être la conséquence directe des bouchons formés par les globules rouges falciformes. Mais elle peut également être due à une diminution du diamètre des artérioles : l'anémie qui est hémolytique (voir précédemment) provoque notamment une diminution de la quantité, dans le sang, de monoxyde d'azote (NO), une substance qui contribue normalement à la dilatation des vaisseaux sanguins (vasodilatateur).

❖ **atteinte cardiaque**

Soumis à cet effort, le cœur devient plus musclé ce qui permet un fonctionnement normal pendant quelques temps. Cette musculation augmente le volume du cœur et le débit de la pompe cardiaque augmente.

Chez certaines personnes, avec l'âge le cœur perd en efficacité (insuffisance cardiaque) et un traitement de soutien devient nécessaire.

❖ **atteinte rénale**

L'atteinte rénale s'explique également par l'obstruction par les globules rouges falciformes des vaisseaux sanguins contenus dans les reins. Le plus souvent, ce sont les fins vaisseaux sanguins (capillaires) localisés dans les parties des reins chargées de filtrer le sang pour fabriquer l'urine (les néphrons) qui sont touchés. Dans ce cas, l'atteinte rénale se traduit par une albuminurie, d'abord minime (microalbuminurie).

❖ **priapisme**

Il est dû à la thrombose des corps caverneux, et représente une complication non exceptionnelle à la période pubertaire. Il est très douloureux, d'une durée variable de 3 à 20 jours et peut conduire à la perte ultérieure de l'érection.

❖ **calculs**

La bilirubine est le pigment produit suite à la destruction des globules rouges fragiles. Son accumulation dans la vésicule biliaire provoque la formation de calculs biliaires.

❖ **hépatomégalie**

Le foie a un rôle central dans l'équilibre de l'organisme et, en particulier, sert à évacuer certains déchets ou toxines néfastes pour le corps, d'une part, et à fabriquer de nombreuses substances nécessaires à son fonctionnement, d'autre part. Au cours de la drépanocytose, plusieurs substances peuvent s'accumuler dans le foie (comme le fer) et provoquer une augmentation de son volume (hépatomégalie). La répétition des agressions peut aboutir à un dysfonctionnement du foie.

[www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/Drepanocytose-FRfrPub125v01.pdf / Mars 2011].

II.3. Diagnostic :

II.3.1. Signes cliniques

Elles sont polymorphes et varient en fonction des formes génétiques de la drépanocytose. Deux groupes sont ainsi définis :

- la drépanocytose hétérozygote AS
- les syndromes drépanocytaires.

a. Drépanocytose hétérozygote AS

Elle est également appelée « trait drépanocytaire ». Elle est typiquement asymptomatique. Certaines manifestations cliniques semblables à celles rencontrées dans les syndromes drépanocytaires peuvent être observées dans des conditions extrêmes d'hypoxie [KLAPISZ et al.,1993].

b. Syndromes drépanocytaires

b.1 Drépanocytose homozygote SS

Les manifestations cliniques apparaissent généralement 3 à 6 mois après la naissance, du fait du rôle protecteur de l'Hb F dans les premiers mois de la vie.

b.1.1 Manifestations aiguës :

Les plus fréquentes sont les crises vaso-occlusives, les crises de déglobulisation, les crises de séquestration et les crises aplasiques [KALLESTAL et al .,1989].

 **Les crises vaso-occlusives** : elles peuvent entraîner des complications thrombotiques ou infectieuses.

Au Sénégal 26% des enfants suivis à l'Hôpital d'enfants Albert ROYER ont présenté plus de trois crises dans l'année [Crawford et al.,1988].

- **Les manifestations douloureuses ostéo-articulaires** : elles sont la conséquence directe de l'obstruction des petits vaisseaux. On observe souvent le syndrome « pied main » qui se caractérise chez le jeune enfant au cours de la première année de la vie, par une tuméfaction aiguë et douloureuse du dos et des mains et des pieds.

- **Les manifestations douloureuses abdominales** : elles sont la conséquence de microthromboses spléniques, hépatiques et surtout mésentériques, provoquant le plus souvent des infarctus répétés se traduisant d'abord par une splénomégalie puis une atrophie splénique progressive suivie de l'installation d'une autosplectomie.

- **Les manifestations neurologiques** : les thromboses des vaisseaux cérébraux peuvent provoquer des complications neurologiques dont les plus graves sont les infarctus cérébraux.

- **Les autres complications** sont les thromboses osseuses qui se manifestent par une ostéonécrose, les infarctus pulmonaires, les cardiomyopathies, les rétinopathies, et les ulcères de la jambe.

- ✚ **Les crises de déglobulisation** : il s'agit de crises hyperhémolytiques favorisées par le paludisme en milieu tropical.

- ✚ **Les crises de séquestration splénique** : elles peuvent être fatales pour les nourrissons.

- ✚ **Les crises aplasiques** : elles surviennent souvent au décours d'une infection par le Parvovirus B19 par arrêt de la maturation de la moelle osseuse.

b.1.2 Manifestations chroniques

❖ **Les signes les plus fréquemment observés sont ci-après**

- **Un retard staturo-pondéral** : au Sénégal 15% des patients homozygotes ont un retard pondéral et 6% un retard statural [**Crawford et al.,1988**].
- **Une anémie** : c'est la manifestation la plus connue. Elle se traduit par une pâleur de la peau et des muqueuses et un subictère net ou discret. Il s'agit d'une anémie hémolytique chronique avec un taux d'hémoglobine qui varie d'un sujet à l'autre avec des extrêmes allant de 6 à 11g/dl. L'anémie est normochrome normocytaire.
- **Une splénomégalie**. est constante chez le nourrisson. Sa taille est variable, mais une taille très volumineuse de la rate doit évoquer une forme particulière de drépanocytose ou une complication [**Barret et al .,1971**].
- **Une hépatomégalie** est fréquente dès le début de la maladie et persiste très longtemps dans l'enfance [**Barret et al .,1971**].

b.2 Autres syndromes drépanocytaires majeures

Ce sont les formes associées :

- **Double hétérozygotie SC** : elle est retrouvée au Sénégal et présente des manifestations moins sévères et tardives.
- **Double hétérozygotie « SO Arab » et « SD Punjab »** : elles donnent aussi des manifestations cliniques moins sévères et tardives.
- **Double hétérozygotie SB Thalassémie** : elles sont rencontrées dans le bassin méditerranéen et présentent une anémie microcytaire hypochrome.

II.3.2. Signes biologiques

Cette approche est d'abord facilitée par certains signes cliniques. Cependant une suspicion d'hémoglobinopathie ne peut être confirmée que par des tests biologiques.

Le test d'EMMEL permet de dépister la présence d'Hb S mais l'électrophorèse de l'hémoglobine est l'examen de confirmation, et peut à elle seule suffire à donner la réponse diagnostique [Dièye, 1992 ; Diagne et al .,2000].

○ La numération formule sanguine

Elle précise l'importance de l'anémie qui est variable, le taux d'hémoglobine variant en moyenne de 6 à 10 g/dl L'anémie est normochrome normocytaire.

L'examen du frottis sanguin révèle la présence d'hématies en forme de "faucille" ou drépanocytes caractéristiques de la maladie (fig. 13).

Les hématies ont une forme allongée aux deux extrémités pointues, elles sont donc différentes des elliptocytes, dont les extrémités sont arrondies (fig. 14).

Le taux de réticulocytes est très élevé, sauf en cas d'érythroblastopénie.

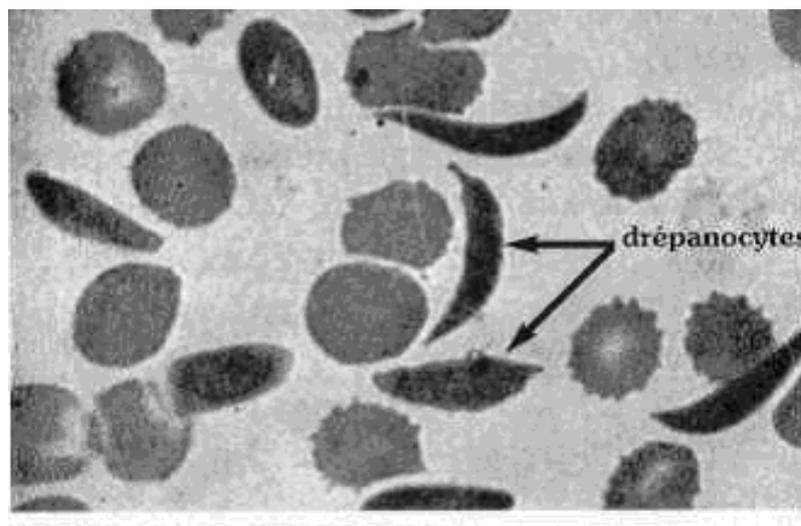


Figure 13: drepanocytes [Baledent et al. ; 2000]

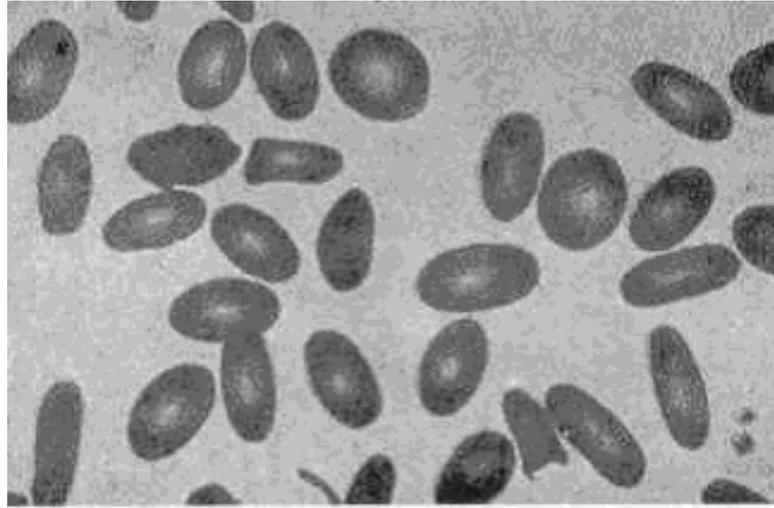


Figure 14: elliptocytes [Baledent et al. ; 2000]

○ **Test d'Emmel**

Il consiste à déclencher au laboratoire la falciformation, soit en rajoutant du métabisulfite de sodium au sang du malade soit en créant artificiellement une atmosphère pauvre en oxygène. On observe alors à l'état frais, entre lame et lamelle, les hématies qui prennent progressivement la forme typique en "faucille".

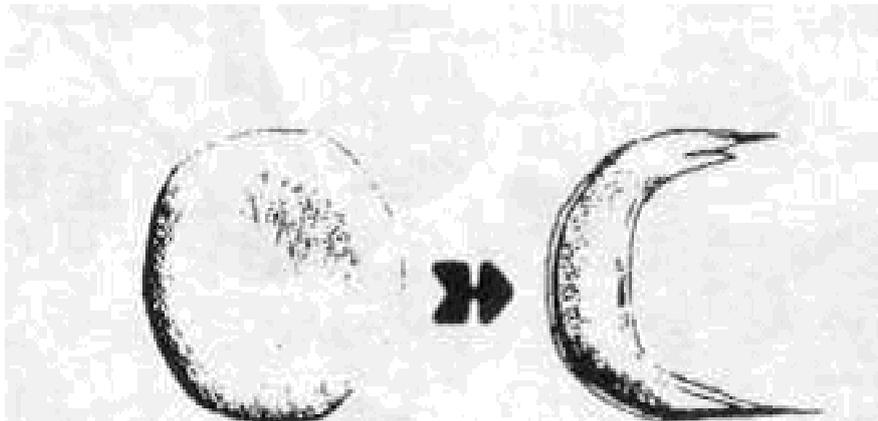


Figure 15 : falciformation type Baledent [Baledent et al. ; 2000] .

Si le test d'Emmel est négatif les hématies gardent leur forme ronde [Edington et al .,1955]. S'il est positif, les hématies prennent progressivement une forme de faucille ou de banane aux extrémités pointues, souvent dentelées. Il est important d'examiner plusieurs zones de la préparation car la falciformation ne s'effectue pas de façon homogène.

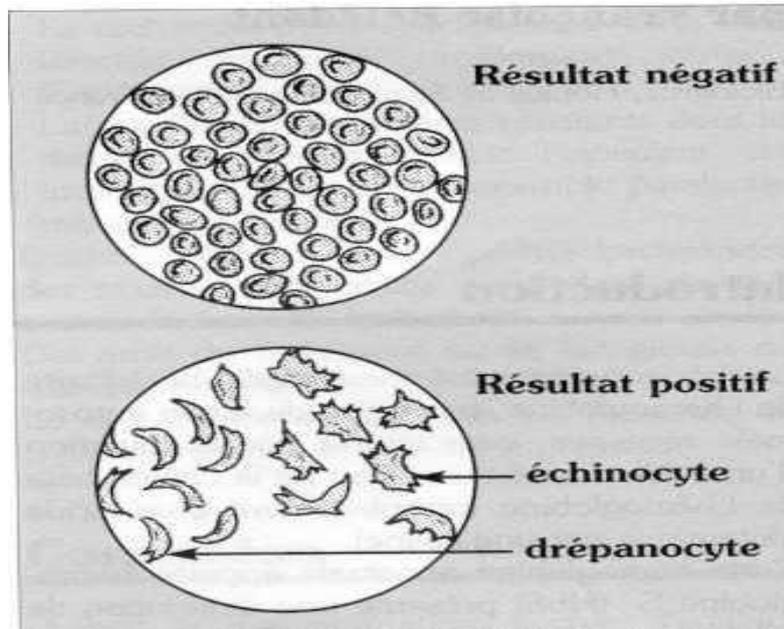


Figure 16 : résultats du test de falciformation [Bailleul et al ., 2001].

○ **Electrophorèse de l'hémoglobine**

Elle permet de poser le diagnostic en mettant en évidence la présence d'une fraction d'hémoglobine de migration différente des hémoglobines normales

Elle permet également de différencier les formes homozygotes des formes hétérozygotes, ainsi que la présence éventuelle d'une autre anomalie de l'hémoglobine associée (autre mutation ou thalassémie.)

Le sang veineux est prélevé sur anticoagulant, principalement EDTA qui permet d'effectuer sur le même tube la numération et la formule sanguine. Le sang est ensuite lavé en eau physiologique et les hématies sont lysées. Cet hémolysat permet l'étude de l'hémoglobine.

L'électrophorèse de l'hémoglobine permet d'obtenir une séparation des différentes hémoglobines selon leur charge électrique et leur poids moléculaire.

- **Elle peut être pratiquée :**

- sur acétate de cellulose en milieu alcalin, pH 8,6. Cette technique est la plus utilisée.
- sur agarose en milieu acide, pH 6,2 qui permet de confirmer certaines hémoglobines anormales, en particulier en séparant les Hb S, Hb D, Hb C et Hb E.

Le diagnostic de drépanocytose est confirmé par la présence d'hémoglobine S. Chez le sujet hétérozygote le taux de S est inférieur à 50%. L'hémoglobine normale adulte est composée d'hémoglobine A en grande majorité avec un taux d'hémoglobine A2 inférieur à 3,5%.

Le sujet drépanocytaire homozygote ne possède pas d'hémoglobine A1, mais il existe un taux variable d'hémoglobine F. Chez le sujet normal, l'hémoglobine F ou hémoglobine fœtale, est présente en grande quantité à la naissance et le taux diminue progressivement pour disparaître vers l'âge d'un an.

Chez certains malades, lorsque deux mutations sont associées on parle de double hétérozygote exemple SC.

- **Isofocalisation électrique**

C'est une variante électrophorétique hautement résolutive qui peut remplacer les électrophorèses à différents pH.

Elle est effectuée sur un support de polyacrylamide chargé d'ampholytes et en présence d'un gradient de pH. Le prélèvement peut être sur du papier buvard.

Chez le nouveau-né elle constitue la technique de choix pour le dépistage des hémoglobines anormales et différencier l'état homozygote de l'état hétérozygote.

II.4. Traitement

II.4.1. Médecine moderne

Hydratation, prévention des infections, antalgiques sont la base en apparence simple du traitement de la drépanocytose, mais des traitements beaucoup plus lourds (transfusions, hydroxyurée...) peuvent aussi être prescrits. Une panoplie thérapeutique que la précarité des patients et la chronicité de la maladie rendent parfois difficile à mettre en œuvre [Mariane et al ., 2002].

✚ PRINCIPES GÉNÉRAUX DU TRAITEMENT :

UNE ATTITUDE PRÉVENTIVE

❖ L'hyperhydratation

Cette consigne simple d'hygiène de vie doit être expliquée dès les premiers mois de vie et est applicable à tout âge. Une hydratation abondante doit encore être majorée en cas d'effort sportif, de réchauffement du climat, d'infection concomitante. Dès les premiers signes évocateurs d'un début de crise douloureuse, les apports hydriques doivent être augmentés à 3 l/m² chez l'enfant, 50 ml/kg chez l'adulte.

❖ La prévention des infections pneumococciques

Les infections invasives à pneumocoque sont la première cause de mortalité chez les enfants drépanocytaires. L'instauration d'une prévention précoce de ces infections a considérablement amélioré le pronostic. La stratégie actuelle repose sur :

- ✓ le dépistage systématique de la maladie chez les nouveau-nés issus de familles originaires d'Afrique, des Antilles, d'Afrique du Nord
- ✓ l'administration préventive quotidienne de pénicilline V (Oxacilline : 50 000 à 100 000 U/kg/j, en 2 à 3 prises
- ✓ la vaccination par vaccin antipneumococcique conjugué (Prevenar) aux 2^e, 3^e, 4^e mois, avec un rappel par le même vaccin vers 16-18 mois, puis des rappels de vaccin anti-pneumocoque par le vaccin Pneumo 23.

Celui-ci est renouvelé tous les 3 à 5 ans tout au long de la vie. La prévention par Oxacilline est instaurée dès le diagnostic posé. Le portage du pneumocoque dans la gorge étant rare chez l'adulte, il paraît inutile, sauf cas particuliers, de poursuivre cette antibioprophylaxie passé l'adolescence.

❖ **Un programme vaccinal élargi**

On préconise d'ajouter au calendrier vaccinal des patients drépanocytaires le vaccin contre la méningite C et le vaccin antigrippal.

• **Vaccinations recommandées chez le patient drépanocytaire :**

- Vaccin anti-pneumococcique
- Vaccin anti-méningocoque C
- Vaccin anti-Hæmophilus
- Vaccin anti-hépatite B
- Vaccin DTpolio
- Vaccin antigrippal

Un traitement antipalustre est systématique en cas de voyage dans les pays à risque.

❖ **La supplémentation en acide folique**

Elle se justifie tout au long de l'évolution de la maladie.

Sa posologie repose surtout sur un relatif consensus professionnel : 1 comprimé à 5 mg tous les 2 jours chez l'enfant, 1 à 2 comprimés tous les jours chez l'adulte.

❖ **La recherche de facteurs déclenchant une crise douloureuse et le traitement dès les premiers symptômes**

Certains facteurs sont plus fréquemment responsables de crises douloureuses : les changements de température, les bains en eau froide, la déshydratation (sueurs, diarrhée...), les infections concomitantes, l'hypoxie (altitude, avion mal pressurisé), les stress physiques et psychologiques. Un accompagnement est souvent nécessaire pour permettre aux patients et à leur famille de ne pas se laisser « déborder » par ces événements douloureux et anxiogènes et de pouvoir utiliser au domicile sans panique les médicaments antalgiques prescrits.

❖ **Le dépistage des complications viscérales par des bilans systématiques**

Il est souhaitable de systématiser la pratique du doppler transcrânien à partir de l'âge de 1 an. Cet examen non invasif explore le flux sanguin des artères cérébrales, des carotides internes et du tronc basilaire. Une accélération du flux est prédictive du risque de constitution d'un accident vasculaire cérébral [Adams et al., 1998].

Le doppler doit être renouvelé annuellement chez l'enfant dès l'âge de 1 an.

Une politique préventive amène aussi à pratiquer des bilans annuels à la recherche de complications viscérales infracliniques.

Il n'y a pas de consensus sur la limite inférieure d'âge pour commencer ces bilans, sachant qu'ils sont tout à fait souhaitables après l'âge de 10 ans. Ils incluent, outre les examens hématologiques et biologiques de routine, une radio de thorax, une radio de bassin de face, un électrocardiogramme, une échocardiographie, une échographie hépatique, une angiographie rétinienne, et tout autre examen indiqué par la clinique (épreuves fonctionnelles respiratoires...).

LA TRANSFUSION SANGUINE

Elle tient une place considérable dans l'arsenal thérapeutique puisqu'elle permet aussi bien de corriger le déficit quantitatif en transporteur d'oxygène que d'apporter des hématies déformables, capables de se rendre dans des sites ischémiés par les occlusions vasculaires. De ce fait, chaque patient doit être

« transfusable » :

- ✓ posséder des documents transfusionnels suffisants et actualisés
- ✓ avoir une évaluation régulière de son capital veineux (une chambre implantable ou une fistule artério-veineuse peuvent être nécessaires chez certains patients).

Dans toutes ces situations, l'objectif principal est de diminuer la proportion d'hémoglobine drépanocytaire afin d'éviter ou d'enrayer la falciformation. Le chiffre d'hémoglobine post-transfusionnelle ne doit pas être supérieur au taux habituel du patient afin de ne pas majorer la viscosité sanguine [Wayne et al ; 1993].

On a en effet observé des accidents vaso-occlusifs, voire des accidents vasculaires cérébraux, secondaires à une augmentation post-transfusionnelle franche du taux d'hémoglobine au-dessus de sa valeur habituelle.

De ce fait, il est généralement préférable de pratiquer un échange transfusionnel, associant de façon isovolémique une saignée à une transfusion, plutôt qu'une transfusion simple.

❖ L'échange transfusionnel ponctuel

Préparation à un acte chirurgical

Le risque de complications postopératoires, vaso-occlusives ou infectieuses, est élevé chez les patients drépanocytaires. La pratique des équipes spécialisées est de procéder à un échange transfusionnel préparatoire abaissant le taux d'HbS en dessous de 30 à 40%, selon la longueur du temps d'anesthésie.

Selon les cas et les possibilités locales, une transfusion simple ou un échange transfusionnel sont pratiqués [Vichinsky et al .,1995].

Cas particulier de la femme enceinte

La grossesse est une situation à risque, tant pour le bébé que pour la mère drépanocytaire. Un consensus existe sur l'intérêt de la transfusion systématique à partir de la 22e semaine d'aménorrhée, voire dès la fin du 1er trimestre chez les patientes ayant les antécédents les plus graves ; en revanche, la ligne de conduite est moins claire chez les patientes peu ou pas symptomatique [koshy et al ., 1988].

❖ **Les échanges transfusionnels au long cours**

Des programmes d'échanges transfusionnels maintenant en permanence le taux d'HbS en dessous de 30 à 40 % sont proposés dans certains cas : après un accident vasculaire cérébral ; lors d'une détérioration viscérale sévère (insuffisance respiratoire, rénale, hépatique, cardiaque) ; à des patients ayant des épisodes de priapisme invalidants non réductibles par Etiléfrine.

Des programmes d'échanges pendant 6 à 12 mois ont été proposés chez des adolescents ayant un retard staturo-pondéral, ou des patients souffrant d'ulcères de jambe persistant malgré les soins locaux, ou en attente de greffe d'organe. L'efficacité de cette thérapeutique dans ces différentes indications n'a pas été prouvée par des études randomisées.

La majorité des publications concernent les accidents vasculaires cérébraux, où l'on a décrit la raréfaction des récurrences lors d'un programme d'échanges transfusionnels, et la fréquence des nouveaux accidents quand on arrête les transfusions.

Une diminution de la fréquence des crises douloureuses a été objectivée chez des patientes qui étaient transfusées en raison de leur grossesse [koshy et al ., 1988].

En règle générale, on observe chez la quasi-totalité des patients soumis à des transfusions itératives une raréfaction des événements douloureux quand le pourcentage d'HbS est abaissé en dessous d'un seuil, variable selon les patients, autour de 40 à 50 % environ.

❖ **Cas particulier de la prévention des accidents vasculaires cérébraux chez l'enfant**

La prise en charge des enfants chez qui un doppler transcrânien a mis en évidence une élévation de la vitesse des flux, indicateur d'un risque plus élevé d'accident vasculaire cérébral, ne fait pas encore l'objet d'un consensus. Une étude randomisée incluant 130 enfants drépanocytaires chez qui les vitesses des flux des artères carotides internes ou cérébrales moyennes excédaient 200 cm/s a montré que ceux bénéficiant de transfusions mensuelles avaient très significativement moins de risque de faire un accident vasculaire cérébral que le groupe contrôle non transfusé ($p < 0,001$) [Wayne et al ;, 1993].

La mise sous échanges transfusionnels au long cours (ou la greffe de moelle si l'enfant a un donneur intrafamilial HLA-compatible) est donc assez consensuelle si l'enfant a un flux supérieur à 200 cm/s et une sténose avérée à l'artériographie ou à l'angio-IRM (imagerie par résonance magnétique).

En revanche, quand le flux vasculaire est plus modérément accéléré (entre 170 et 200 cm/s) et que l'imagerie ne montre pas de remaniement vasculaire sévère, il n'existe pas encore de consensus. Certains discutent aujourd'hui un traitement par hydroxyurée. Des protocoles d'étude sont en cours d'élaboration.

❖ **Complications de la transfusion**

Si les transfusions chroniques sont la thérapeutique la plus constamment efficace (greffe de moelle exclue), elles ont cependant des risques qui en limitent les indications.

La surcharge en fer était jusqu'à présent la conséquence la plus inéluctable. Elle ajoute sa morbidité et sa mortalité propres au pronostic des formes graves de drépanocytose qui relèvent de transfusions répétées [Ballas SK et al., 2001]. La pratique de l'érythraphérèse (échange transfusionnel à l'aide d'une machine séparatrice de cellules) paraît éviter cet inconvénient grave, mais elle requiert deux accès veineux de gros calibre ou, à défaut, la création d'une fistule artério-veineuse. En cas d'apports transfusionnels manuels, la surcharge en fer est retardée quand des échanges sont pratiqués plutôt que des transfusions simples, mais elle est quand même observée après un an environ d'échanges transfusionnels manuels et impose un traitement spécifique. Le risque de transmission virale a été considérablement réduit, mais de nombreux patients ont été infectés ces dernières années par les virus des hépatites B et C. La contamination virale la plus fréquente aujourd'hui dans les pays industrialisés est l'hépatite C, qui affecte 10% des patients drépanocytaires adultes aux États-Unis. L'ajout de la Ribavirine à l'interféron, selon le protocole classique, doit être prudent puisque la Ribavirine majore l'hémolyse.

L'hépatopathie liée à l'infection virale peut être aggravée par l'hémochromatose post-transfusionnelle.

Enfin, une minorité de patients acquiert une allo-immunisation complexe réduisant considérablement la probabilité de trouver des concentrés érythrocytaires compatibles.

Ces risques thérapeutiques (celui d'hémochromatose post-transfusionnelle surtout) amènent à limiter le plus possible le nombre de patients soumis à des transfusions mensuelles. Hormis la vasculopathie cérébrale évoluée, où la transfusion reste la thérapeutique de choix (ou la greffe de moelle quand elle est réalisable), l'hydroxyurée est aujourd'hui la thérapeutique proposée en premier aux patients souffrant de douleurs sévères répétées ou d'insuffisance viscérale progressive.

Les programmes de transfusion chronique sont effectués chez les patients qui ne souhaitent pas être traités par hydroxyurée de même que ceux chez qui ce traitement est inefficace d'emblée ou secondairement.

❖ La chélation du fer

Quoique la ferritinémie soit un marqueur assez peu spécifique de la surcharge en fer chez les patients drépanocytaires, car sa valeur est augmentée en cas de cytolyse, d'inflammation et (ou) d'infection, c'est néanmoins l'indicateur de surcharge martiale le plus utilisé. On a montré chez les patients thalassémiques qu'une ferritinémie régulièrement supérieure à 2 500 ng/ml était un facteur pronostique important de complication cardiaque. Une ferritinémie supérieure à 1 000 ng/ml nécessite un traitement chélateur. Le chélateur du fer le plus efficace reste la Déféroxamine. On l'administre le plus souvent par voie sous-cutanée pendant 8 à 10 h, à la dose de 40 mg/kg/j. Elle peut être délivrée par une seringue reliée à une pompe portable, ou par un diffuseur, ce dernier dispositif ayant un volume de perfusion plus important et permettant donc de réduire le nombre d'injections par semaine. Il faut toutefois veiller à ne pas dépasser la dose d'environ 80 mg/kg/injection, pour éviter la toxicité du produit, qui est essentiellement neurosensorielle (lésions de la rétine, perte d'audition...). On surveille l'efficacité de la chélation en mesurant la ferritinémie, qui doit être maintenue entre 500 et 1 000 ng/ml, et sa toxicité en contrôlant annuellement la vue et l'audition.

Par ailleurs, la Déféroxamine doit être interrompue chez les patients ayant une fièvre d'origine inexplicée, une diarrhée, des douleurs abdominales tant qu'une infection par *Yersinia enterocolitica* n'a pas été éliminée, puisque cette bactérie dépourvue de sidérophore détourne à son profit la capacité de la Déféroxamine de capter du fer, élément qu'elle utilise pour sa propre croissance. La chélation du fer est une thérapeutique extrêmement contraignante et difficile à appliquer. L'observance au traitement est souvent médiocre.

La lourdeur de ce traitement justifie qu'on considère que les situations nécessitant des échanges transfusionnels mensuels sont autant d'indications en pédiatrie à discuter une greffe de moelle, si l'enfant ou l'adolescent dispose d'un donneur HLA intrafamilial. Le choix thérapeutique sera peut-être modifié prochainement si les molécules chélatrices du fer pouvant être prises par voie orale (actuellement en cours d'évaluation), confirment les données initiales encourageantes en termes de pouvoir chélateur et de tolérance à court et moyen terme.

L'HYDROXYURÉE

Les premiers essais cliniques utilisant l'hydroxyurée chez les malades drépanocytaires ont découlé de l'observation que les patients ayant spontanément des taux élevés d'hémoglobine fœtale (HbF) (les nouveau-nés par exemple) avaient des formes atténuées, voire silencieuses de drépanocytose. Cet effet atténuateur est dû à la non intégration de l'HbF dans le polymère de désoxyhémoglobine S. L'hydroxyurée étant la molécule réactivatrice de la synthèse d'HbF la mieux tolérée, son utilisation s'est révélée intéressante.

Au fil des ans, d'autres mécanismes d'action ont été suggérés, notamment la réduction de l'adhésion excessive des réticulocytes drépanocytaires à l'endothélium et la modulation des processus inflammatoires [**Mariane et al., 2002**]. Les essais cliniques se sont multipliés depuis 1995.

Chez l'adulte drépanocytaire, l'étude la plus importante, randomisée contre placebo, est la *Multicenter Study of Hydroxyurea*, menée entre 1992 et 1995 chez 299 patients atteints de formes sévères [**Charache et al., 1995**]. La dose initiale était de 15 mg/kg/j, augmentée progressivement jusqu'à 40 mg/kg/j, en l'absence de myélotoxicité. La dose maximale ne produisant pas de toxicité hématologique (*maximu tolerated dose*) est maintenue pendant le reste de l'étude.

Sous traitement, la médiane des crises douloureuses est passée de 4,5 à 2,5 crises/an ($p < 0,001$), les syndromes thoraciques aigus et les transfusions ont été significativement réduites ($p < 0,0001$ et égal à $0,001$). La tolérance à court terme a été bonne. Dix grossesses chez des patientes traitées ou des partenaires de patients ont donné naissance à des bébés normaux. À la fin de cette étude, les patients ont eu le choix de continuer le traitement, d'arrêter, ou de commencer l'hydroxyurée. Une 2e étude observationnelle a été menée entre 1996 et 2001 [Steinberg et al. ; 2003]. Après 9 ans de suivi, elle a montré que la mortalité était réduite chez les patients sous hydroxyurée ($p = 0,035$) par rapport à ceux qui ne l'étaient pas. La survie est corrélée au taux d'HbF et à la fréquence des épisodes vaso-occlusifs.

La seule étude randomisée chez l'enfant a été menée en *cross over* contre placebo. Les 22 enfants âgés en moyenne de 8 ans, traités 6 mois par 20 mg/kg/j d'hydroxyurée, ont eu sous traitement une réduction significative du nombre de jours d'hospitalisation pour crise douloureuse ($p = 0,0016$) [Ferster et al. ;1996]. La même équipe a montré la pérennité de cet effet bénéfique chez les patients traités au moins 5 ans [Ferster et al. ; 2006]. Ainsi, les indications de l'hydroxyurée chez les patients drépanocytaires atteints de formes graves peuvent être regroupées dans les tableaux I et II [Mariane et al ., 2003].

Tableau I : Indications de l'hydroxyurée chez les adultes drépanocytaires atteints de formes graves

EFFICACITE DEMONTREE	CONCENSUS PROFESSIONNEL (alternative aux transfusions)
<ul style="list-style-type: none">  3 crises vaso-occlusives ou plus hospitalisées par ans  Syndromes thoraciques aigus répétés 	<ul style="list-style-type: none">  Défaillance organique débutante (rein, cœur...)  Anémie sévère symptomatique  Maladie auto-immune associée  Priapisme  Patient SC sévère

Tableau II : Indications de l'hydroxyurée chez les enfants drépanocytaires atteints de formes graves

EFFICACITE DEMONTREE	CONCENSUS PROFESSIONNEL	INDICATIONS NON VALIDEES
<ul style="list-style-type: none">  3 crises vaso-occlusives ou plus hospitalisées par an 	<ul style="list-style-type: none">  Plus de 2 syndromes thoraciques aigus  Anémie sévère 	<ul style="list-style-type: none">  Vasculopathie cérébrale  Ischémie myocardique  Cholestase intrahépatique

L'hydroxyurée est, en particulier, souvent prescrite chez les patients drépanocytaires atteints de maladies autoimmunes relevant de corticothérapie, car celle-ci favorise la survenue de crises vaso-occlusives parfois graves.

Cependant l'hydroxyurée n'a toujours pas d'autorisation de mise sur le marché dans l'indication drépanocytose en 2004. Un traitement par hydroxyurée ne se conçoit que dans le cadre d'un suivi en centre de référence.

RECHERCHES THÉRAPEUTIQUES

❖ Réactivateurs de la synthèse d'hémoglobine fœtale

D'autres molécules partageant ce mécanisme d'activité avec l'hydroxyurée, mais dépourvues a priori de sa toxicité potentielle, ont été évaluées. Le butyrate et ses dérivés paraissent pour l'instant assez décevants, tant du fait de leur assez mauvaise tolérance que de leur faible efficacité.

Un dérivé administrable par voie sous-cutanée, le 5-aza-2'-déoxycytidine, a eu des résultats prometteurs sur le plan clinique et biologique chez 8 patients drépanocytaires résistants ou intolérants à l'hydroxyurée [**Sauntharajah et al .,2003**].

❖ Inhibiteurs de la déshydratation érythrocytaire

La falciformation est favorisée par la déshydratation intra-érythrocytaire.

Deux mécanismes ont été particulièrement étudiés pour tenter de limiter la sortie d'eau : le cotransport K-Cl dont l'activité est liée au taux de magnésium intra-érythrocytaire, et le canal Gardos. Une amélioration clinique sous traitement par magnésium per os a été observée dans une étude non contrôlée chez des adultes drépanocytaires [**de Franceschi et al ,1997**].

La preuve de l'efficacité clinique reste à apporter par des études contrôlées. Un dérivé ICA-17043, inhibiteur du canal Gardos, s'est montré actif chez la souris transgénique drépanocytaire ; il est en cours d'essai clinique de phase II.

❖ **Le monoxyde d'azote et son précurseur (l'arginine)**

Il existe chez les patients drépanocytaires un déficit en monoxyde d'azote (NO) par défaut de production et par inactivation, notamment liée à sa complexification avec l'hémoglobine libre libérée par l'hémolyse. Les actions vasodilatatrices, anti-agrégante plaquettaire et anti-inflammatoire du NO en font un candidat de choix pour le traitement de la drépanocytose. Une première étude sur le NO inhalé, randomisée contre placebo, chez l'enfant drépanocytaire souffrant d'une crise vaso-occlusive

[Weiner et al . ; 2003] montre une réduction de la consommation d'antalgiques dans le groupe traité. Des essais utilisant la L-arginine (précurseur du NO) per os sont en cours.

II.4.2. Phytothérapie

Des traitements à base de plantes africaines ont été développés de longue date pour palier aux souffrances : *Zanthoxylum fagara* et ses extraits : c'est un arbuste épineux qui entre dans la composition de plusieurs remèdes.

Nous citons deux préparations présentées sous forme galénique industrielle, l'une au Bénin par le Docteur MEDEGAN, le VK500 à base du fameux *Zanthoxylum fagara* et l'autre au Burkina Faso, un mélange appelé FACA à base de *Zanthoxylum fagara* et de *Calotropis procera*.

[www.togocity.com/IMG/pdf/DREPANOCYTOSE].

Chapitre III : Rappel bibliographique sur *Hibiscus sabdariffa*

III.1. Dénomination

Noms vulgaires : Oseille de Guinée, Karkade , Thé rose d'Abyssinie

Noms africains – Wolof : bissap - Bambara: dakumu - Peuhl: folérébadi -Goun et Fon : Bissap

Plus de 500 espèces d'Hibiscus sont connues dans le monde. Ces plantes se rencontrent à la fois dans les régions tropicales et subtropicales. Elles possèdent des calices de couleur verte ou rouge.

La majorité des variétés sont utilisées comme plantes ornementales à l'exception du type *sabdariffa* dont deux variétés ont été identifiées [Kerharo et al., 1974 ; Morton et al., 1987].

Il s'agit d'*Hibiscus sabdariffa* variété *altissima* et d'*Hibiscus sabdariffa* variété *sabdariffa* L.

III.2. Description de la plante

Hibiscus sabdariffa L. est une plante de grande taille, vigoureuse, peu ramifiée et très fibreuse [McClintock et al., 2004]. Elle est d'ailleurs cultivée principalement pour ses fibres. La variété *sabdariffa* L. est une plante touffue pourvue de calices comestibles. Les investigations qui suivent portent essentiellement sur cette dernière variété (fig. 17).



Figure 17 : Description botanique d'*hibiscus sabdariffa*

III.3. Classification

➤ Classification classique

Règne: Plantae
Division: Magnoliophyta
Classe: Magnoliopsida
Ordre: Malvales
Famille: Malvaceae
Genre: Hibiscus
Nom binominal: Hibiscus sabdariffa

➤ Classification phylogénétique

Ordre: Malvales
Famille: Malvacea

III.4. Composition chimique des calices

Les calices d'*H. sabdariffa*, principale partie comestible de la plante, ont une composition très variable [Kerharo et al., 1974] ; [Morton et al., 1987 ; D'Heureux et al., 2004 ; Babalola et al., 2001]. Excepté pour les teneurs en eau et en lipides, les écarts entre les valeurs minimales et maximales des différents éléments considérés sont importants. Cette variabilité peut être due à plusieurs facteurs tels les conditions de culture, la nature des sols, la pluviométrie et le pays d'origine des calices [Kerharo et al., 1978 ; Morton et al., 1987]. La variété est aussi un élément majeur des différences de composition observées [Babalola et al., 2001]. Les calices d'*H. sabdariffa* sont riches en acides organiques. Les acides succinique, oxalique, tartrique et malique sont présents à des concentrations respectives de [(0,51, 0,43, 0,17 et 0,12) g·100 g⁻¹] [Wong et al., 2002 ; Dafallah et al., 1996]. Les acides succiniques et oxaliques constituent les deux acides organiques majoritaires d'*H. sabdariffa*. À eux deux, ils représentent 76 % des acides organiques totaux. La teneur en acide ascorbique est très variable même au sein d'espèces cultivées dans la même zone géographique comme cela a été montré au Nigéria [Babalola et al., 2001]. Les sucres présents dans les calices d'*H. sabdariffa* sont constitués de glucose, fructose et saccharose. Le glucose, avec près de 40 % des sucres totaux, est le sucre majoritaire [Wong et al., 2002]. L'étude de la composition en minéraux de calices d'*H. sabdariffa* mise en parallèle avec les concentrations maximales autorisées dans l'alimentation humaine révèle une forte variabilité, fonction de la zone géographique de production [Babalola et al., 2001 ; Maiga et al., 2005 ; Bahemuka et al., 1999]. Dans ces calices, on constate la présence d'oligoéléments, tels que le chrome et le cuivre, alors que d'autres éléments n'ont été mis en évidence que dans certaines origines ; c'est le cas, par exemple, du plomb et du nickel détectés dans les seuls calices des cultures du Mali.

La variété influence également la composition minérale [Wong et al ., 2002]. Ainsi des différences significatives ont été observées pour les teneurs en fer, sodium, et potassium selon les variétés rouge et rouge foncée d'*H. sabdariffa*.

Globalement, il apparaît que les calices d'*H. sabdariffa* constituent une bonne source d'éléments essentiels (Ca, Cu, Fe, K, Mn, Zn). À l'exception de la teneur en plomb, toutes les valeurs rapportées sont au-dessous du seuil admissible défini par l'organisation mondiale de la santé [Maiga et al.,2005 ; Haider et al.,2004]; elles ne peuvent donc pas constituer un risque sanitaire pour les consommateurs d'*H. sabdariffa*. Cependant, la teneur en éléments minéraux des plantes dépend de nombreux facteurs parmi lesquels on peut citer les conditions géo-climatiques environnantes, les activités humaines à proximité du champ et les pratiques culturales utilisées. Pour s'assurer de la qualité de la matière végétale, il y aurait lieu d'effectuer une analyse plus systématique de la composition des calices en ces éléments minéraux qui, pour certains, sont des métaux lourds.

La présence de β -carotène et de lycopène à des concentrations respectives de $1,9 \text{ mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ et $164,3 \text{ }\mu\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de matière fraîche a été signalée dans des calices d'*H. sabdariffa* [Wong et al ., 2002]. Ces calices contiendraient également des mucilages et des pectines [Tsai et al .,1995 ; Forsyth et al.,1954], ainsi que tous les acides aminés essentiels [Morton et al ., 1987 ; El Adawy et al.,1994 ;Al Wandawi et al .,1984]. Plus de 37 composés volatils y ont été également identifiés parmi lesquels le 1-hexanol, le nonanal, le limonène, le linalool à des concentrations respectives de (21,9 ; 3,9 ; 2,3 ; 1,0) $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de matière sèche [Chen et al., 1998]. Une des caractéristiques d'*H. sabdariffa* est également sa richesse en anthocyanes (calices rouges) dont la teneur peut atteindre $1,5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de calices secs, teneur comparable à la mûre et supérieure à la plupart des autres végétaux comestibles [Mazza et al .,2000].

Deux à quatre anthocyanes ont été identifiés selon les variétés d'*H. sabdariffa* considérées [Du C.T et al .,1973 ; Nacro et al ., 2004].

Il s'agit de la delphinidine 3-sambubioside ou hibiscine, de la cyanidine 3-sambubioside ou gossypicyanine, de la delphinidine 3-glucoside et de la cyanidine 3-glucoside. La delphinidine 3-sambubioside est l'anthocyane majoritaire responsable de la couleur rouge-violette des calices [Francis et al., 1990 ; Wang et al., 2000]. Il représente 70 % de la teneur totale en anthocyanes. Les calices d'*H. sabdariffa* contiennent également d'autres composés polyphénoliques notamment de l'acide protocatéchique [Herrera et al., 2004 ; Dickel et al., 2007].

L'activité antioxydante des anthocyanes confère aux boissons à base d'*H. sabdariffa* des propriétés antioxydantes intéressantes, bien qu'environ 10 fois moins élevées que celles du vin rouge [Tsai et al., 2002]. Les anthocyanes sont responsables à 50 % de l'activité antioxydante totale du produit. Des études ont montré que les deux anthocyanes majeurs d'*H. sabdariffa*, la delphinidine 3-sambubioside et la cyanidine 3-sambubioside, sont rapidement absorbés dans le tractus gastro-intestinal chez le rat, ce qui laisse présager une bonne biodisponibilité [Tsai et al., 2002]. La mesure des activités anti-radicalaires d'extraits d'anthocyanes d'*H. sabdariffa* obtenus par macération de calices dans un mélange éthanol-acide trifluoroacétique [99 / 1] (vol. /vol.) a révélé des propriétés comparables à celles de l'acide ascorbique [Palé et al., 2004]. Cependant, les anthocyanes d'*H. sabdariffa* sont réputés pour leur instabilité [Mazza et al., 2000 ; Chen et al., 2005 ; Tsai et al., 1996]. Ils sont facilement dégradés pendant les traitements thermiques ou durant leur stockage à température ambiante. Après chauffage, la coloration rouge vire progressivement au brun. Cette instabilité, aussi bien dans des solutions aqueuses simples que dans des formulations complexes de produits alimentaires, est le principal facteur limitant de l'utilisation des extraits d'*H. sabdariffa* comme colorant.

Une plus grande stabilité ouvrirait à cette variété le marché des colorants naturels qui, évalué à 940 M USD, enregistre une croissance annuelle de l'ordre de 5 % comparé à celui des colorants artificiels (400 M USD), qui lui n'augmente que de (2 à 3) % par an [Sarni et al ., 2006].

III.5. Utilisations

Toutes les parties des plants d'*H. sabdariffa* (calice, tige, feuille) sont utilisées soit dans l'alimentation, soit dans la médecine traditionnelle, soit dans l'industrie textile .

❖ Utilisations médicinales

L'espèce *H. sabdariffa* aurait de nombreuses propriétés thérapeutiques. Elle est utilisée dans la plupart des médecines traditionnelles aussi bien dans les pays du Sud que dans les pays du Nord. Néanmoins, seul un nombre limité de ces propriétés médicinales a fait l'objet d'études cliniques menées pour la majeure partie sur des animaux. Plusieurs de ces propriétés médicinales sont attribuées aux concentrations élevées en acides organiques, notamment en acide malique, ascorbique et acide citrique [Kohen et al., 1992]. D'autres activités biologiques seraient liées aux composés anthocyaniques qui sont dotés d'activités antioxydantes importantes [Sarni et al ., 2006]. Deux études cliniques, l'une en Iran et l'autre au Mexique [Hirunpanich et al .,2006], réalisées respectivement sur 54 et 75 patients, ont mis en évidence que la consommation journalière d'extrait d'*H. sabdariffa* diminuerait de manière significative la tension artérielle chez les sujets hypertendus. Cependant, en dépit de l'utilisation populaire de cette plante dans le domaine de la pharmacologie, peu ou pas d'informations ont été fournies jusqu'à présent sur sa toxicité. Des travaux complémentaires seraient donc nécessaires dans ce domaine.



DEUXIEME PARTIE :

TRAVAIL

EXPÉRIMENTAL

I. Matériels et méthodes

I.1. Cadre d'étude

Notre étude a été réalisée dans les services suivants :

- Le Centre national de transfusion sanguine de Dakar, lieu de collecte des prélèvements de sang.
- Laboratoire de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie, lieu de mesure de la viscosité sanguine.
- Laboratoire de Physiologie Pharmaceutique de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie, principal cadre de l'étude. Il s'agit d'un laboratoire disposant d'appareils pour la préparation des extraits végétaux, l'étude phytochimique des plantes, le comptage en microscopie optique des drépanocytes.

I.2. Population d'étude

Notre population d'étude est constituée par des adultes recrutés dans la population générale de Dakar.

- Critères d'inclusion : Nous avons, au cours de cette étude, retenu les patients :
 - âgés de 25 à 45 ans et sexe confondus
 - Témoins : non porteurs du trait drépanocytaire, non diabétiques, indemnes de maladies tuberculeuses, syphilitiques ou HIV
 - les porteurs du trait drépanocytaire non diabétiques, indemnes de maladies tuberculeuses, syphilitiques ou HIV
 - les drépanocytaires homozygotes SS non diabétiques, indemnes de maladies tuberculeuses, syphilitiques ou HIV

Nos patients sont diagnostiqués suivant les critères biologiques et cliniques

- Critères d'exclusion : Sont exclus de l'étude :
 - Les porteurs de maladies tuberculeuses, syphilitiques ou HIV.
 - Les sujets diabétiques

Nous avons recruté 15 patients de chaque groupe constitué de témoins (adultes non porteurs du trait drépanocytaire), de porteurs du trait drépanocytaire et de drépanocytaires homozygotes SS en tenant compte des critères d'inclusion et d'exclusion.

I.3. Les prélèvements

Pour chaque patient, on réalise un prélèvement de sang sur tube EDTA conformément au protocole d'étude.

Les prélèvements sont réalisés par ponction veineuse au niveau du pli du coude.

I.4. Matériels de laboratoire

- **Un automate Minicap pour l'électrophorèse des hémoglobines :**

MINICAP Sebia permet la séparation en milieu basique (pH 9,4) des hémoglobines du sang humain (A, F et A2) et la détection des principales hémoglobines anormales (notamment S, C, E et D) par électrophorèse capillaire, à partir du sang total prélevé sur anticoagulant contenant de l'EDTAK2 ou EDTAK3.

L'instrument MINICAP permet de réaliser toutes les séquences de l'électrophorèse jusqu'à l'obtention du profil des hémoglobines pour l'analyse qualitative ou quantitative. L'analyse est réalisée sur l'hémolysat de globules rouges du sang total.

Les hémoglobines, séparées dans des capillaires en silice fondue, sont détectées directement au niveau d'une cellule sur le capillaire par spectrophotométrie d'absorbance à 415 nm, longueur d'onde d'absorption spécifique des hémoglobines.

Les profils électrophorétiques sont analysés visuellement pour détecter les anomalies. La détection directe donne automatiquement une quantification relativement précise de chaque fraction individualisée dont les hémoglobines présentant un intérêt particulier, telles que l'hémoglobine A2 pour le diagnostic des thalassémies. De plus, la bonne séparation des différentes fractions permet de détecter des variantes de l'hémoglobine, en particulier, de différencier l'hémoglobine S de l'hémoglobine D, et l'hémoglobine E de l'hémoglobine C.

La quantification de l'hémoglobine A2 est également possible en présence d'hémoglobine E.

- **Un combiné réfrigérateur-congélateur** : il permet la conservation de solutions, des prélèvements sanguins, de drogues et d'extraits à +4° et des réactifs du laboratoire à -20°C.
- **La balance de précision** : elle permet d'effectuer des pesées de l'ordre du centième de grammes.
- **Le distillateur 2008 GFL®** : il est relié à une arrivée d'eau ; il permet de distiller l'eau courante. L'eau distillée obtenue est utilisée dans toutes les manipulations allant du rinçage aux dilutions.
- **Le vortex VX 100 Labnet®** : il permet d'homogénéiser les solutions, de même que les préparations liquides effectuées avant leur utilisation.
- **Le moulinex** : Il permet d'effectuer un broyage mécanique et nous donne des particules semi fines qui peuvent être améliorées selon le besoin.

- **Le broyeur RM 100 Retsch®** : il permet d'obtenir des poudres fines à partir de poudres semi-fines, obtenues par broyage préalable à l'aide d'un Moulinex®.

- **Un évaporateur rotatif**

Le rotavapor permet de réaliser des distillations rapides et en une étape mais également de façon à ménager le produit.

Cette procédure se base sur l'évaporation et la condensation de solvants au moyen d'un ballon d'évaporation par rotation sous vide.

La distillation sous vide améliore le résultat du traitement et aide à protéger les produits.

- **Le Rotavapor est composé d'un(e) :**

- Réfrigérant
- Ballon d'évaporation
- Pompe à vide
- Refroidisseur à circulation
- Bain marie thermostaté

- **Un microscope optique laeica**
- **Un viscosimètre rotatif cône-plan** de type brookfield DVII+Pro qui permet de mesurer à 37°C les différentes vitesses de cisaillement de 1 s^{-1} à 375 s^{-1} pour la viscosité sanguine ; de 375 s^{-1} et à 750 s^{-1} pour la viscosité plasmatique des sujets.
- **Une microcentrifugeuse** pour la mesure de l'hématocrite et une **macrocentrifugeuse** qui permet de séparer les globules rouges du plasma.
- **Verrerie** : Erlenmeyer de 2000ml ; Tubes à essais ; Eppendorf ; Fiole de Kitassato (500ml) ; Eprouvette ; Bécher ; Ampoules ; Ballon d'évaporation ; Entonnoir ; coton hydrophile ; pompe à vide.



Figure 18 : appareil électrophorétique Minicap

Quantification des hémoglobines :

A

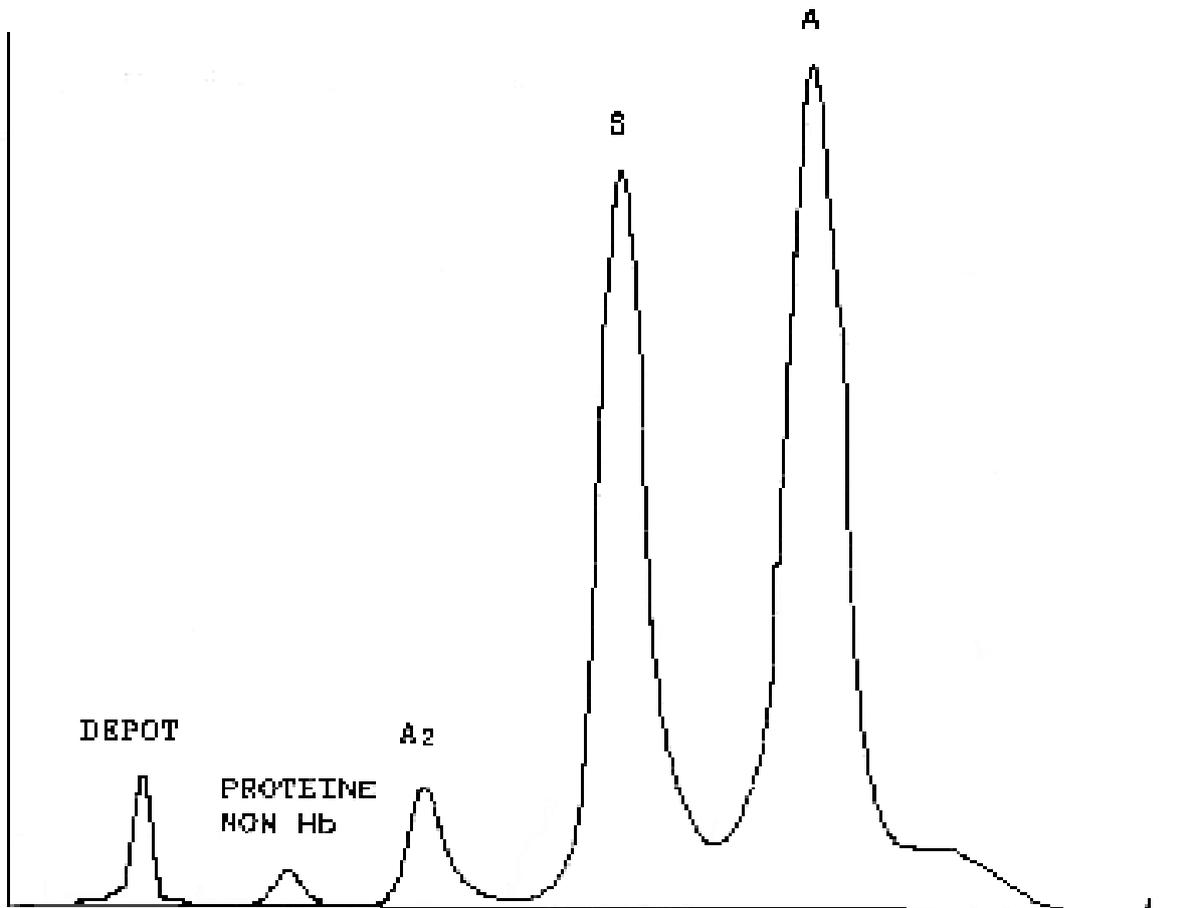


Figure 19 : Illustration d'un profil électrophorétique d'un sujet Drépanocytaire hétérozygote AS

HbA1 = 58 %

HbS = 35,3 %

HbA2 = 4,7 %

Non Hb = 2 %

B

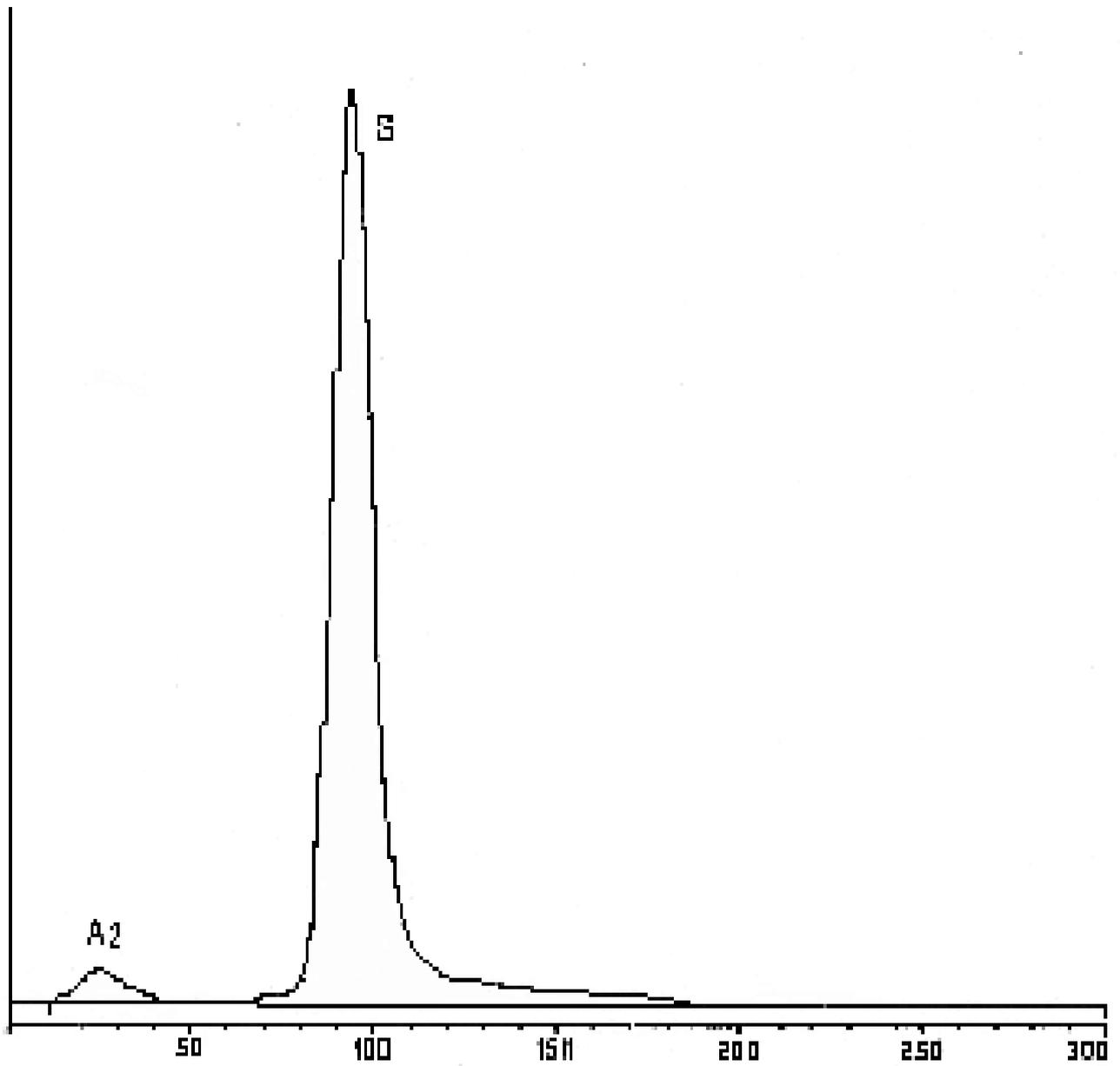


Figure 20 : Illustration d'un profil électrophorétique d'un sujet Drépanocytaire homozygote SS

HbS = 95,6 %

HbA2 = 4,4 %



Figure 21 : Balance de précision



Figure 22 : Distillateur



Figure 23 : Broyeur RM 100



Figure 24 : Evaporateur rotatif



Figure 25 : Microscope binoculaire

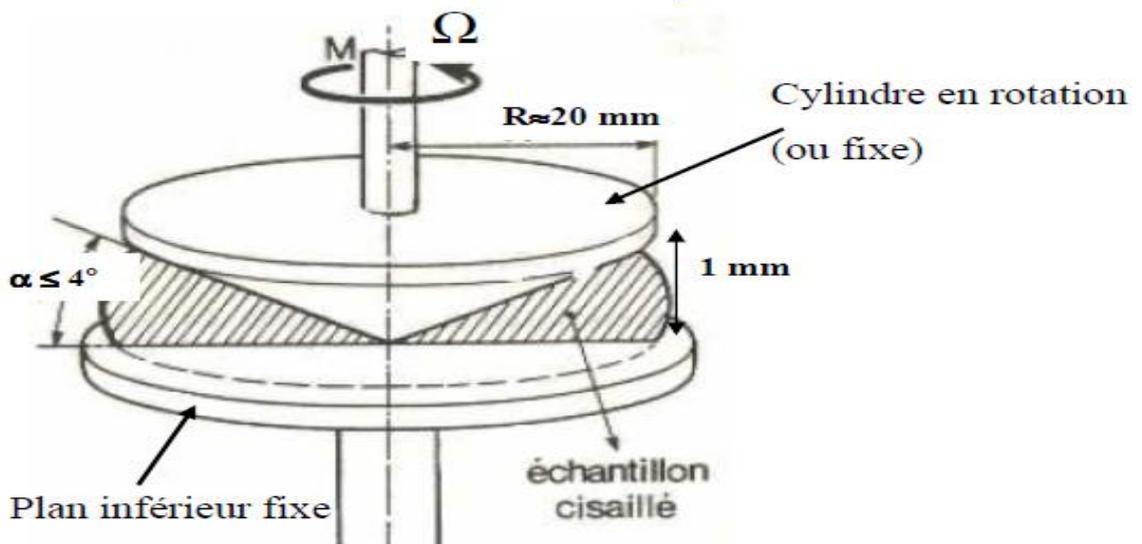


Figure 26 : Rhéomètre cône-plan

- **Matériel végétal :**
 - ✓ **calices d'*Hibiscus sabdariffa***

Notre matériel végétal est constitué par les calices d'*hibiscus sabdariffa*.

- **Culture de la plante**

Les calices d'*hibiscus sabdariffa* ont été cultivés dans l'enceinte du jardin botanique de la faculté de Médecine, Pharmacie et Odontologie de l'UCAD.

Nous avons utilisé la variété '*Koor*' dont la culture est la plus répandue au Sénégal. Le semis s'est fait par poquet et le semis direct s'est effectué en raison de 4 à 5 graines par poquets sur une profondeur de 2 à 3 cm. Les écartements utilisés étaient de 40-60 cm sur les lignes et de 60-90 cm entre les lignes.

La culture s'est faite sans avoir recours à de l'engrais, ou à des traitements phytosanitaires, ceci du fait de la robustesse de la plante.

La récolte des calices s'est faite à la main 2 à 3 semaines après la floraison, 4 mois après les semis avant que le fruit ne se dessèche et qu'il ne s'ouvre. A ce stade les calices sont tendres et charnus comme le montre la figure 27.

- **Récolte des calices**

La cueillette s'est faite en tenant dans une main le calice et en l'arrachant d'un coup sec pour le séparer de la plante. Le critère de récolte était l'appréciation de la couleur rouge vif caractéristique des calices. Ces derniers étaient rassemblés dans des sacs en plastique pour les transporter.

Ils ont été séchés pendant 1 semaine pour éviter les risques de formation de moisissures liées à l'humidité relative de la plante mais aussi pour faciliter sa conservation et son utilisation lors du broyage.

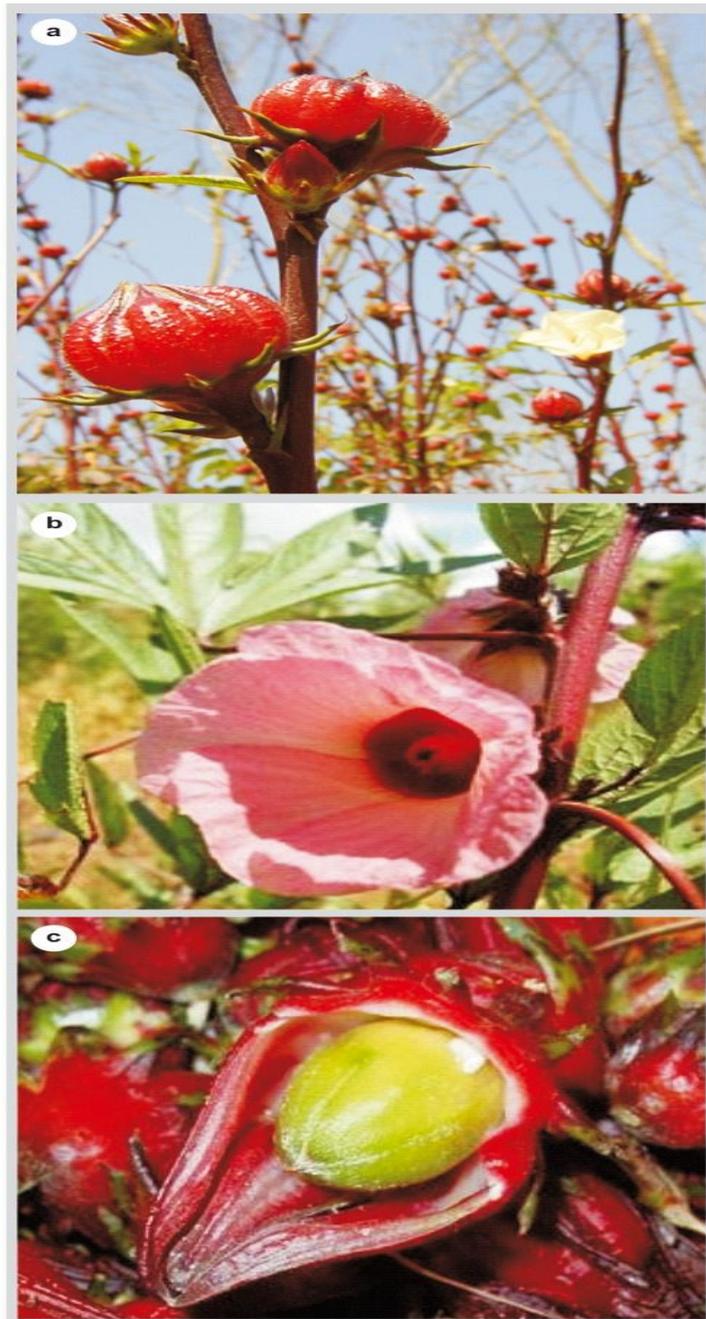


Figure 27 : *Hibiscus sabdariffa*, variété *sabdariffa* : (a) tige, feuilles et calices de la variété Koor ;(b) fleur ; (c) fruit et calice de la variété Koor à 120 jours de culture

- **Traitement post-récolte**

Après la récolte, les étapes de décorticage, de séchage, de conditionnement et de stockage ont été effectuées.

➤ **Décorticage** : C'est une opération délicate qui demande du personnel. Il consiste à prendre le calice dans la main et de faire une incision verticale avec les deux pouces pour séparer les calices et les capsules.

➤ **Séchage** : Il consiste à réduire l'humidité des calices de 86% ou à 16%, voire à 14% pour une bonne conservation. Le séchage s'est fait dans l'enceinte du laboratoire pour éviter l'exposition au soleil (source de perte des anthocyanes) sur des sacs en plastique étalés directement sur la paille propre, dans le souci d'éviter les souillures microbiennes. Le séchage s'est fait sur 8 jours. Un travail de tri a été effectué au préalable pour extraire les corps étrangers (sable, brindilles, feuilles, etc.).

➤ **Stockage et conditionnement**

Le stockage s'est fait dans des sacs en plastique propres après le séchage. Ces sacs sont fermés et gardés dans des endroits secs propres et clos. Le conditionnement se fait par de grandes quantités dans des sacs en plastique avant d'être traité.

I.5. Déroulement du protocole

I.5.1. Préparation des extraits bruts d'*Hibiscus sabdariffa*

La méthode de préparation choisie est la macération.

Comme solvant d'extraction, nous avons utilisé le méthanol à 60%, car ce dernier permet une extraction totale ou majoritaire des polyphénols et autres molécules qui seraient responsables des activités recherchées.

L'extraction se déroulera en 3 étapes :

- **La macération** : cette méthode de préparation a été choisie car elle permet de limiter la dégradation des composés thermolabiles.
- **La filtration** : elle est réalisée sous vide, à l'aide d'une fiole de Kitassato, un entonnoir et du papier filtre.
- **L'évaporation** : elle est réalisée à l'aide de l'évaporateur rotatif et permet de se débarrasser du méthanol et de l'eau

Ces différentes étapes de préparation de l'extrait brut d'*Hibiscus sabdariffa* sont présentées sur la figure 28.



Calices d'hibiscus

Broyage



Broyeur RM 100

Poudre (500g)

Macération



Extraction liquide/liquide
Solvant organique/Eau (**750 ml MeOH 60%/500ml H₂O**)
2 heures
+ Filtration

Extrait méthanolique

Évaporation



Rotavapor

- Température : $\leq 40^{\circ} \text{C}$
- Rotation : 4000tr/min



Extrait sec brut

Conservation : 4°C

Figure 28 : Schéma du processus de préparation de l'extrait d'*hibiscus sabdariffa*

Broyage

Le broyage permet la réduction des calices en particules très fines mais permet aussi l'obtention d'une poudre de faible ténuité, facilitant le processus d'extraction. Dans cette étude, nous avons utilisé le broyeur RM 100 (pour l'obtention d'une faible granulométrie) et un broyeur de marque Moulinex (pour la division fine).

Macération

Jour N°1: Macération

Dans le ballon verser 500g de poudre pour 1250ml de Me OH à 60% soit 750ml de Me OH pour 500ml d'eau distillée ;

- ajouter 1,25ml de TFA ;
- laisser macérer pendant 2 heures en prenant soin de remuer le ballon toutes les 15 min.

Après les 2 heures de macération, nos extraits liquides vont être conservés au réfrigérateur à 4°C avant l'étape d'évaporation à sec, car il se peut qu'il y ait des risques de dégradation des composés à température ambiante.

Les polyphénols sont des composés très sensibles qui s'oxydent très vite, d'où l'intérêt de veiller à conserver l'extrait au frais et à l'abri de la lumière.

Jour N°2: Filtration

On effectue une filtration sous vide à l'aide de la fiole de Kissato sur entonnoir puis sur coton hydrophile.

Jour N°2 et 3: Evaporation à sec

L'évaporation de l'extrait méthanolique (extrait hydro alcoolique) va être réalisé à l'aide de l'évaporateur rotatif pendant 3 jours successifs jusqu'à l'obtention d'un résidu sec. Les conditions d'évaporation ont été les suivantes :

Température : 40°C

Réfrigération : 21°C

Rotation : 4000 tr/min

Les caractéristiques de l'extrait sec et de l'extrait hydroalcoolique sont présentées dans le tableau III.

Tableau III : Principales caractéristiques de l'extrait sec et de l'extrait hydroalcoolique d'*Hibiscus sabdariffa*

Nature de l'extrait	Extrait sec	Extrait hydro alcoolique
Couleur	Rouge	Rouge
Aspect	Poudre micro granulée	Gélose
Odeur	Caractéristique	
Stockage/Conservation	A l'abri de la lumière et de l'humidité (T<25°C)	Conservation au frais à T= 4°C)

✚ Calcul du rendement d'extraction

Soit r le rendement d'extraction,

$$r = \frac{\text{Extrait sec évaporé}}{\text{Poids poudre végétal}}$$

Extrait sec évaporé = 136,78g

Poids de la poudre végétal = 500g

Application Numérique

$$\mathbf{R} = \frac{136,78}{500} \times 100 = 27,85\%$$

Le rendement d'extraction est de l'ordre de **27,85%**.

I.5.2. Caractérisation de l'activité antifalciformante des extraits :

Pour la caractérisation de l'activité antifalciformante des extraits, un test d'Emmel est réalisé.

Nous avons d'abord préparé extemporanément la solution de méta-bisulfite de sodium ($S_2O_5Na_2$) à 2 % (100 mg de méta-bisulfite de sodium dans 5 ml d'eau distillée).

Ce test consiste à déposer une goutte de sang (prélevé sur EDTA) au centre de la lame, y ajouter une goutte de méta-bisulfite de Na qui permet d'asphyxier les globules rouges puis mélanger soigneusement avec un côté de la lamelle et recouvrir avec cette dernière en s'assurant qu'il ne se forme aucune bulle d'air. Pour éviter que l'oxygène ne pénètre entre lame et lamelle, il faut luter les bords de la lamelle avec du vernis à ongle.

L'observation au microscope optique au grossissement 100, après 15min d'incubation, permet de rechercher des hématies falciformes. La falciformation est due à la polymérisation des HBS en l'absence d'oxygène.

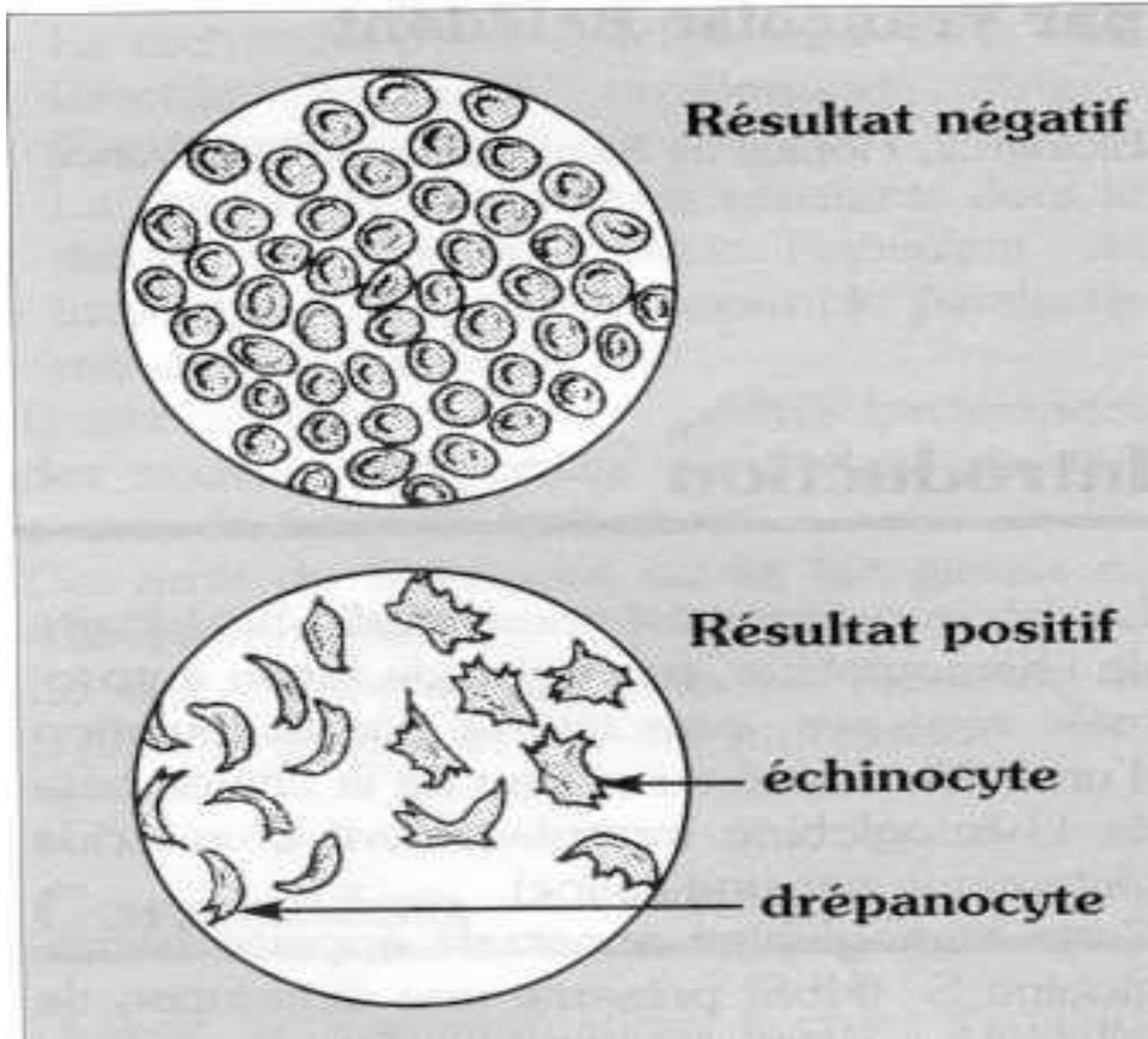


Figure 29 : Illustration de résultats de tests d'Emmel

✓ Préparation des solutions d'extrait d'*Hibiscus sabdariffa*

1mg d'extrait brut hydroalcoolique d'*Hibiscus sabdariffa* est dissout dans 1ml d'une solution d'eau physiologique (9 pour 1000 de NaCl) puis homogénéisée à l'aide d'un vortex. Ce qui nous permis d'avoir une solution mère d'*Hibiscus sabdariffa* à 1mg/ml.

A partir de cette solution, nous avons effectué deux dilutions au dixième :

1. Première dilution :

1ml de la solution d'*Hibiscus sabdariffa* à 1mg /ml est additionné avec 9ml de la solution physiologique pour obtenir une solution à 10^{-1} mg /ml.

2. Deuxième dilution

1ml de la solution d'*Hibiscus sabdariffa* à 10^{-1} mg /ml est additionné avec 9ml de la solution physiologique pour obtenir une solution à 10^{-2} mg /ml.

✓ Recherche de l'activité antifalciformante

Pour la recherche de l'activité antifalciformante, des tests d'Emmel sont réalisés avec la solution de métabisulfite de sodium préparée extemporanément chez les sujets AA, AS et SS suivi d'un comptage des drépanocytes au microscope optique au grossissement 100.

- **Etat basal** : les tests d'Emmel sont réalisés directement sur les prélèvements sanguins sans adjonction d'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* ni de tampon d'eau physiologique. Cela nous a permis de déterminer le niveau de falciformation à l'état basal c'est-à-dire sans effet supposé de l'eau physiologique ou de l'extrait.

➤ **Tampon** : 100µl de sang total sont mélangés avec 100 µl d'une solution tampon (solution physiologique) puis incubés pendant 45 min. Après incubation, des tests d'Emmel sont réalisés suivi d'un comptage des drépanocytes au grossissement 100.

➤ **Activité antifalciformante des extraits** : 100µl du sang total sont incubés avec 100 µl d'une solution d'*Hibiscus sabdariffa* à 1mg/ml pendant 45 minutes. Puis nous avons réalisé des tests d'Emmel suivi d'un comptage des drépanocytes au microscope optique (X 100). Ce même protocole sera suivi pour les concentrations d'extrait à 10^{-1} mg/ml et 10^{-2} mg/ml.

✓ **Technique de comptage des drépanocytes**

Une moyenne de 50 cellules sanguines par champ (drépanocytes et cellules normales) est obtenue après comptage de 5 champs au microscope à l'objectif X 100.

$$\Rightarrow N \text{ cellules} / 5 \Rightarrow 50 \text{ cellules/champ}$$

Puis nous avons procédé au comptage des drépanocytes à l'état basal ; avec le tampon d'eau physiologique et en présence des différentes concentrations d'extraits d'*Hibiscus sabdariffa* (1 mg/ml, 10^{-1} mg/ml et 10^{-2} mg/ml). Le nombre de drépanocytes obtenu après comptage au hasard de 5 champs est divisé par 5. C'est ce qui nous a permis de déterminer le nombre de drépanocytes par champ.

$$\Rightarrow N \text{ drépanocytes} / 5 \Rightarrow n \text{ drépanocytes} / \text{champ}$$

Le nombre n de drépanocytes peut varier d'un échantillon à l'autre ; mais également pour un même échantillon selon que l'on ajoute le tampon d'eau physiologique ou les différentes concentrations d'extraits d'*Hibiscus sabdariffa* (1 mg/ml, 10^{-1} mg/ml et 10^{-2} mg/ml).

I.5.3. Mesure de la viscosité sanguine :

Les mesures de la viscosité sanguine sont réalisées sur le sang total à l'état basal ; après adjonction de la solution tampon d'eau physiologique mais également après adjonction des différentes concentrations d'extraits d'*Hibiscus sabdariffa*

(1 mg/ml).

Un viscosimètre rotatif cône-plan de type brookfield DVII+Pro nous a permis de mesurer à 37°C les différentes vitesses de cisaillement de 1 s^{-1} à 375 s^{-1} pour la viscosité sanguine.

- **Etat basal :** 4 ml sang total prélevés sur tube EDTA, sont utilisés pour la mesure de la viscosité sanguine à l'état basal aussi bien chez les témoins normaux (HbA) que chez les porteurs du trait drépanocytaire (HbAS) et drépanocytaires SS.

- **Tampon :** 2 ml de sang total (témoins normaux AA, porteurs du trait drépanocytaire AS et drépanocytaires SS) sont additionnés à volume égal avec de l'eau physiologique (tampon).

Ce qui nous a permis d'obtenir 4 ml d'un mélange sang + eau physiologique que nous avons ensuite incubé pendant 45 min. La viscosité du mélange est mesurée aussitôt après l'incubation chez les témoins AA, les porteurs du traits drépanocytaire AS et chez les drépanocytaires SS.

- **Propriétés rhéologiques des extraits** : 2 ml de sang total (témoins normaux AA, porteurs du trait drépanocytaire AS et drépanocytaires SS) sont additionnés à volume égal avec différentes concentrations d'extraits d'*Hibiscus sabdariffa* (1mg/ml).

Ce qui nous a permis d'obtenir 4 ml d'un mélange sang + extraits que nous avons ensuite incubé pendant 45 min. La viscosité du mélange est mesurée aussitôt après l'incubation chez les témoins AA, les porteurs du traits drépanocytaire AS et chez les drépanocytaires SS.

III.6. Analyse statistique

L'analyse statistique des résultats a été faite avec le logiciel Anova. Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives.

II. Résultats

II.1. Activités antifalciformantes des extraits d'*Hibiscus sabdariffa*

- Le nombre de drépanocytes par champ obtenu à l'état basal chez les drépanocytaires SS (7,53 drépanocytes/champ) est supérieur à celui obtenu avec les porteurs du trait drépanocytaire AS (6,20 drépanocytes / champ). Aucune falciformation n'a été observée chez les témoins normaux (0 drépanocyte/champ).

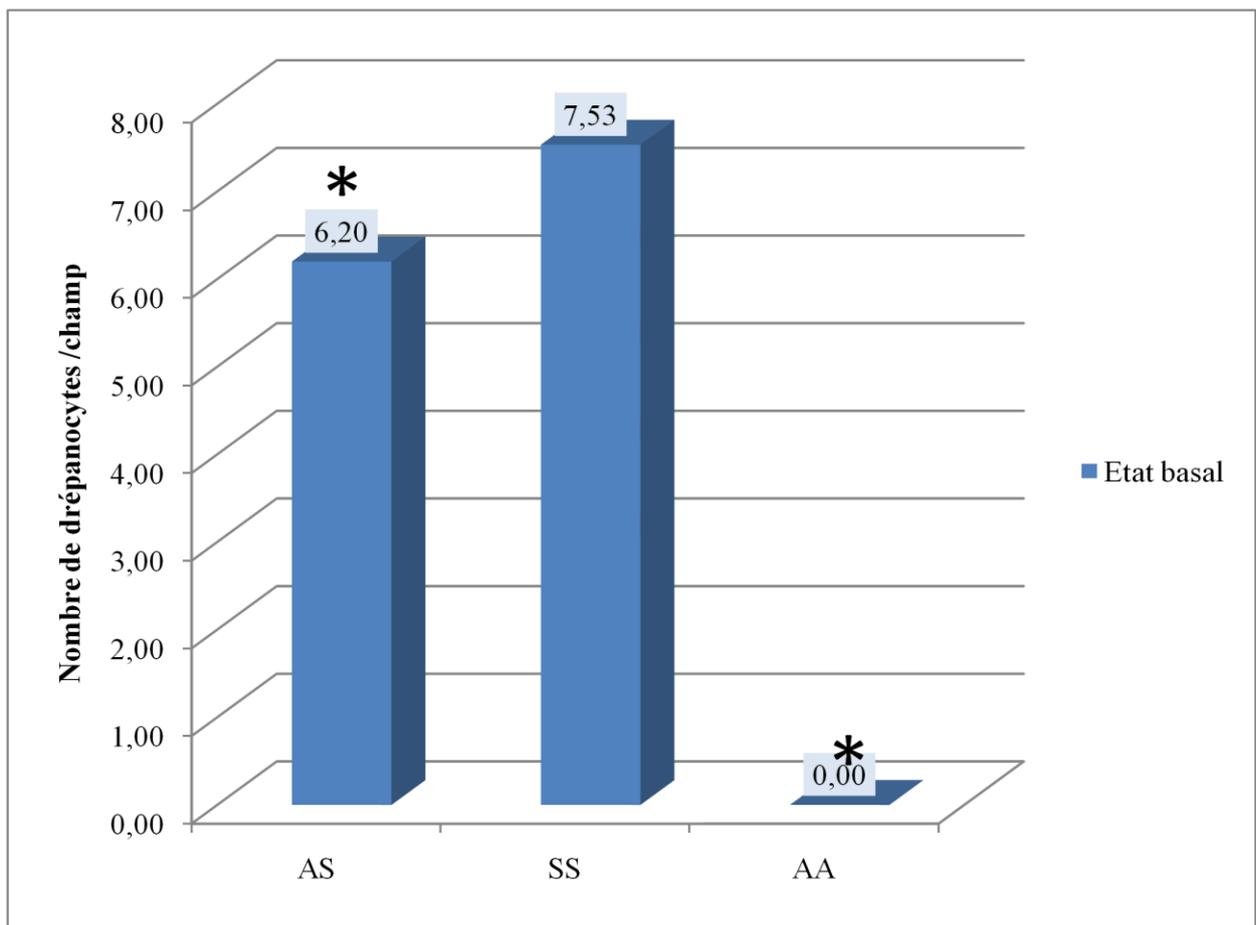


Figure 30 : Nombre moyen de drépanocytes par champ à l'état basal chez les porteurs du trait drépanocytaire AS, chez les drépanocytaires SS et chez les témoins normaux AA. * $p < 0.05$ par rapport aux sujets SS.

- L'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* aux doses de 1 mg/ml et 10^{-1} mg/ml induit une diminution significative du nombre de drépanocytes aussi bien chez les sujets drépanocytaires que chez les sujets porteurs du trait drépanocytaire. Un effet similaire mais moins important est observé en présence du tampon seul (figures 31 et 32).

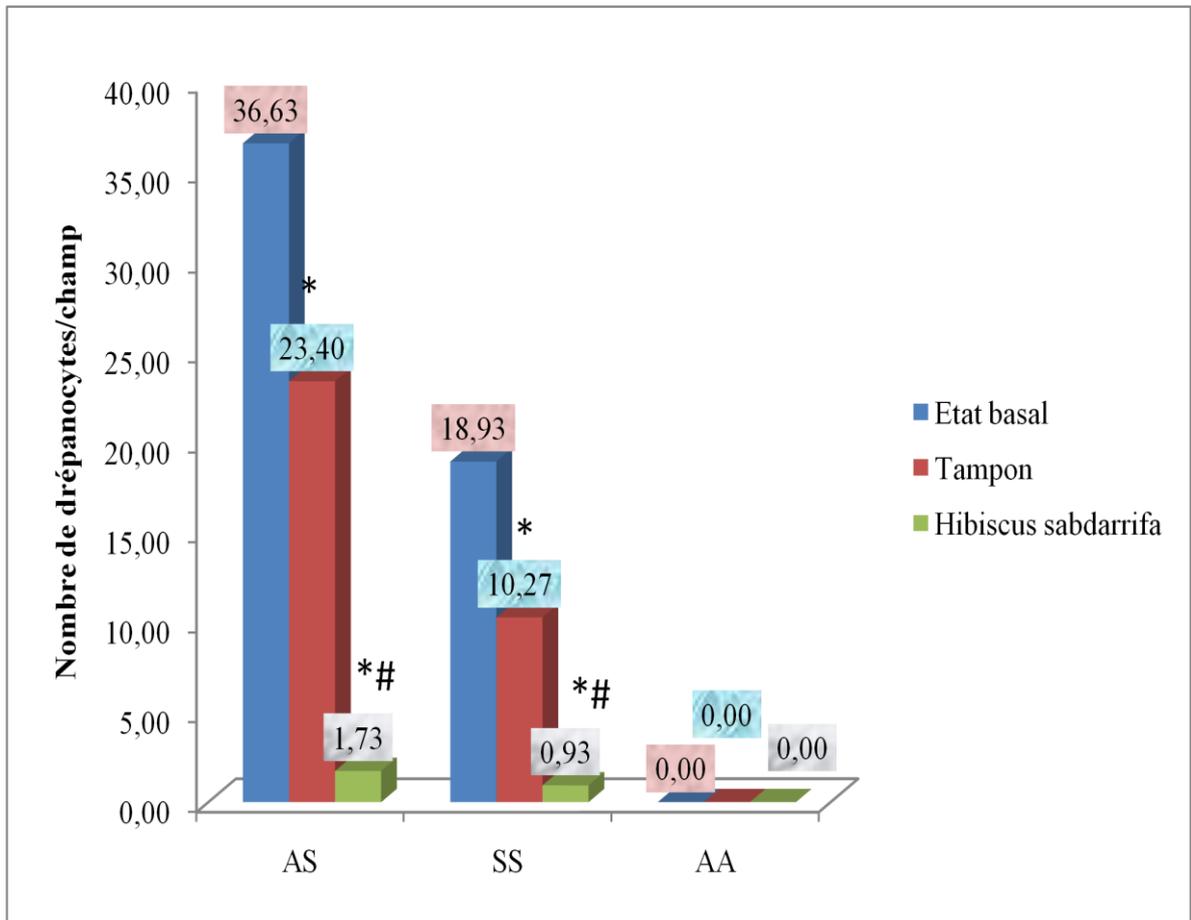


Figure 31 : Effets de l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* (1 mg/ml) et du tampon sur la falciformation des hématies chez les porteurs du trait drépanocytaire AS ; chez les drépanocytaires SS et chez les témoins normaux AA. * $p < 0.05$ par rapport à l'état basal. # $p < 0.05$ par rapport au tampon.

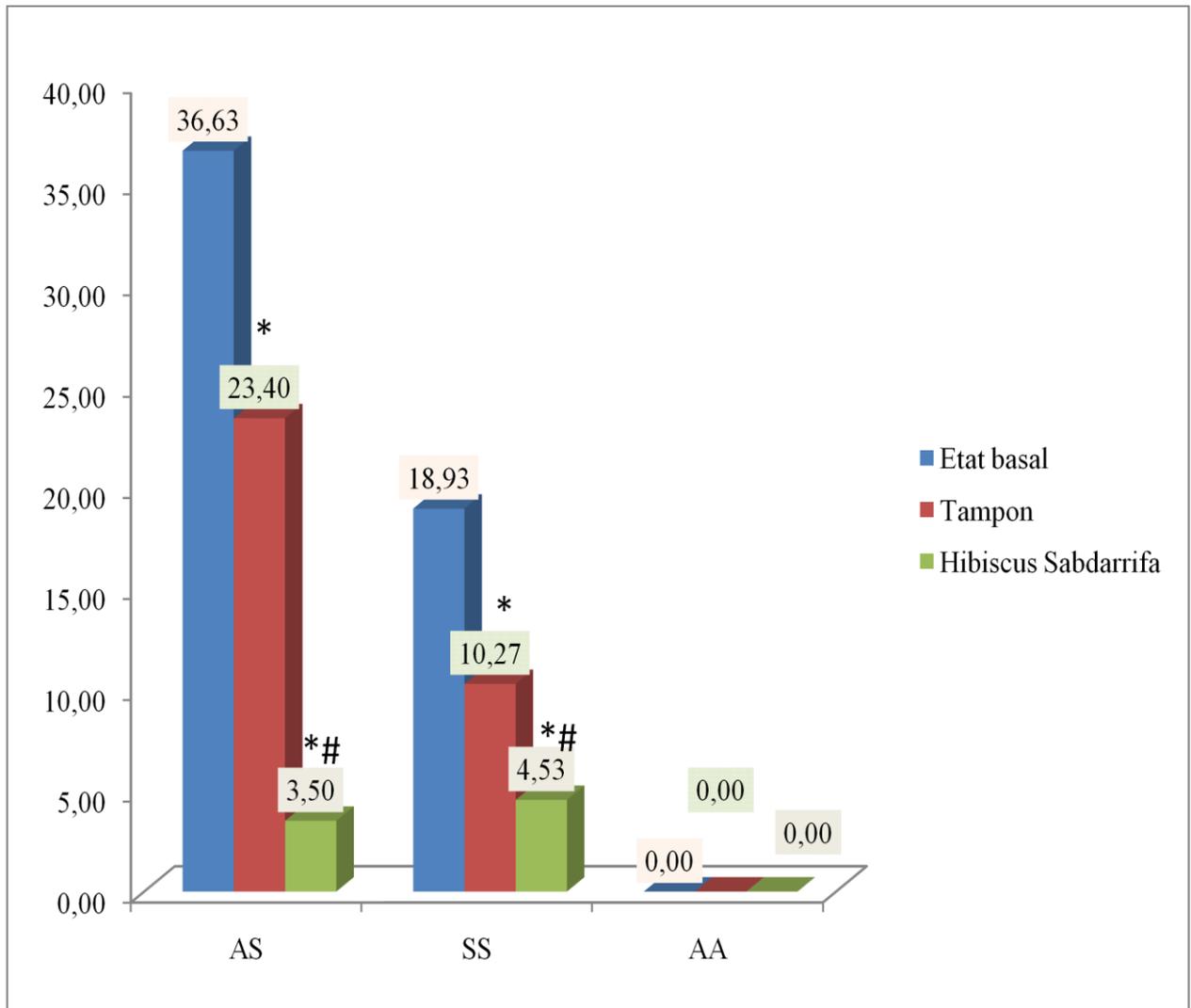


Figure 32 : Effets de l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* (10^{-1} mg/ml) et du tampon sur la falciformation des hématies chez les porteurs du trait drépanocytaire AS ; chez les drépanocytaires SS et chez les témoins normaux AA. * $p < 0.05$ par rapport à l'état basal. # $p < 0.05$ par rapport au tampon.

- L'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* à la dose de 10^{-2} mg/ml induit une diminution significative du nombre de drépanocytes par rapport à l'état basal et au tampon chez les sujets AS. Par contre chez les sujets SS l'effet de l'extrait à cette concentration n'est plus significatif.

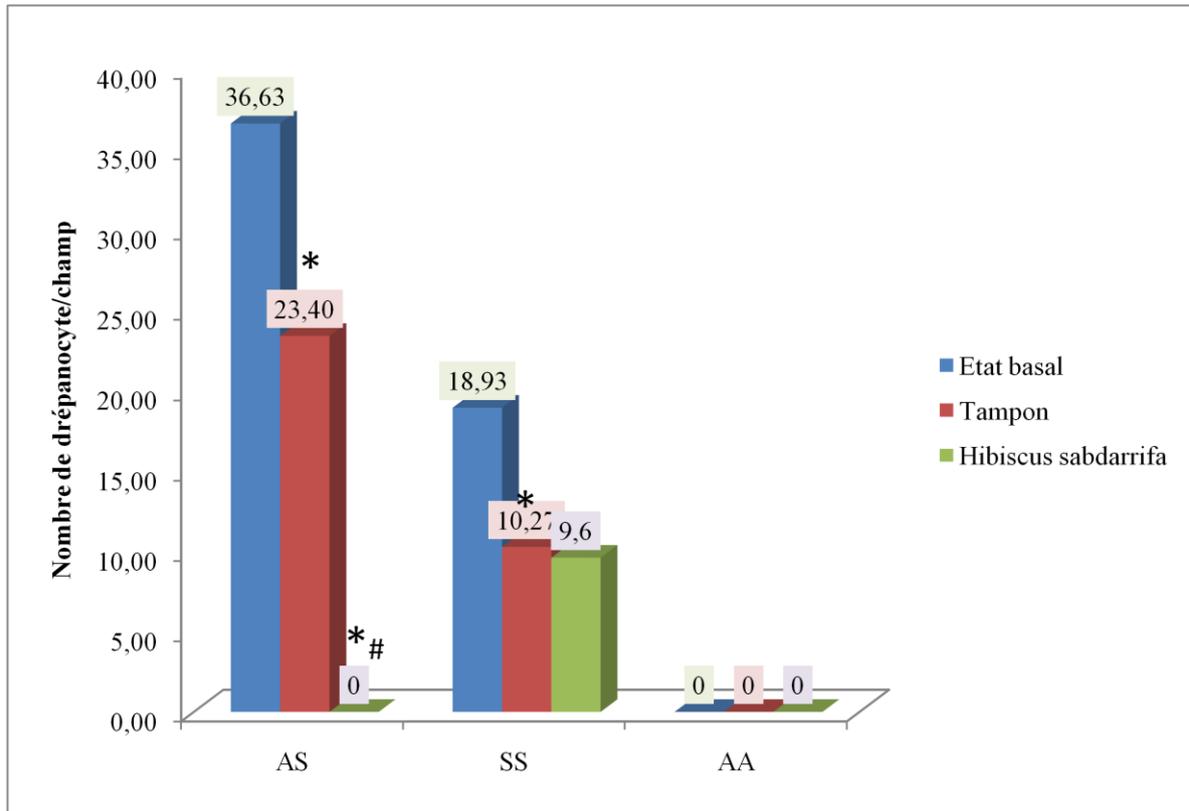


Figure 33 : Effets de l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* (10^{-2} mg/ml) et du tampon sur la falciformation des hématies chez les porteurs du trait drépanocytaire AS ; chez les drépanocytaires SS et chez les témoins normaux AA. * $p < 0.05$ par rapport à l'état basal. # $p < 0.05$ par rapport au tampon.

- La diminution du nombre de drépanocytes induite par l'extrait est dose dépendante chez les sujets SS. A la concentration de 1 mg/ml, nous avons obtenu en moyenne 0,93 drépanocyte/champ ; 4,53 à la concentration de 10^{-1} mg/ml ; et 9,6 à la concentration de 10^{-2} mg/ml.

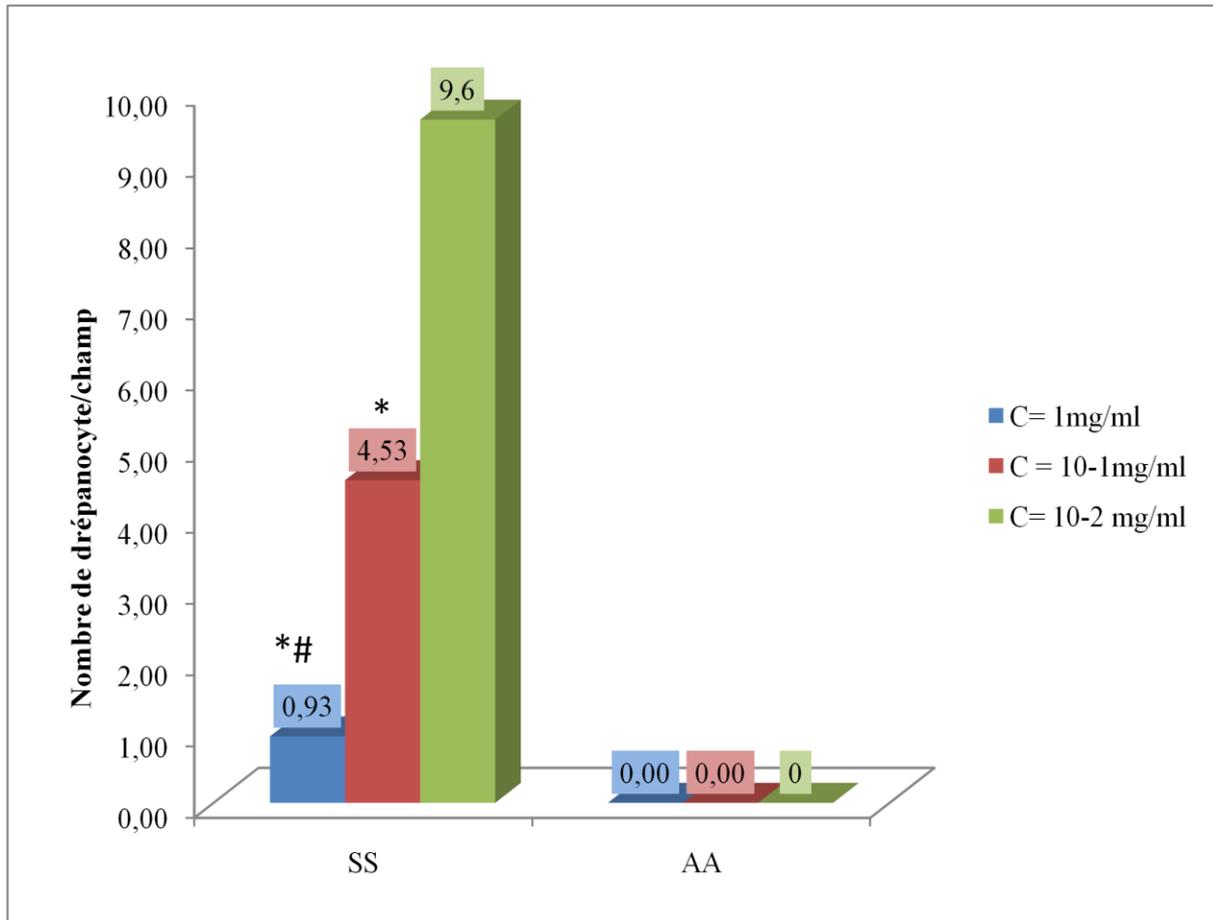


Figure 34 : Effets dose-dépendants de l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* chez des sujets drépanocytaires SS et des témoins normaux AA. * $p < 0.05$ par rapport à 10^{-2} mg/ml. # $p < 0.05$ par rapport à 10^{-1} mg/ml.

II.2- Effet des extraits d'*Hibiscus sabdariffa* sur la viscosité sanguin

- La viscosité sanguine à l'état basal des porteurs du trait drépanocytaire AS (8,15 Pa.s) est supérieure à la viscosité sanguine moyenne des sujets drépanocytaires SS (6,17 Pa.s) et celle des témoins normaux AA (5,55 Pa.s).

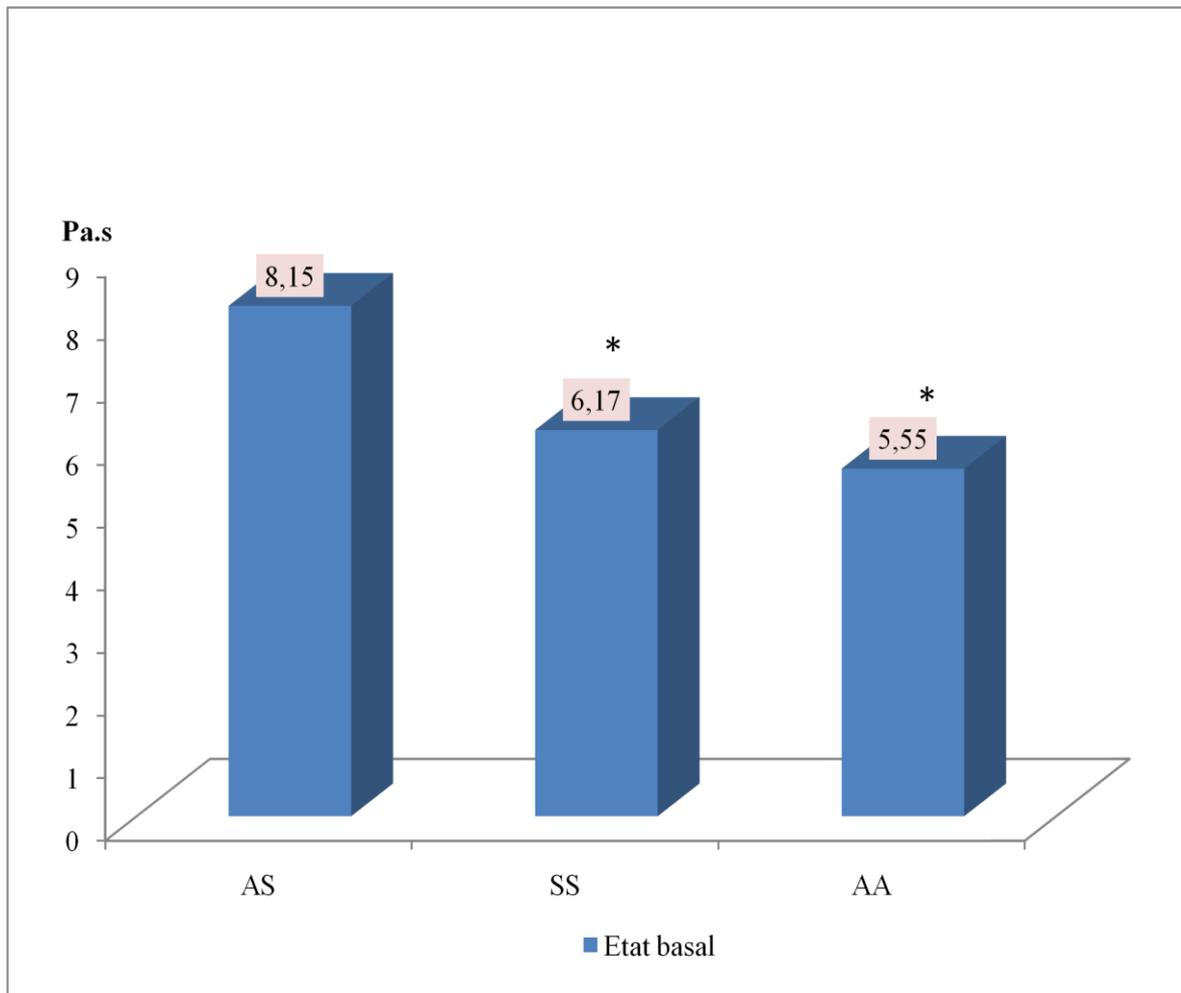


Figure 35: Valeur moyenne de la viscosité sanguine à l'état basal chez les porteurs du trait drépanocytaire AS ; chez les drépanocytaires SS et chez les témoins normaux AA.

- L'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* induit une baisse significative de la viscosimétrie des sujets porteurs du trait drépanocytaire et les sujets drépanocytaires. Un effet similaire est observé avec le tampon seul mais dans une moindre mesure (figures 36 et 37).

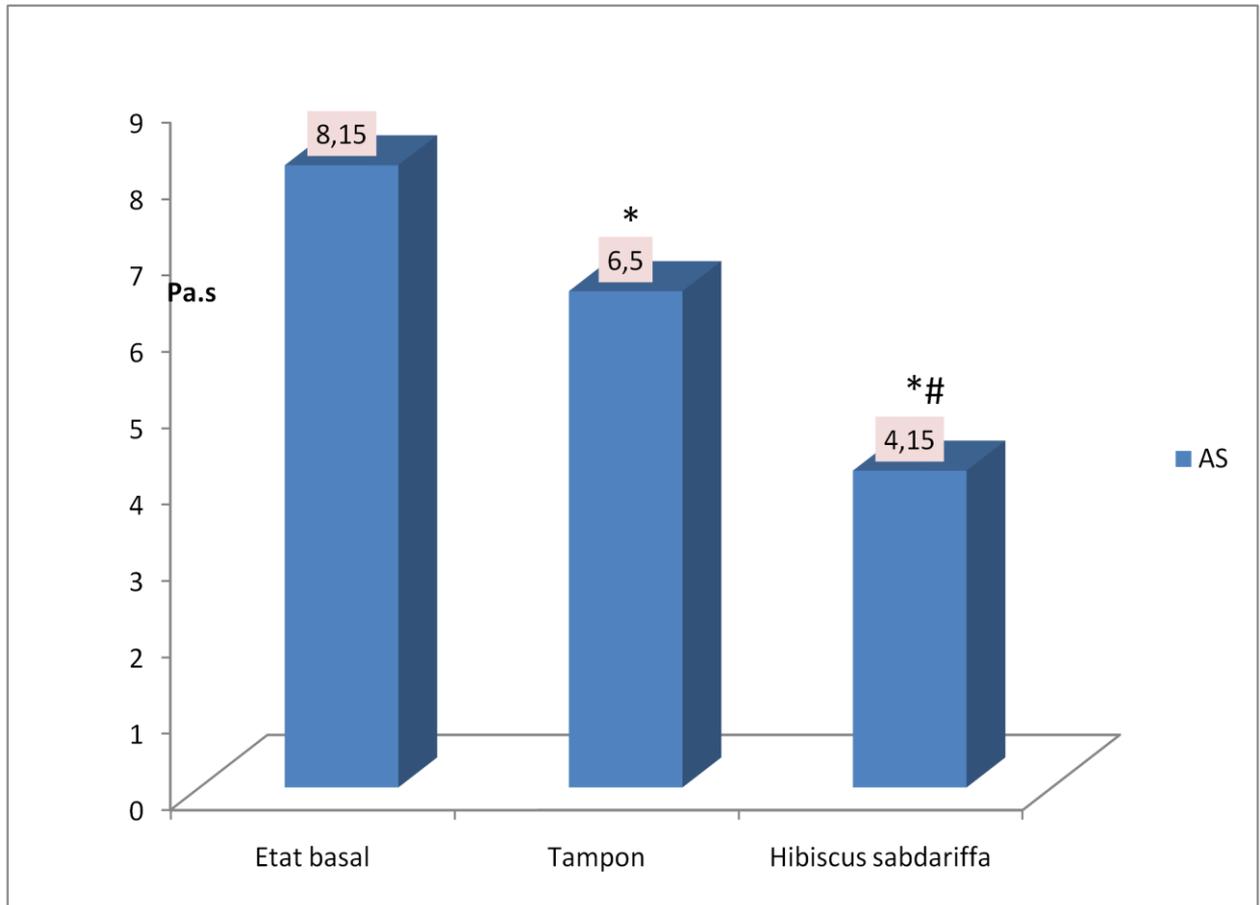


Figure 36 : Effet de l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* à 1 mg/ml sur la viscosité sanguine des sujets porteurs du trait drépanocytaire. * $p < 0.05$ par rapport à l'état basal. # $p < 0.05$ par rapport au tampon.

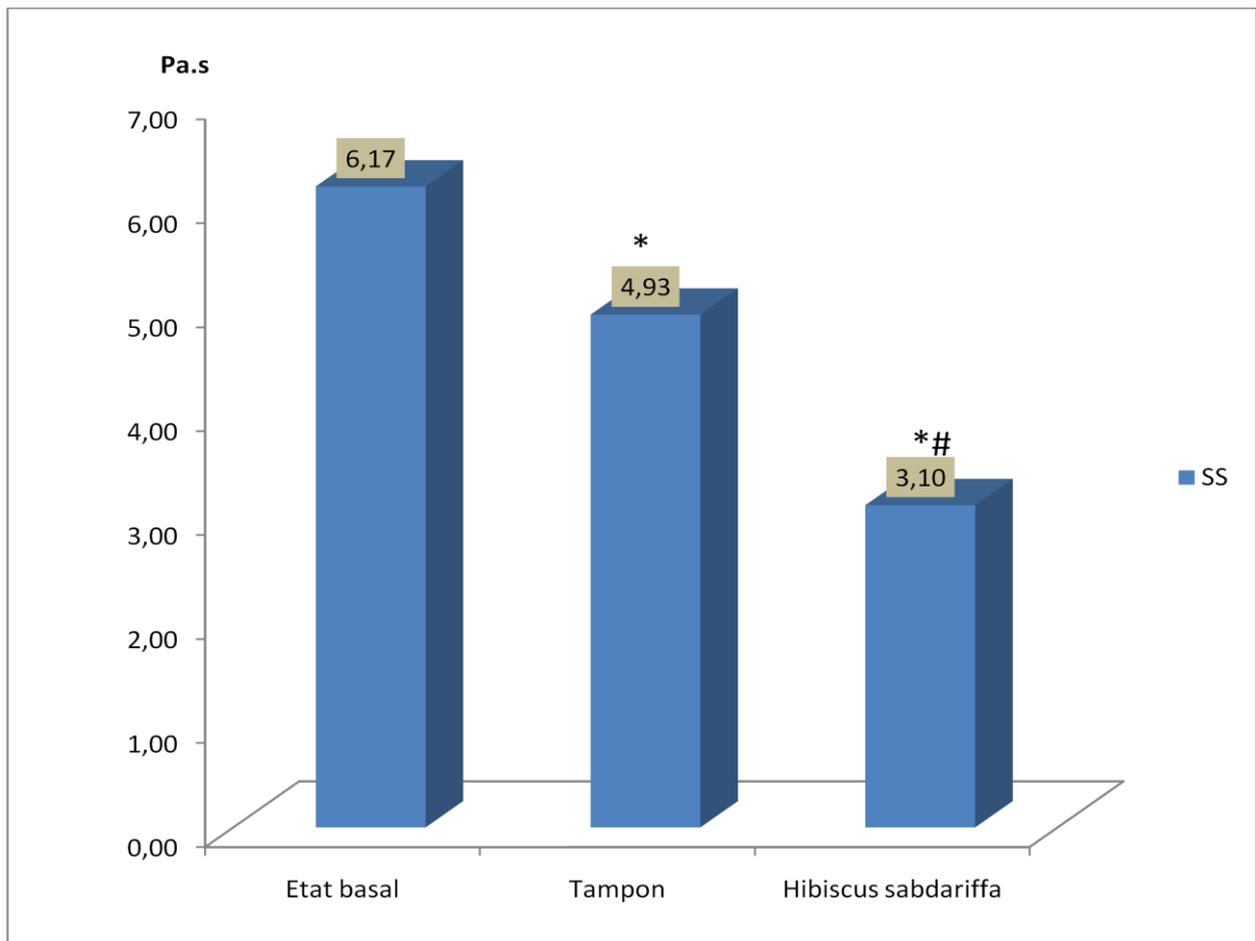


Figure 37 : Effet de l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* à 1 mg/ml sur la viscosité sanguine des sujets drépanocytaires SS. * $p < 0.05$ par rapport à l'état basal. # $p < 0.05$ par rapport au tampon.

- L'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* induit une baisse significative de la viscosimétrie des sujets témoins normaux.

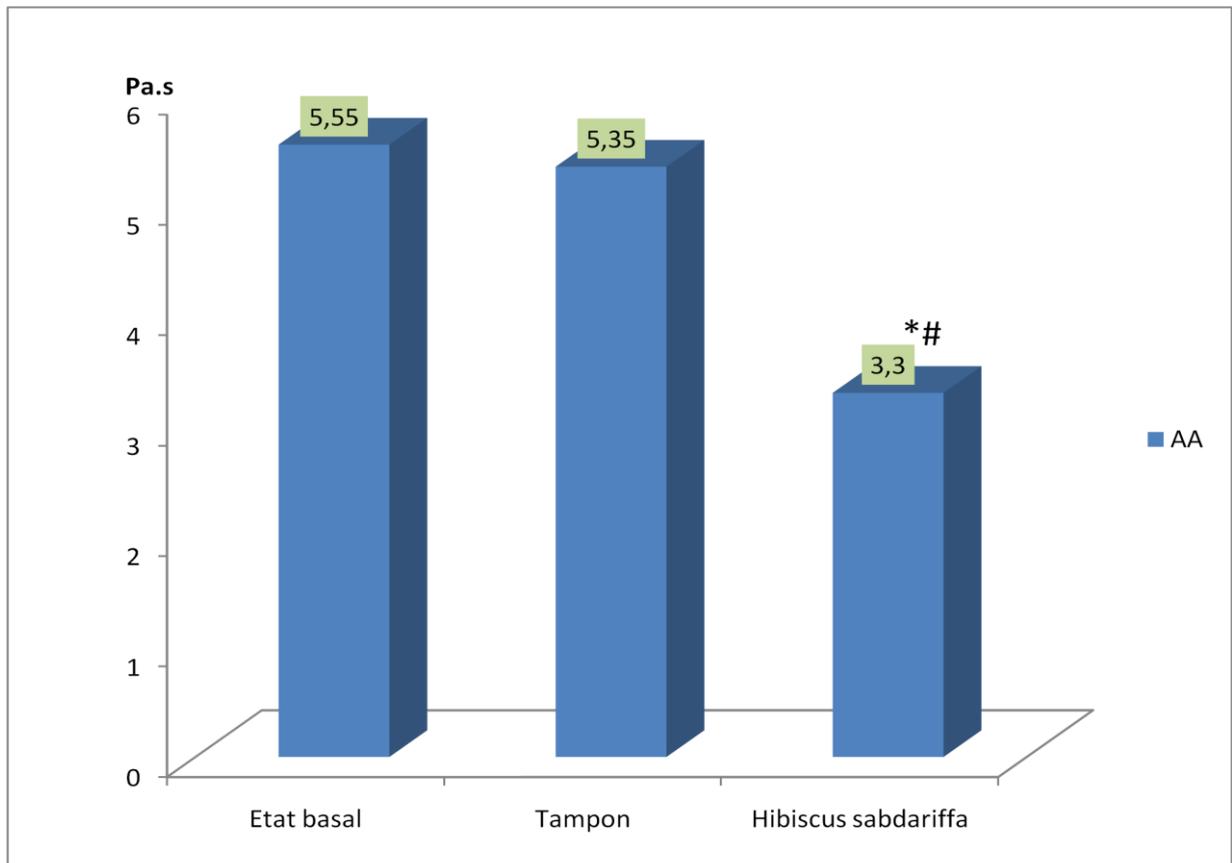


Figure 38 : Effet de l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* à 1 mg/ml sur la viscosité sanguine des témoins normaux AA. * $p < 0.05$ par rapport à l'état basal. # $p < 0.05$ par rapport au tampon.

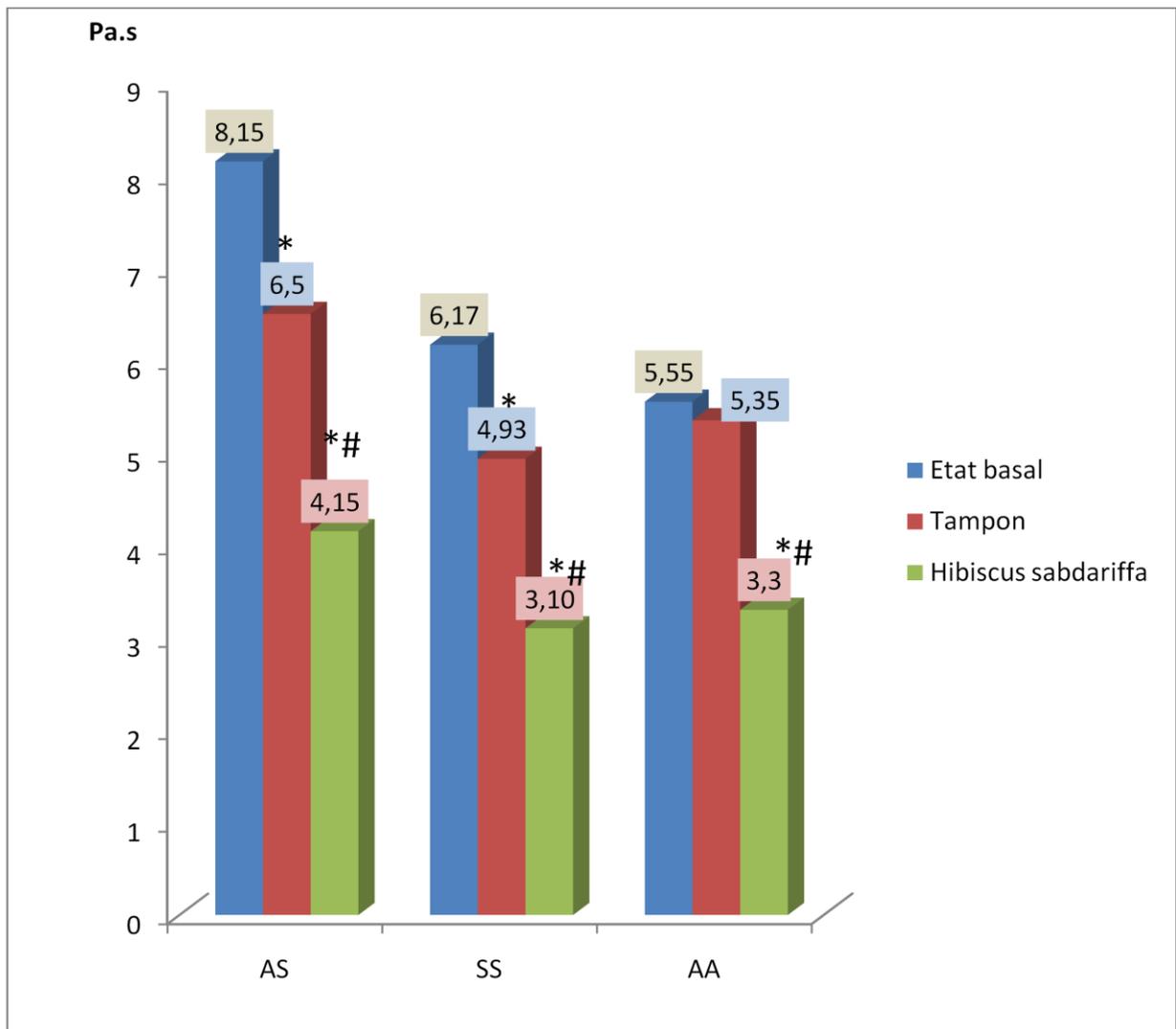


Figure 39 : Résultats cumulatifs des effets de l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* à

1 mg/ml sur la viscosité sanguine des sujets porteurs du trait drépanocytaire, des sujets drépanocytaires et des témoins normaux. * $p < 0.05$ par rapport à l'état basal. # $p < 0.05$ par rapport au tampon.



DISCUSSION

L'objectif de notre travail a été de caractériser les effets hémorhéologiques et antifalciformants *in vitro* d'extraits bruts d'*Hibiscus sabdariffa* chez des sujets porteurs du trait drépanocytaire AS et des sujets drépanocytaires SS.

Le recueil des prélèvements n'a pas été facile du fait de la difficulté de trouver des sujets qui répondent à nos critères d'inclusion : adultes hommes et femmes âgés de 25 à 45 ans, indemnes de maladie tuberculeuse, syphilitique ou HIV ; porteurs du trait drépanocytaire AS ou drépanocytaires SS et qui acceptent de participer à l'étude. Les prélèvements ont été recueillis au niveau du centre national de transfusion sanguine auprès des patients venus pour une électrophorèse de l'hémoglobine.

Les résultats obtenus au cours de ce travail démontrent les effets antifalciformants *in vitro* de l'extrait hydro-alcoolique d'*Hibiscus sabdariffa*, chez des sujets porteurs du trait drépanocytaire AS et des sujets drépanocytaires SS.

A l'état basal, nos résultats montrent que le nombre de drépanocytes par champ chez les drépanocytaires SS (7,53 drépanocytes/champ) est plus élevé comparé à celui des porteurs du trait drépanocytaire AS (6,20 drépanocytes/champ). Ceci s'explique par le fait que les sujets porteurs homozygotes de la tare possèdent une fraction hémoglobinique majoritaire constituée de l'hémoglobine S tandis que les porteurs hétérozygotes possèdent deux fractions : une fraction A1 et une fraction S [Beyeme et al., 2004]. Par conséquent la falciformation est plus accentuée chez les drépanocytaires SS car la substitution de l'acide glutamique par la valine "démasque" les zones de contacts hydrophobes lorsque l'hémoglobine perd son oxygène.

Ceci favorise des liaisons hydrophobes au niveau de certains sites peptidiques avec une ou plusieurs autres molécules d'hémoglobine S induisant la polymérisation et la formation d'un cristal non soluble de la désoxyHbS. Cette cristallisation provoque la déformation du globule rouge.

Aucune falciformation n'est observée chez les sujets témoins normaux qui ont de l'hémoglobine normale AA. En effet, la falciformation en situation d'hypoxie, est due à la présence de l'hémoglobine S [**Mignonsin et al.,1993**]

L'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* aux doses de 1 mg/ml et 10^{-1} mg/ml présente une activité antifalciformante aussi bien chez les sujets porteurs du trait drépanocytaire AS que chez les sujets drépanocytaires SS. En effet une diminution significative du nombre de drépanocytes par champ est observée en présence de l'extrait. Un effet similaire mais de moindre importance est observé en présence du tampon. Cette action du tampon sur la falciformation pourrait s'expliquer par l'effet hydratant du tampon sur le globule rouge. En effet les propriétés rhéologiques des drépanocytes déshydratés ne sont que partiellement réversibles par hydratation, suggérant des changements squelettiques membraneux permanents, impliqués dans le processus de rigidification. Néanmoins, la réduction de la concentration d'hémoglobine de la cellule par leur dilatation ou la prévention de la génération de cellules déshydratées devrait améliorer leur compétence rhéologique [**Clark et al., 1980**].

A la dose de 10^{-2} mg/ml nous avons observé la même tendance avec une diminution significative du nombre de drépanocytes chez les sujets AS. Par contre à cette concentration, l'effet de l'extrait chez les sujets SS n'est plus significatif.

La diminution du nombre de drépanocytes induite par l'extrait est dose dépendante chez les sujets SS.

D'autres études menées sur ce même modèle drépanocytaire avec des extraits dont la composition est similaire à notre extrait notamment leur richesse en polyphénols, ont montré une activité anti falciformante. En effet, l'extrait hydro alcoolique de *Morinda lucida* a entraîné un taux d'inhibition de 17,30 % du processus de falciformation à la concentration de 1 mg/ml [**Joppa KM et al.**].

L'extrait hydroalcoolique d'écorces de *Fagara zanthoxyloides*, un arbre très répandu au Burkina Faso avec 3 molécules de polyphénols isolées à savoir les Burkinabines A, B et C (acide hydroxyméthyl-benzoïque et zanthoxylol) ; possède la propriété d'empêcher la falciformation des érythrocytes des patients drépanocytaires. Le mécanisme d'action d'une telle propriété n'est pas encore élucidé, même si une hypothèse stipule que ces composés agiraient sur les canaux ioniques du cytosquelette cellulaire [Cissé R et al. 1998].

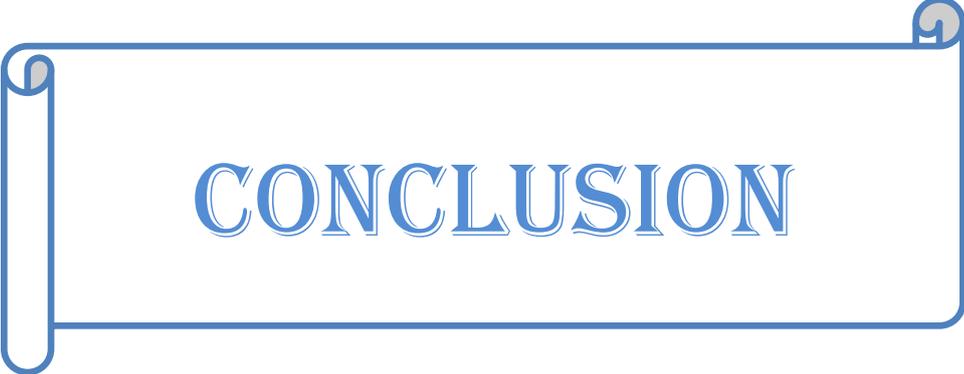
S'agissant des tests hémorhéologiques, nos résultats montrent qu'à l'état basal, la viscosité sanguine des porteurs du trait drépanocytaire AS (8,15 Pa.s) est supérieure à la viscosité sanguine des sujet drépanocytaires SS (6,17 Pa.s) et à celle des témoins normaux AA (5,55 Pa.s). Ce résultat un peu paradoxal pourrait s'expliquer par le fait que l'hématocrite chez les sujets AS est plus élevée que celui des sujets SS et AA. En effet la viscosité du sang est liée à la viscosité du plasma (phase portante), à l'hématocrite, à la déformabilité et à l'agrégabilité des globules (99% des éléments cellulaires) [Baskurt et al., 2003]. Dès lors il aurait été intéressant de mesurer la viscosité plasmatique qui serait plus élevée chez les sujets SS que chez les sujets AS et AA. Il est logique alors d'interpréter ce tableau hémorhéologique dans la maladie drépanocytaire par la composante inflammatoire du syndrome. En effet, lors de toute réaction inflammatoire, la réponse de la paroi vasculaire se traduit par une activation des cellules endothéliales avec accroissement de la perméabilité vasculaire.

Simultanément, les leucocytes neutrophiles et autres polynucléaires sont activés, contribuant à la mise en place d'une réponse systémique mettant en jeu des cytokines pro inflammatoires, avec augmentation des concentrations circulantes de protéines de l'inflammation (fibrinogène).

Cette réponse systémique produit une augmentation de la viscosité plasmatique, de l'agrégation des hématies, et de la rigidité des hématies [Gaudard A et al. 2003].

De nos résultats, il ressort que l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* induit une diminution significative de la viscosité sanguine des sujets porteurs du trait drépanocytaire et des sujets drépanocytaires. Un effet similaire est observé avec le tampon seul mais dans une moindre mesure. Ceci pourrait être expliqué par l'effet-dilution obtenu avec la solution tampon d'eau physiologique. Cependant la différence significative entre l'effet de l'extrait et celui du tampon prouve l'action bénéfique de l'extrait.

Cette action bénéfique de l'extrait sur la viscosité sanguine est confirmée chez les sujets témoins normaux AA suggérant un effet bénéfique sur la pression artérielle (anti-hypertenseur). D'ailleurs les effets anti-hypertenseurs d'*Hibiscus sabdariffa* ont été largement démontrés par de nombreux travaux scientifiques. Au laboratoire, des travaux antérieurs ont montré des propriétés vasodilatatrices dépendantes de l'endothélium et du monoxyde d'azote (NO) [Sarr et al., 2010]. Ceci constitue un effet bénéfique supplémentaire sur le traitement de la drépanocytose en augmentant la biodisponibilité du NO. Son effet antifalciformant permettrait également de réduire la lyse accrue des hématies falciformes, hémolyse largement incriminée dans la dysfonction endothéliale et la baisse de la biodisponibilité du NO [Steinberg et al., 2006 ; Gladwin et al., 2005].



CONCLUSION

La drépanocytose constitue un véritable fléau et reste la plus fréquente des hémoglobinopathies affectant plus de 4% de la population mondiale [OMS ., 2006]. Sa prévalence sur le continent Africain atteint 5% à 7% de la population et sa fréquence est maximale en Afrique sub-saharienne [Gentilini et al ., 1986] où elle constitue un véritable problème de santé publique.

Au Sénégal, les études épidémiologiques effectuées en milieu scolaire ont retrouvé une prévalence de 10% de porteurs de l'hémoglobine S [Gaye et al ., 1986].

La meilleure connaissance de la maladie a entraîné d'incontestables progrès depuis trente ans tant au plan fondamental que clinique.

Cette pathologie est caractérisée par des perturbations hémorhéologiques. Parmi celles-ci, on trouve une hyperviscosité sanguine chez les porteurs du trait drépanocytaire (AS). Par contre, chez les drépanocytaires SS, on note une diminution de la viscosité sanguine, comparés aux porteurs du trait drépanocytaire [Lemonne et al .,2012].

Des études ont montré qu'une préparation à partir de 2 plantes, *Fagara xanthoxyloides* (Rutaceae) et *Calotropis procera* (Asclepiadaceae), traditionnellement utilisée dans le traitement de la drépanocytose, présentait des propriétés antifalciformantes, anti-inflammatoires, analgésiques, antipyrétiques et myorelaxantes [Bruneton et al .,2009]. Ces propriétés ont été évaluées non seulement sur la préparation, mais également sur chaque plante prise séparément à partir des extraits aqueux et hydro-alcooliques très riches en polyphénols et les résultats obtenus sont satisfaisants [Lyons et al., 2005] .

Des études ont également rapporté qu'*Hibiscus sabdariffa* (Malvaceae), une plante à usage alimentaire fréquemment utilisée en Afrique et connue pour ses propriétés thérapeutiques notamment sur les maladies cardiovasculaires, était riche en polyphénols et possédait des propriétés vasorelaxantes [Cissé et al .,2008 ; Sakaly et al .,2008 ; Léye et al. ,2011] .

Du fait de la ressemblance de ces différentes plantes notamment en termes de composition chimique (richesse en polyphénols) et de propriétés thérapeutiques, nous avons pensé à mener une étude permettant d'une part de caractériser les effets hémorhéologiques par la détermination du niveau de viscosité sanguine des sujets porteurs du trait drépanocytaire AS et des sujets drépanocytaires SS en présence d'extraits bruts hydroalcooliques d'*Hibiscus sabdariffa* ; et d'autre part évaluer les propriétés antifalciformantes *in vitro* de ces même extraits chez des sujets porteurs du trait drépanocytaire AS et des sujets drépanocytaires SS.

De nos résultats, il ressort que l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* aux doses de 1 mg/ml et 10^{-1} mg/ml induit une diminution significative du nombre de drépanocytes aussi bien chez les sujets drépanocytaires que chez les sujets porteurs du trait drépanocytaire. Un effet similaire mais moins important est observé en présence du tampon seul. En effet la diminution du nombre de drépanocytes observée avec la solution tampon peut être expliquée d'une part par l'effet du tampon, d'autre par l'effet bénéfique de l'hydratation sur la rigidité du globule rouge falciforme.

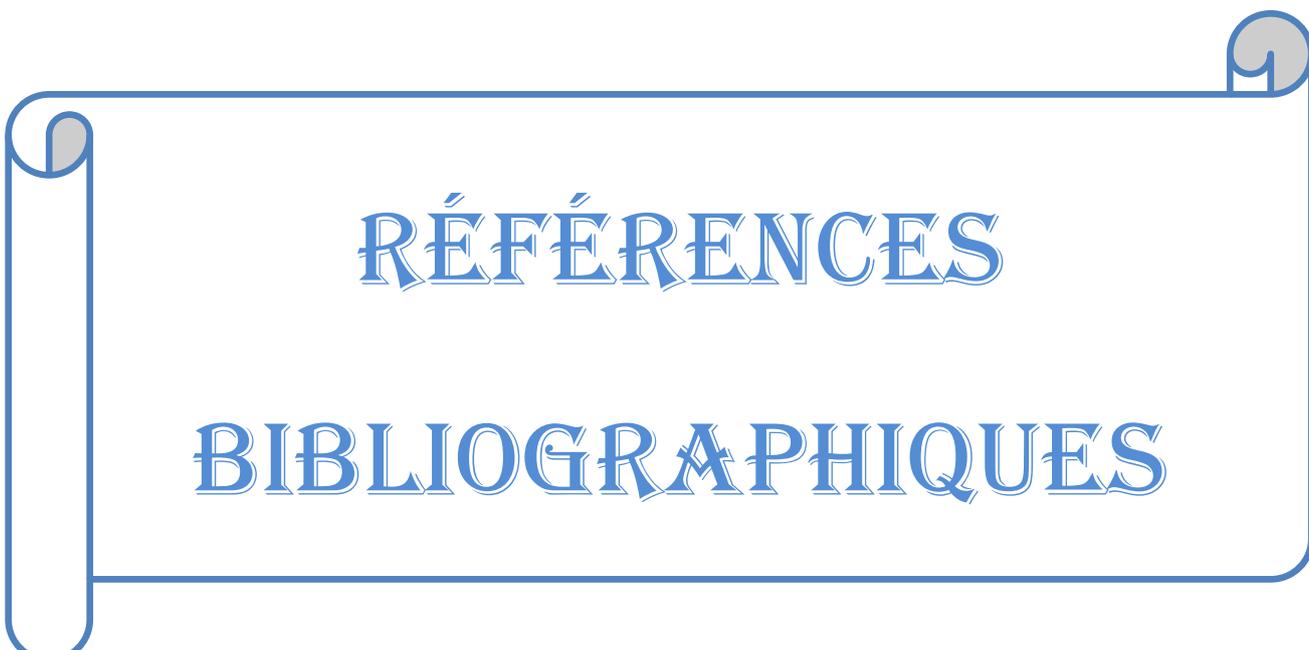
Nos résultats ont montré également que la diminution du nombre de drépanocytes induite par l'extrait est dose-dépendante chez les sujets SS. A la concentration de 1 mg/ml, nous avons obtenu en moyenne 0,93 drépanocyte/champ ; 4,53 à la concentration de 10^{-1} mg/ml ; et 9,6 à la concentration de 10^{-2} mg/ml.

Les résultats de notre étude montrent que la viscosité sanguine à l'état basal des porteurs du trait drépanocytaire AS (8,15 Pa.s) est supérieure à la viscosité sanguine moyenne des sujet drépanocytaires SS (6,17 Pa.s) et celle des témoins normaux AA (5,55 Pa.s). Ces résultats sont superposables à ceux obtenus dans d'autres études et pourraient être expliqués par le faible taux d'hématocrite et une expansion du volume plasmatique observé chez les drépanocytaire SS [Lemonne et al ., 2012].

Enfin nos résultats ont montré que l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* induit une baisse significative de la viscosimétrie des sujets porteurs du trait drépanocytaire et des sujets drépanocytaires. Un effet similaire est observé avec le tampon seul mais dans une moindre mesure.

Ces résultats constituent un véritable espoir dans la recherche de molécules bioactives pour la prise en charge à moindre coût de la drépanocytose.

Cependant, il serait intéressant dans des travaux ultérieurs de procéder à l'étude de l'effet de l'extrait sur les déterminants de la viscosité sanguine à savoir l'hématocrite, la déformabilité et la viscosité plasmatique et enfin à des études pharmacodynamiques et cliniques dans le but de confirmer l'efficacité de l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa*.



RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Adams RJ, McKie VC, Hsu L et al. (1998)** : Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. *N Engl J Med* 1998 ; 33:5-11.
2. **Al-Wandawi H., Al-Shaikly K., Abdulrahman M.(1984)**Roselle seeds: a new protein source, *J.Agric. Food Chem.* 32 (1984) 510–512.
3. **Austin H, Key NS, Benson JM, Lally C, Dowling NF, Whitsett C, Hopper WC. 2007.** Sickle cell trait and the risk of venous thromboembolism among blacks. *Blood* 1; 110(3):908-12
4. **Austin H, Lally C, Benson JM, Whitsett C, Hopper Wc, Key NS, 2009**
5. **Ascroft MT, Desai P, Richardson SA, Serjeant (1976).**Growth, behavior and educational achievement of Jamaican children with sickle cell trait.
Br Med 5; 1(6022):1371-3
6. **Babalola S.O., Babalola A.O., Aworh O.C.(2001):**Compositional attributes of the calyces of roselle (*Hibiscus sabdariffa*).
J. Food Technol.Afr. 6 (4) (2001) 133–134.
7. **Bahemuka T.E., Mubofu E.B.(1999):** Heavy metals in edible green vegetables grown along the sites of the Sinza and Msimbazi rivers in Dar-Es-Salaam, *Tanzania, Food Chem.* 66 (1999) 63–66.

- 8. BAILLEUL-FORESTIER I., NAULIN-IFI C. (2001) :** Parodonte de l'enfant. *Encycl. Méd. Chir., Odontologie*, 2001 ;10 : 23-415.
- 9. BALEDENT F.(2000) :** Diagnostic biologique de la drépanocytose ;*Développement et santé* 2000 ;150 :1-5.
- 10.Ballas SK(2001):** Iron overload is a determinant of morbidity and mortality in adult patients with sickle cell disease. *Semin Hematol* 2001 ; 38 : 30-6.
- 11.BARRET T., CONNOR E.(1971):** Acute Pulmonary disease in sickle cell anemia. *Am. Rev. Respir Dis*, 1971 ;104: 159-165.
- 12.Bruneton J. (2009) :** Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales, 4^{ème} édition : Paris, lavoisier tech. P. 915.
- 13.Charache S, Terrin ML, Moore RD et al. (1995) :** Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. *N Engl J Med* 1995; 332 : 1317-22.
- 14.Chen H.H., Tsai P.J., Chen S.H., Su Y.M., Chung C.C., Huang T.C.(2005):** Grey relational analysis of dried roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *J. Food Process. Preserv.* 29 (2005) 228–245.
- 15.Chen S.H., Huang T.C., Ho C.T., Tsai P.J.(1998):** Extraction, analysis, and study on the volatiles in roselle tea. *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 1101–1105.

- 16. Cissé Moussa (2008) :** Caractérisation in-vitro des effets vasorelaxants d'extraits enrichis et fractionnés d'*hibiscus sabdariffa*. *Thèse d'exercice numéro33 UCAD*.
- 17. BEYEME - OWONO M. (2004):** Clinics in Mother and Child Health.
Vol I, N° 1 Janvier - Avril 2004
- 18. Connes P, Hue O, Tripette J, Hardy Dessources MD. (2008.):** Blood rheology abnormalities and vascular cell adhesion mechanism in sickle cell trait carriers during exercise. *Clin Hemorheol Microcirc. 39(1-4):179-84*.
- 19. Connes P, Reid H, Hardy-Dessources MD, Morisson E, Hue O. (2008):** Physiological responses of sickle cell trait carriers during exercise.
Sport Med 38: 931-946.
- 20. Connes P, Sara F, Hardy Dessources MD, Etienne-Julan M Hue O. (2005) :** Does higher red blood cell (RBC) lactate transporter activity explain impaired RBC deformability in sickle cell trait. *Jpn Physiol 55(6)385-7*
- 21. CRAWFORD J.M.(1988):** Periodontal disease in sickle cell disease subjects. *J Periodontol. 1988;59 (3):164-9*

- 22.Dafallah A.A., al-Mustafa Z.(1996) :** Investigation of the anti-inflammatory activity of *Acacia nilotica* and *Hibiscus sabdariffa*.
Am. J. Chin. Med. 24 (1) (1996) 263–269.
- 23.DIAGNE I., SOARES G.M.M., GUEYE A., DIAGNE-GUEYE ND.R., FALL L., NDIAYE O., CAMARA B., DIOUF S., FALL M. (2000) :** Infections chez l'enfant et l'adolescent drépanocytaires sénégalais: aspects épidémiologiques. *Dakar médical*, 2000 ;45(1):55-58
- 24.de Franceschi L, Bachir D, Galactéros F et al.(1997) :** Oral magnesium supplements reduce erythrocyte dehydration in patients with sickle cell disease. *J Clin Invest* 1997 ; 100 : 1847-52
- 25.Dickel M.L., Rates S.M.K., Ritter M.R.(2007):** Plants popularly used for loosing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil.
*J. Ethnopharmacol.*109 , 2007, 60–71.
- 26.D'Heureux–Calix F., Badrie N.(2004) :** Consumer acceptance and physicochemical quality of processed red sorrel/roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) sauces from enzymatic extracted calyces.
Food Serv. Technol. 4 (2004) 141– 148.
- 27.Du C.T., Francis F.J., (1973) :** Anthocyanins of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), (1973)*J. Food Sci.* 38 (1973) 810–812.

- 28. EDINGTON GM., LEHMANH H. (1955):** Expression of the sickle cell gene in Africa. *Ber. Med J.* 1955;18: 1308-1311.
- 29. El-Adawy T.A., Khalil A.H. (1994):** Characteristics of roselle seeds as a new source of protein and lipid, *J. Agric. Food Chem* 42 (1994) 1896– 1900
- 30. Expere JA (2001):** The OAU's Model Law. Organization of African Unity, STRC, Lagos Nigeria
- 31. Ferster A, Tahriri P, Vermynen C et al. (2001) :** Five years of experience with hydroxyurea in children and young adults with sickle cell disease. *Blood* 2001 ; 97 : 3628-32.
- 32. Ferster A, Vermynen C, Cornu G et al.(1996):** Hydroxyurea for treatment of severe sickle cell anemia : a pediatric clinical trial. *Blood* 1996 ; 88 : 1960-4.
- 33. Forsyth W.G.C.(1954):** Simmonds N.W., A survey of anthocyanins of some tropical plants, *Proc. R. Soc.* 142 (1954) 549–553.
- 34. Francis F.J.(1990).** Colour analysis, in: Nielsen N.N., Food Analysis, Aspen Publ., Gaithersburg, MD, USA, 1990, pp. 599–612.
- 35. Gaye A. K. (1986) :** Contribution à l'étude médico-sociale de la drépanocytose en milieu scolaire sénégalais.
Thèse Médecine, Dakar, 1986 ; n° 45

- 36. Gentilini M., Duflo B. (1986) :** Hemoglobinoses In : *Médecine tropicale ; 4^e édition, Flammarion Médecines Sciences, 1986 ; 460-483.*
- 37. Gladwin MT, Kato GJ.(2005):** Cardiopulmonary complications of sickle cell disease: role of nitric oxide and haemolytic anaemia.
Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2005;51–7.
- 38. Haider S., Naithani V., Barthawal J., Kakkar P. (2004):**
Heavy metal content in some therapeutically important medicinal plants,
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 72 (2004) 119–127.
- 39. Herrera-Arellano A., Flores-Romero S., Chavez-Sotoc M., Tortoriello J.(2004):** Effectiveness and tolerability of a standardized extract from *Hibiscus sabdariffa* in patients with mild to moderate hypertension: a controlled and randomized clinical trial, *Phytomed. 11 (2004) 375–382.*
- 40. Hirunpanich V., Utaipat A., Morales N.P., Bunyapraphatsara N., Sato H., Herunsale A., Suthisisang C.(2006):** Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats, *J. Ethnopharmacol. 103 (2006) 252–260.*
- 41. KALLESTAL C., MATSSON L (1989) :** Criteria for assessment of interproximal bone loss on bite-wing radiographs in adolescents.
J Clin Periodontol 1989;16:300-304.

- 42. Kerharo J., Adam J.G.(1974) :** La pharmacopée sénégalaise traditionnelle –
Plantes médicinales et toxiques, *Vigot Frères, Paris, France, 1974.*
- 43. KLAPISZ-WOLIKOW M., DOBIGNY C., DERSOT J . (1993):**
Evaluation clinique de la maturation parodontale: normalité et
pathologies.
J Parodontol 1993 ; 12 : 115-127.
- 44. Kohen J.L. (1992):** Downing A.J., Aboriginal use of plants on the western
Cumberland Plain Sydney Basin, *Naturalist* 1 (1992) 1–6.
- 45. Koshy M, Burd L, Wallace D, Moawad A, Baron J.(1988):**
Prophylactic red-cell transfusions in pregnant patients with sickle cell
disease.
N Engl J Med 1988 ; 319 : 1447-52.
- 46. Lemonne N, Connes P, Romana M, Vent-Smidt V, Bourhis V, Lamarra
Y, Etienne-Julan M. (2012) :** Increased blood viscosity and red blood cell
aggregation in a patient with sickle cell anemia and smoldering myeloma. *Am
J Hematol.* 2012 nov; 87 (11): E 129.
- 47. Léye M. M. et al :(2011)** Etude in vitro des propriétés vasoactives
d'un extrait de gousse d'*Allium sativum* (Liliaceae). *Thèse de doctorat d'état
en pharmacie, 2011, N°118, Faculté de Médecine, Pharmacie et
Odontostomatologie, UCAD.*

- 48. Lyons L. et Nambiar D. (2005) :** Un guide pratique des plantes médicinales pour les personnes vivants avec le VIH. *1^{ère} édition Catie 60p*
- 49. Maiga A., Diallo D., Bye R., Paulsen B.S.(2005):** Determination of some toxic and essential metal ions in medicinal and edible plants from Mali. *J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 2316–2321.*
- 50. Mariane de Montalembert (2002):** Options thérapeutiques dans la drépanocytose , *Hematologie 2002*
- 51. Mariane de Montalembert (2002) :** Traitement de la drépanocytose par l'hydroxyurée. *Hematologie 2002 ; 8 : 28-34.*
- 52. Mariane de Montalembert; M.Bachir D. (2003)** Traitement de la drépanocytose par l'hydroxyurée. In : Girot R, Bégué P, Galactéros F (eds). I « La drépanocytose ». Paris : John Libbey Eurotext, 2003.
- 53. Mazza G., Miniati E., (2000):** Anthocyanin in fruits, vegetables and grains. *CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2000.*
- 54. McClintock N.C., El Tahir I.M.(2004):** *Hibiscus sabdariffa* L., in: Grubben G.J.H., Denton, O.A. (Ed.), PROTA 2 (Plant Resources of Tropical Africa): vegetables [CD-Rom], PROTA, Wagening., Neth., 2004

55. MIGNONSIN D . (1993)

Physiopathologie cardiorespiratoire des drépanocytaires SS et SC non en crise. A propos de 99 cas.

56. Morton J.F., Roselle, in: Dowling C.F. (Ed). (1987): Fruits of warm climates, *Media, Inc., Greensborough, USA, 1987, pp. 281–286.*

57. Organisation Mondiale de la Santé. Sickle-cell anemia : Report. Mis en ligne le 24avril 2006 .

URL:http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA59/A59_9-en.pdf

58. Palé É., Kouda-Bonafos M. (2004) : Nacro M., Caractérisation et mesure des activités antiradicalaires d'anthocyanes de plantes du Burkina Faso, *C. R. Chimie* 7 (2004) 973–980.

59. Ray D, Deshmukh, Goswami K, Garg N. (2007): Antioxidant vitamin levels in sickle cell disorders. *Natl Med J. India* 20(1): 11-3

60. Redding-Lallinger R, Knoll C. (2006): Sickle cell disease-pathophysiology and treatment. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 2006;36:346–76.

61. Sakaly Léna(2008) : *Thèse numéro 21 2008 UCAD*

- 62.SARR B. et al (2011) :** *Etude in vitro des propriétés vasoactives d'un extrait d'Hibiscus sabdariffa (malvaceae) Thèse de doctorat d'état en pharmacie, 2011, N°118, Faculté de Médecine, Pharmacie et Odontostomatologie, UCAD*
- 63. Sarni-Manchad P., Cheynier V.(2006) :** Les polyphénols en agroalimentaire, Éd Tec & Doc., Coll. Sci. & Techn. Agroaliment., *Lavoisier, Paris, 2006, 398 p.*
- 64.Sauntharajah Y, Hillery CA, Lavelle D et al. (2003) :** Effects of 5-aza-2'-déoxycytidine on fetal hemoglobin levels, red cell adhesion, and hematopoietic differentiation in patients with sickle cell disease.
Blood 2003 ; 102 : 3865-70.
- 65.Schultz WH, Ware RE. (2003)** Malignancy in patients with sickle cell disease. *Am J Hematol 2003 ; 74 : 249-53.*
- 66.Steinberg MH, Barton F, Castro O et al. (2003):** Effects of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia.
JAMA 2003; 289 : 1645-51.
- 67. SteinbergMH (1999):** Management of sickle cell disease. *N Engl JMed 1999; 340 : 1021-30.*
- 68. Steinberg MH. (2006):** Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. *Trends Pharmacol Sci. 2006;27:204–10.*

- 69. Tripette J, Hardy-Dessources MD, Sara F, Montout-Hedreville M, Saint Martin C, Hue O, Connes P.(2007) :** Does repeated and heavy exercise impair blood rheology in carriers of sickle cell trait. *Clin J Sport Med* 17(16): 465-70
- 70. Tsai P.J., McIntosh J., Pearce P., Camden B., Jordan B.R.(2002):**
Anthocyanin and antioxidant capacity in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract,
Food Res. Int. 35 (2002) 351–356.
- 71. Tsai P.J., Ou A.S.M. (1996):** Colour degradation of dried roselle during storage, *Food Sci.* 23 (1996) 629–640
- 72. Tsai P.J.(1995):** Studies on the color deterioration of roselles during post harvest handling, drying and storage.
Natl. Chung Hsing Univ., Ph. D diss., Taiwan, 1995.
- 73. Vichinsky EP, Haberkern CM, Neumayr L et al.(1995):** A comparison of conservative and aggressive transfusion regimen in the perioperative management of sickle cell disease. *N Engl J Med* 1995 ; 333 : 206-13.
- 74. Wang C.J., Wang J.M., Lin W.L., Chu C.Y., Chou F.P., Tseng T.H.(2000):** Protective effect of *Hibiscus* anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats, *Food Chem. Toxicol.* 38 (2000) 411–416.
- 75. Wayne AS, Kevy SV, Nathan DG. (1993):** Transfusion management of sickle cell disease. *Blood* 1993 ; 81 : 1109-23.

- 76. Weiner DL, Hibberd PL, Betit P et al. (2003) :** Preliminary assessment of inhaled nitric oxide for acute vasoocclusive crisis in pediatric patients with sickle cell disease. *JAMA* 2003 ; 289 : 1136-42.
- 77. World Health Organization (2004):** Guidelines on clinical study of traditional medicines in WHO African Region. WHO Regional Office for Africa, Brazzaville (Document reference AFR/TRM/04.4).
- 78. www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/Drepanocytose-FRfrPub125v01.pdf / Mars 2011**
- 79. Wong P.K., Yusof S., Ghazali H.M., Che Man Y.B. (2002):** Physicochemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), *Nutr. Food Sci.* 32 (2002) 68–73.
- 80. www.togocity.com/IMG/pdf/DREPANOCYTOSE**