LISTE DES ABREVIATIONS

ABTS : 2,2'-azinobis (acide-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfononique)

Abs : Absorbance

ADN : Acide désoxyribonucléique

AVC : Accident vasculaire cérébral

ATP : adénosine triphosphate

CI_{50} : Concentration inhibitrice à 50%

CH_3OH : Méthanol

CLHP : Chromatographie en liquide haute performance

CSH : Cellules souches hématopoïétiques

CVO : Crises vaso-occlusives

DPPH : 1.1 diphenyl-2- picryl -hydrazyl

EDTA : Ethylen Diamin Tetracetic Acid

EGA : Equivalant d'acide gallique

EOA : Espèces oxygénées actives

Hb : Hémoglobine

HbA : Hémoglobine A

HbA2 : Hémoglobine A2

HbF : Hémoglobine fœtal F

HbS : Hémoglobine S

OMS : Organisation mondiale de la santé

ORAC : Oxygen Radical absorbance Capacity

PPT : Polyphénols totaux

PI : Pourcentage d'inhibition

SDM : Syndrome drépanocytaire majeur

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Répartition de l'HbS dans le monde 7
Figure 2: Structure de l'hémoglobine normale 8
Figure 3: Evolution de la synthèse des chaines de globine en fonction de l'âge . 9
Figure 4: Structure de l'hémoglobine S 10
Figure 5 : Drépanocytes sur frottis 12
Figure 6: Résultats test d'EMMEL 22
Figure 7: Résultats test d'Itano : Gauche (Témoin négatif) ; Droite (présence d'HbS) 23
Figure 8 : Isoélectrofocalisation en gel d'agarose (Isolab®) d'agar 24
Figure 9 : *Combretum glutinosum* Perr.ex DC 35
Figure 10 : Espace vente d'un tradipraticien 40
Figure 11 : Etape de la macération et filtration de l'extrait méthanolique 43
Figure 12 : Structure du DPPH avant et après réaction avec l'antioxydant (AH) 47
Figure 13 : Caractérisation des polyphénols présents dans les feuilles de *C. glutinosum* 52
Figure 14 : Caractérisation des tanins hydrolysables dans les feuilles de *C. glutinosum* 53
Figure 15 : Caractérisation des flavonoïdes dans les feuilles de *C. glutinosum* 54
Figure 16 : Mise en évidence des saponosides dans les feuilles de *C. glutinosum* 55
Figure 17 : Action de l'acide ascorbique et de l'extrait méthanolique des feuilles de *Combretum glutinosum* sur le radical DPPH 57
Figure 18 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique 58
Figure 19 : Evolution moyenne des drépanocytes en fonction du temps à la concentrations de 10 mg/ml 60

Figure 20 : Evolution moyenne des drépanocytes en fonction du temps à la concentration de 5mg/ml 61
Figure 21 : Evolution moyenne des drépanocytes en fonction du temps à la concentration de 0,5 mg /ml 62

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Principaux radicaux libres et leur formule chimique. 30
Tableau II : Caractéristiques des solvants utilisés 42
Tableau III : Rendements des différents extraits secs 51
Tableau IV : Pourcentage d'inhibition extrait méthanolique 56
Tableau V : Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique 57
Tableau VI : Tableau des différentes absorbances de l'acide gallique en fonction de la concentration 59
Tableau VII : Pourcentage de drépanocytes en fonction du temps à la concentration 10 mg / ml 60
Tableau VIII : Pourcentage de drépanocytes en fonction du temps à la concentration de 5 mg/ml 61
Tableau IX : Pourcentage de drépanocytes en fonction du temps à la concentration de 0,5 mg/ml 62

TABLE DES MATIERES

DEDICACES 14
A NOS MAITRES ET JUGES 22
INTRODUCTION 1
PREMIERE PARTIE 4
Chapitre I : Rappels sur la Drépanocytose 5
I-GENERALITES 5
I-1. Définition 5
I-2. Historique 5
I-3. Epidémiologie 6
II- PHYSIOPATHOLOGIE DE LA DREPANOCYTOSE 7
II-1. Rappels sur la structure de l'hémoglobine 7
II- 1-1- Hémoglobine normale 7
II- 1-2- Hémoglobine drépanocytaire ou hémoglobine sickle (HbS) 9
II-2. Physiopathologie : cycle falciformation/défalciformation 11
II- 2-1- Gel d'hémoglobine S 11
II-2-2- Déformation du globule rouge drépanocytaire 12
II- 2-3- Adhérence des globules rouges drépanocytaires à l'endothélium 13
III- MANIFESTATIONS CLINIQUES 14
III-1. Chez le sujet drépanocytaire de forme SS 14
III-1-1- Phases stationnaires 14
III-1-1-1- Signes cliniques 14
III-1-1-2- Signes biologiques 15
III-1-2- Crises vaso-occlusives 15
III-1-3- Complications aiguës 16
III-1-3-1- Anémie aiguë 17
III-1-3-2- Infections graves 17
III- 1-3-3- Syndrome thoracique aigu 18
III- 1-3-4- Priapisme 18
III-1-3-5- Accidents vasculaires cérébraux 19
III-1-4- Complications chroniques 19
III-1-4-1- Ulcères de jambes 19

III-1-4-2- Atteinte ostéoarticulaires chroniques : 20
III- 1-4-3- Atteintes oculaires 20
III-2. Chez le sujet drépanocytaire de forme AS 20
IV- DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE LA DREPANOCYTOSE 21
IV-1. Tests de dépistage 21
IV-1-1- Test d'Emmel ou test de falciformation 21
IV-1-2- Test d'Itano ou test de solubilité 22
IV-2. Tests de confirmation 23
IV-2-1- Electrophorèse de l'hémoglobine 23
IV-2-2- Isoéléctrofocalisation 23
IV-2-3- Chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) 24
V- TRAITEMENT DE LA DREPANOCYTOSE 24
V-1- Principes généraux du traitement« classique» 24
V-2- Traitements spécialisés 26
V-3- Recherche : quelques exemples 27
V-4 – Phytothérapie 28
Chapitre II : Méthode d'étude de l'activité antioxydante 30
I-1-Rappel sur le stress oxydatif et la toxicité des radicaux libres 30
I-2-Principe général d'étude de l'activité antioxydante 31
Chapitre III : étude botanique et chimique de *Combretum glutinosum* Perr.ex DC 33
I-1- Généralités sur *Combretum glutinosum* Perr.ex DC 33
I-2-Classification et appellations 33
I-3-Description botanique : 34
I-4-Répartition géographique 35
I-5- Chimie de la plante 36
I-6-Données pharmacologiques et toxicologiques 37
I-7- Utilisations en médecine traditionnelles 37
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE 39
I-1- Matériels 40
I-1-1- Matériel végétal 40
I-1-2- Matériels de laboratoires utilisés dans ce travail 41
I-1-3- Matériel chimique 41
I- 2- Méthodes 42

I-2-1- Broyage 42
I-2-2- Extraction 42
I-2-2-1- Solvants utilisées 42
I-2-2-2 Macération et filtration 43
I-2-3-1- Caractérisation des polyphénols 43
I-2-3-2- Caractérisation des tanins 44
I-2-3-3- Caractérisation des flavonoïdes 44
I-2-3-4- Caractérisation des saponosides 45
I-2-4- Préparation des solutions extraits 45
I-2-4-1- Préparation de la solution tampon phosphate à pH 7,4 45
I-2-3-2- Préparation des dilutions 46
I-2-4- Evaluation de l'activité anti-oxydante 47
I-2-4-1 Protocole opératoire de la méthode au DPPH 48
I-2-5- Collecte de sang 49
I-2-6- Protocole du test au laboratoire 49
I-2-7- Dosage des composés polyphénolyques totaux (PPT) 50
La teneur en phénols totaux des feuilles *Combretum glutinosum* a été déterminéepar la méthode Folin Ciocalteu. 50
II-1- Résultats 51
II-1-1- Calcul des rendements 51
II- 1- 2 Screening phytochimique 51
II-1-2-1- Caractérisation des polyphénols 52
II-1-2-2- Caractérisation des tanins : 52
II-1-2-3- Caractérisation des flavonoïdes: 54
II-1-2-4- Caractérisation des saponosides : 55
II-1-3- Résultats de l'activité anti-oxydante de l'extrait méthanolique des feuilles de *combretum glutinosum* 56
II-1-4- Résultats dosage des composés phénoliques totaux 58
II-1-5- Résultats des tests biologiques 60
CONCLUSION 63
REFERENCES 63

INTRODUCTION

La drépanocytose ou « sickle cell anemia », est une maladie génétique de l'hémoglobine (Hb) à transmission autosomique récessive. Elle est due à une mutation qui entraine le remplacement de l'acide glutamique par la valine en position 6 de la chaine β-globine de l'hémoglobine.L'hémoglobine mutante qui en résulte est appelée l'hémoglobine S (HbS) **[Claster,** 2003**]**.Cette maladie a été observée pour la première fois en 1904, lorsqu'Herrick James a mis en évidence l'anomalie morphologique érythrocytaire de la drépanocytose, chez un étudiant souffrant d'une anémie **[James,**1949 **;Ingram,**1956**]**.

La drépanocytose est un problème majeur de santé publique, elle est répandue au monde surtout en Afrique sub-saharienne **[Beyeme,** 2004**].** Chaque année, environ 500 000 enfants drépanocytaires naissent, dont 200 000 en Afrique, la moitié des enfants meurent avant l'âge de 5 ans, le taux de prévalence du trait drépanocytaire est de 10% au Sénégal **[Romayssae ,** 2015**].**

L'expression clinique de la drépanocytose chez un patient, se manifeste par des crises douloureuses, une anémie et une atteinte de divers organes.

Les traitements actuels modernes, curatifs et symptomatiques, ont permis d'augmenter considérablement l'espérance de vie des drépanocytaires, or leur coût élevé est un luxe inaccessible au grand public dont les revenus sont souvent bas.

La pathogenèse de la drépanocytose est liée à la polymérisation de la désoxy-HbS. Cette formation de polymère modifie la forme normale de disque biconcave du globule rouge en une forme irrégulière, instable et rigide [**Stuart**, 2004].Ce qui provoque une hémolyse intravasculaire avec libération de l'hémoglobine dans le plasma **[Belcher,** 2010**]**. Cette polymérisation à répétition a un caractère cyclique et peut conduire à l'adhésion des globules rouges avec l'endothélium vasculaire, à la vaso-occlusion et à des lésions ischémiques de perfusion.

Ces manifestations peuvent modifier les niveaux de production des espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) et des antioxydants.

Pour se protéger contre l'effet toxique des ROS, l'organisme a développé des systèmes de défense qui permettent de réguler la production de radicaux libres. Ces systèmes sont composés d'antioxydants non enzymatiques (vitamines A,C,E), des oligo-éléments (sélénium, cuivre, zinc…), et d'antioxydants enzymatiques (glutathion, catalase…)[**Sy**, 2004].

Connaissant le rôle important de ces antioxydants dans la prise en charge de la drépanocytose notre laboratoire d'accueil s'est inscrit dans la dynamique de contribution à l'évaluation des propriétés antioxydantes des plantes de la pharmacopée sénégalaise

Ainsi, l'objectif de notre travail est donc de mettre en évidence l'activité anti-falcémiante des extraits méthanolique et d'acétate d'éthyle des feuilles de *Combretum glutinosum* mais également d'évaluer l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de ces feuilles puisque le lien entre stress oxydatif et drépanocytose a été mis en évidence.

Dans la première partie, nous allons étudier d'abord : la drépanocytose dans ses aspects historique, physiopathologique, clinique et thérapeutique. Ensuite nous allons parler de l'étude de l'activité antioxydante et enfin nous allons voir l'étude botaniquede *Combretum glutinosum.*

La deuxième partie de ce travail comportera la méthodologie d'étude, les résultats, la discussion et la conclusion

PREMIERE PARTIE

Chapitre I : Rappels sur la Drépanocytose

I-GENERALITES

I-1. Définition

La drépanocytose (encore appelée « sickle cell anemia », c'est-à-direanémie à hématies falciformes) est une maladie génétique héréditaire, detransmission autosomique récessive. Les gènes mutants doivent être hérités à lafois du père et de la mère. Cette pathologie est due à une anomalie de l'hémoglobine et caractériséepar des hématies en forme de faucille [**GIROT,** 2003].

La drépanocytose associe quatre grandes catégories de manifestations cliniques [**GIROT,** 2003]

- Une anémie hémolytique chronique
- Des phénomènes vaso-occlusifs
- Une susceptibilité extrême aux infections
- La douleur

I-2. Historique

Il y'a plus de cent ans déjà que la drépanocytose a été découverte et les recherches se poursuivent toujours pour de meilleures conditions de vie des malades.

En 1910 le Dr James Herrick, médecin cardiologue à Chicago, décrit dans une de ses publications un syndrome chez un patient noir originaire de la Grenade. Ce syndrome se caractérisait par une anémie sévère associée à une forme particulière d'érythrocytes évoquant celle d'une faucille.[**HERRICK,** 1910]

En 1917, le Dr Victor Emmel démontre *in vitro* la déformation érythrocytaire en absence d'oxygène. C'est avec lui que les notions de falciformation et défalciformation voient le jour ainsi que la notion de test diagnostic (test d'Emmel).

Il démontre également l'importance de la réversibilité du cycle et souligne le rôle prépondérant de ce mécanisme dans la maladie [**EMMEL,** 1917].

C'est à partir de 1950 que les connaissances sur la drépanocytose deviennent de plus en plus concrètes avec une intensification de la recherche corrélée aux innovations scientifiques :

-Linus Pauling et Harvey Itano (1949) montrent par des techniques séparatives que l'hémoglobine des patients drépanocytaires est différente de celle des hématies normales [**PAULING,** 1949] : la drépanocytose est historiquement la première maladie moléculaire scientifiquement démontrée.

- James Neel, médecin généticien démontre que la transmission de la maladie suit une loi mendélienne [**NEEL,** 1949]

-En 1956 Vernon Ingram et John Hunt démontrent que la maladie est due à un remplacement d'un acide aminé dans la structure de l'hémoglobine. [**GLADWIN,** 2008]

- En 1980, Robert Hebbel est le premier à observer l'adhérence vasculaire des cellules falciformes: c'est le début de la connaissance de la physiopathologie drépanocytaire [**HEBBEL,** 1980].

I-3. Epidémiologie

Des gènes à l'origine d'hémoglobinopathies sont retrouvés chez environ 5% de la population mondiale et en 2006, plus de 300 000 enfants présentant une forme grave d'hémoglobinopathie (en majorité dans les pays à revenu faible) sont nés. La drépanocytose est particulièrement fréquente chez les personnes originaires d'Afrique subsaharienne et peu fréquente dans des zones comme l'Inde, l'Arabie Saoudite et les pays méditerranéens. Dans certaines parties d'Afrique subsaharienne, la drépanocytose touche jusqu'à 2% des nouveaux nés. Plus largement, la prévalence du trait drépanocytaire atteint 10 à 40% de la population en Afrique équatoriale alors qu'elle n'atteint que 1à2% de la population d'Afrique du Nord [**OMS,** 2006]

Le trait drépanocytaire est très présent en Afrique surtout entre le 15ème parallèle nord et le 20ème parallèle sud (individus exposés de façon répétitive au paludisme) car il confère une protection vis-à-vis de *Plasmodium falciparum*, notamment au cours de la petite enfance, favorisant la survie de l'individu et donc la transmission du gène anormal. L'HbS ne modifie pas la sensibilité au plasmodium mais elle atténue l'expression et la gravité de l'accès palustre [**CELINE C.,** 2009].

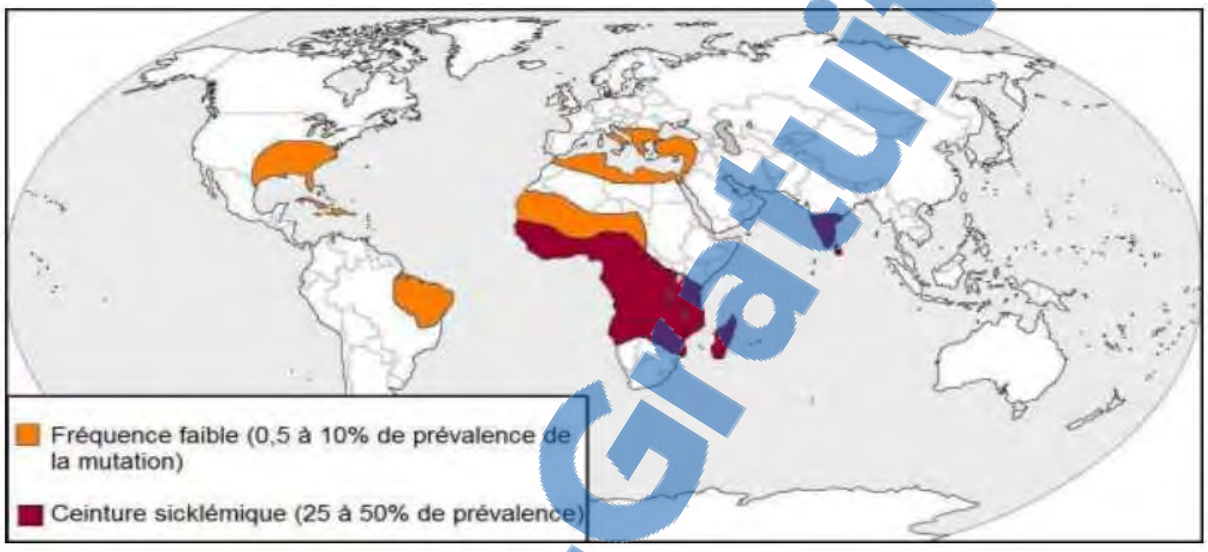


Figure 1: Répartition de l'HbS dans le monde [**KECLARD**, 2004]

II- PHYSIOPATHOLOGIE DE LA DREPANOCYTOSE

La compréhension scientifique de la drépanocytose passe par un regard sur l'hémoglobine et les modifications que la pathologie génétique entraine sur cette dernière.

II-1. Rappels sur la structure de l'hémoglobine

II- 1-1- Hémoglobine normale

L'hémoglobine normale est une chromoprotéine porphyrique de coloration rouge renfermant du fer. Contenue dans le globule rouge circulant, elle est le transporteur de l'oxygène, de l'air vers les tissus ce qui permet une bonne

Rapport-Gratuit.com

oxygénation de ces derniers. Chaque molécule d'hémoglobine est formée de quatre sous-unités identiques deux à deux et chaque sous-unité est formée d'un noyau l'hème et d'une globine. L'ensemble de la structure est stabilisée grâce à des liaisons de faible énergie établies entre les différentes structures.

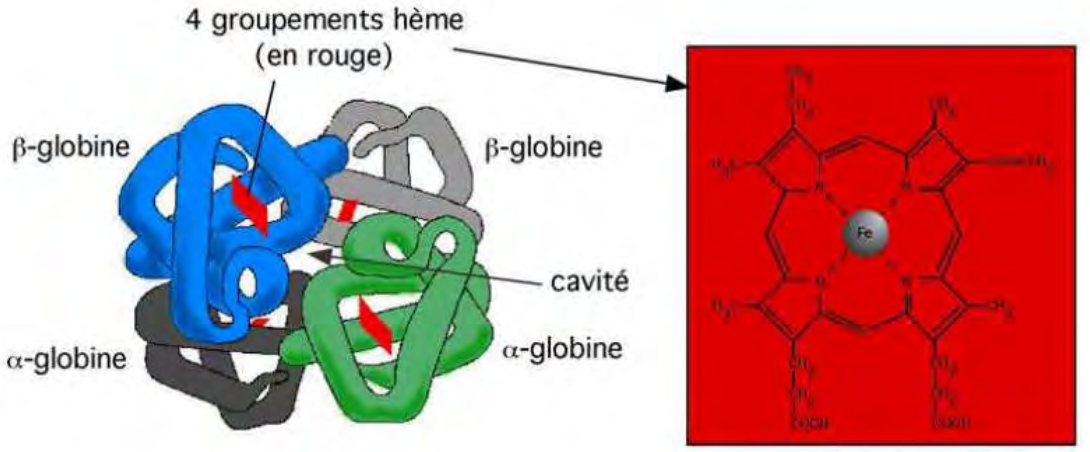


Figure 2: Structure de l'hémoglobine normale**[RUSSEL**, 1996**]**

L'hème, qui contient un atome de fer, permet la fixation de l'oxygène. La globine se compose de quatre types de chaines polypeptidiques - α, β, γ et δ- qui se différencient parleur séquence en acides aminés.

Ces différentes globines sont associées chacune à un noyau hème pour former des sous-unités α et non α (β, γ et δ) qui vont s'associer deux par deux pour former des dimères composés d'une sous-unité α et d'une sous-unité non α (dimère αβ, αδou αγ).

Deux dimères identiques permettent alors de composer 3 types de tétramères appelés hémoglobine :

Ainsi on retrouve :

- L'hémoglobine A (HbA) : α2β2 : majoritaire (> 95%) chez l'adulte
- L'hémoglobine A2 (HbA2): α2δ2 (2-3% chez l'adulte)
- L'hémoglobine F (HbF) : α2γ2 : minoritaire chez l'adulte mais majoritaire chez le fœtus et le nouveau-né[**STRYER,** 2003].

Chaque hémoglobine est ainsi définie par la nature protéique des sous-unités qui la composent.

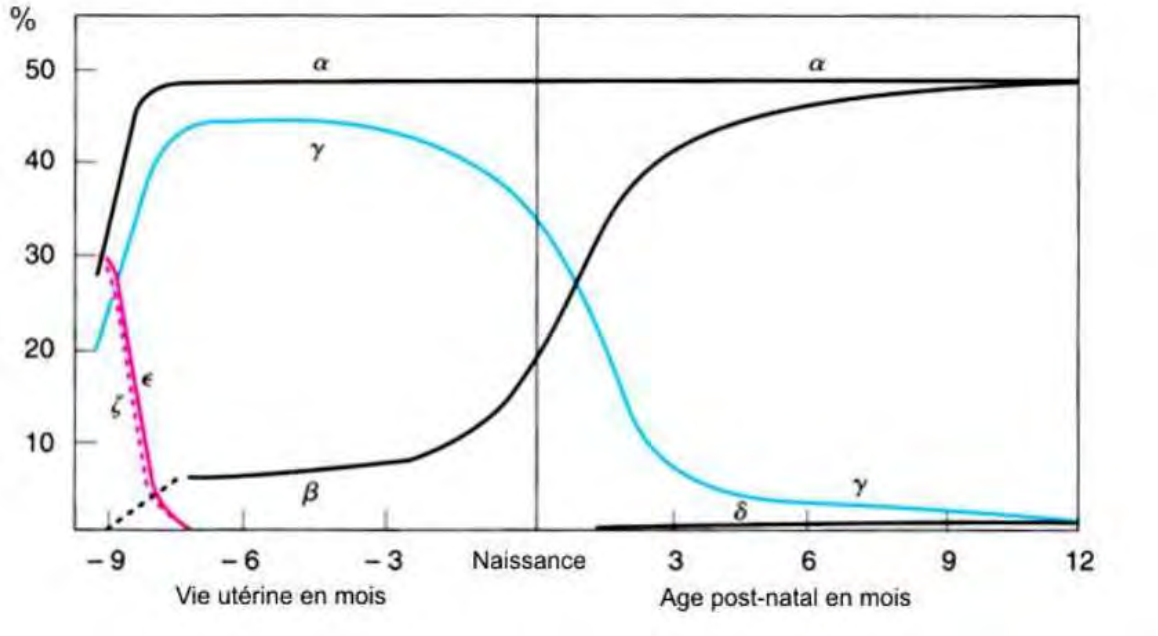


Figure 3: Evolution de la synthèse des chaines de globine en fonction de l'âge

L'hémoglobine F présente la capacité de fixation la plus importante à l'oxygène [**STRYER,** 2003]

Dans la drépanocytose, seule la globine est modifiée, l'hème conserve ses Propriétés, mais différentes formes d'Hb vont être retrouvées chez ces patients.

II- 1-2- Hémoglobine drépanocytaire ou hémoglobine sickle (HbS)

L'hémoglobine S est formée comme l'HbA de 2 sous-unités α et β. Elle résulte d'une mutation au niveau du 6^{ieme}codon de l'exon ''I''du gène β-globine. Ce gèneest situé sur le chromosome 11.

Dans cette mutation, le remplacement de l'acide glutamique par une valine (β6Glu Val) au sein de la globine β induit un défaut qualitatif d'HbS.

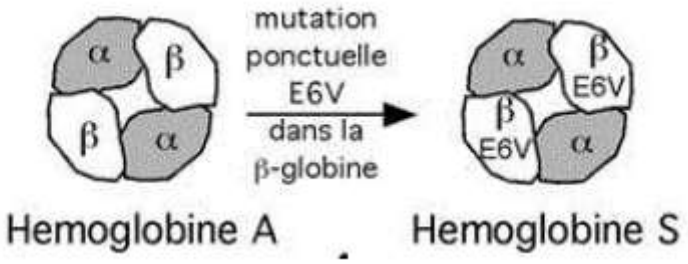
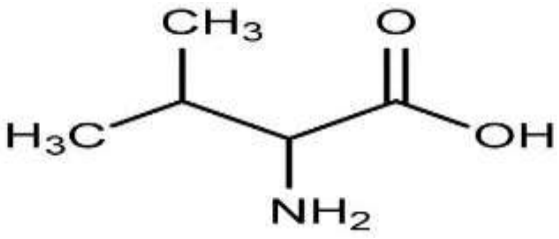
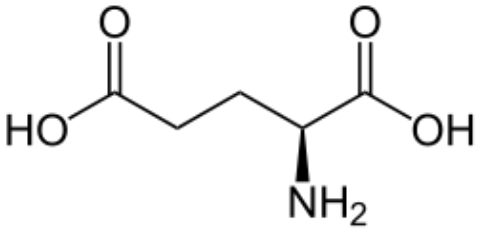


Figure 4: Structure de l'hémoglobine S



Valine



Acide glutamique

L'hémoglobine S se caractérise par une solubilité de la forme oxygénée identique à l'HbA normale. En revanche, la forme désoxygénée de l'HbS est moins stable que celle de l'HbA avec une diminution de sa solubilité dans l'hématie. Lors des analyses, cette modification de structure est responsable de la migration caractéristique de l'HbS en gel d'agar [**BASSET,** 1978]. En clinique, elle est responsable de la falciformation des hématies et ainsi des signes cliniques qu'on observe chez le patient drépanocytaire notamment la vaso-occlusion.

Concernant cette mutation, un individu peut être :

- hétérozygote (porteur sain; individu AS) lorsqu'un seul des gènes β de la globine est muté sur la paire de chromosomes.
- ou homozygote (malade; individu SS) lorsque les deux gènes sont mutés.

La double mutation est donc la forme SS et représente la cause principale des syndromes drépanocytaires majeurs (SDM).

Les caractéristiques hématologiques du sang périphérique des patients drépanocytaires hétérozygotes sont identiques à celle du sang normal.

La morphologie des hématies est normale et il n'y a pas de drépanocytes en circulation.

Cependant l'électrophorèse de l'hémoglobine montre une fraction majeure d'HbA de 60 à 55 %, une fraction importante d'HbS de 40 à 45 % et enfin une fraction mineure d'Hb A2 de 2 à 3 %.

La drépanocytose homozygote est caractérisée quant à elle par un taux d'hémoglobine situé entre 7 et 9 g/dl. L'électrophorèse de l'hémoglobine du sujet homozygote ou la chromatographie liquide haute performancepermettent de mettre évidence la présence d'HbS, d'HbF, d'HbA2 et l'absence totale d'HbA.

Le nouveau-né normal et le nouveau-né drépanocytaire présentent le même pourcentage d'HbF.Vers 5 à 6 mois, chez le nouveau-né normal comme chez le nouveau-nédrépanocytaire, on a une diminution progressive de l'HbF. Cette diminution chez le nouveau-né drépanocytaire correspond à la période d'apparition des premiers signes cliniques. L'HbF a le pouvoir d'inhiber la polymérisation de l'HbS. Ceci explique que les nourrissons soient asymptomatiques, en principe dans les premiers mois de vie puis symptomatique après ses 5 à 6 mois de vie : l'HbF est un facteur protecteur de la falciformation. Le but recherché avec les traitements par l'hydroxyurée est la production de l'HbF [**ALLOGO,** 2012].

II-2. Physiopathologie : cycle falciformation/défalciformation

II- 2-1- Gel d'hémoglobine S

La physiopathologie de la drépanocytose résulte du remplacement de l'acide glutamique par une valine en position 6 de la β globine. Cette mutation a pour conséquence une modification des propriétés structurales de l'hémoglobine dans sa forme désoxygénée [**Labie,** 2003].

Normalement, les molécules d'hémoglobine sont présentes sous forme d'unités isoléesdans les GR, qu'il y ait ou non de l'oxygène lié.

Elles n'ont pas d'affinité entre elles. Dans la drépanocytose, on aura une diminution de la solubilité de l'hémoglobine avec une tendance à la polymérisation de sa forme désoxygénée. Cette polymérisation est un phénomène coopératif qui donne naissance à des structures très organisées constituées de molécules de désoxyhémoglobine S formant un **gel d'hémoglobine S** [**Eaton,** 1987].

Cette gélation est favorisée par l'augmentation de la température, la déshydratation, mais elle est inhibée par l'HbF. En effet l'HbF ne peut pas former de copolymères avec l'HbS d'où une latence de cette gélation, la polymérisation de l'HbS est proportionnelle à la concentration en HbF. Ce gel d'HbS est responsable de la falciformation des hématies et par conséquent de l'augmentation de la viscosité sanguine chez les patients drépanocytaires dont l'une des conséquences est l'augmentation du risque de crises vaso-occlusives.

II-2-2- Déformation du globule rouge drépanocytaire

La polymérisation intracellulaire de l'HbS conduit à la formation de longues fibres allongées. Ces fibres modifient la forme du globule rouge qui prend un aspect en forme de faux : le drépanocyte.

Figure 5: Drépanocytes sur frottis [**Soubeiga**, 2013]

Cette formation de drépanocytes est encore appelée la falciformation. Le cycle de falciformation et défalciformation est réversible pendant plusieurs cycles jusqu'à la fixation définitive de la cellule sous sa forme drépanocytaire avec une perte complète de sa déformabilité et de sa flexibilité. La perte des caractéristiques de déformabilité et de flexibilité du globule rougedrépanocytaire sont responsables en partie de l'hyperviscosité du sang drépanocytaire. Cette hyperviscosité est accentuée par des phénomènes annexes qui concourent au ralentissement du flux sanguin dans la microcirculation.

II- 2-3- Adhérence des globules rouges drépanocytaires à l'endothélium vasculaire

L'adhérence des cellules drépanocytaires à l'endothélium a d'abord été démontrée *in vitro* dans un système de culture de cellules endothéliales provenant de veines ombilicales et aortiques de bœuf [**Carton,** 2008].

C'est un phénomène dépendant des caractéristiques du flux sanguin. Dans un flux laminaire, l'adhérence cellulaire est très faible voire inexistante dans certaines conditions. Par contre dans les zones de flux turbulents, on a une augmentation significative de l'adhérence cellulaire. Ces zones sont essentiellement dans les vaisseaux de faible diamètre. Ce qui explique la localisation fréquente de douleurs drépanocytaires dans les extrémités des doigts et des pieds. Ces zones turbulentes sont majorées lors du port de vêtements serrés avec une majoration du risque de crises douloureuses. L'adhésion des drépanocytes à l'endothélium vasculaire provoque un ralentissement du flux circulatoire ce qui induit une vaso-occlusion [**Allogo,** 2012].

III- MANIFESTATIONS CLINIQUES

Bien que la drépanocytose résulte d'une anomalie du globule rouge, elle est essentiellement un trouble multi systémique, ce qui affecte presque tous les systèmes d'organes du corps. Les conséquences cliniques peuvent être divisés en 4 groupes: l'hémolyse et les complications hématologiques, les crises vaso-occlusives, une infection et un dysfonctionnement des organes[**Makani,**2013]

III-1. Chez le sujet drépanocytaire de forme SS

Les signes cliniques de la maladie font leur apparition après les premiers mois de vie, quand l'hémoglobine drépanocytaire a progressivement remplacé l'hémoglobine fœtale. Des révélations cliniques plus tardives, à l'âge de 2-4 ans, ne sont pas exceptionnelles [**BALEDENT,** 2006]. La symptomatologie clinique de la drépanocytose homozygote comporte quatre types de situations :

- les phases stationnaires ;
- les crises vaso-occlusives ;
- les complications aiguës dont la fréquence diminue avec l'âge sans pour autant disparaître chez l'adolescent et l'adulte ;
- les complications chroniques.

III-1-1- Phases stationnaires

III-1-1-1- Signes cliniques

La triade pâleur, ictère, splénomégalie modérée, est la règle avant l'âge de 5 ans chez les enfants drépanocytaires homozygotes. L'anémie est constante (muqueuses et téguments pâles). La pâleur inhabituelle des conjonctives et les modifications du comportement sont des éléments à connaitre pour le dépistage précoce de l'aggravation de l'anémie. L'ictère conjonctival est variable dans le temps et d'un cas à l'autre [**Benkerrou,** 2003].

La splénomégalie est constatée dès les premiers mois de vie en même temps que s'installe l'anémie et l'ictère. Cette splénomégalie persiste quelques années pour disparaître spontanément [**Girot,** 2003].
Le développement pubertaire se fait souvent de façon satisfaisante, bien qu'avec un certain retard par rapport à la population non drépanocytaire.

III-1-1-2- Signes biologiques

La drépanocytose homozygote est caractérisée par un taux d'hémoglobine situé entre 7 et 9 g/dl, une réticulocytose entre 200 et 600 000/mm^3, un volume globulaire moyen normal. On note également la présence constante sur le frottis sanguin de drépanocytes, une hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles pouvant atteindre 30 000/mm^3 sans infection et une tendance à la thrombocytose. L'électrophorèse de l'hémoglobine met en évidence la présence d'hémoglobines S, F et A2; il n'y a pas d'hémoglobine A [**Male,** 2012].

III-1-2- Crises vaso-occlusives

Les crises « vaso-occlusives », qui sont dues à la « mauvaise » irrigation en sang de certains organes, se manifestent par des douleurs vives et brutales dans certaines parties du corps et peuvent, à la longue, entraîner la destruction de certains organes ou parties d'organes (c'est ce qu'on appelle la nécrose). Ces douleurs sont les manifestations les plus fréquentes de la maladie : elles peuvent être soudaines (ou aiguës) et transitoires (c'est-à-dire durer quelques heures ou quelques jours) ou chroniques (c'est-à-dire durer plusieurs semaines). Il arrive aussi que les deux types de crises coexistent chez un même individu (douleur chronique à laquelle s'ajoutent des crises brutales). Elles sont favorisées par la déshydratation, c'est pourquoi il est recommandé de boire beaucoup d'eau, mais elles sont aussi favorisées par le froid, l'altitude, le stress, les efforts excessifs, les infections ...

Toutes les parties du corps peuvent être concernées, mais certains organes sont plus sujets que d'autres aux crises vaso-occlusives : les os, les pieds et les mains, les poumons, le cerveau. Les crises se manifestent différemment selon le ou les organe(s) atteint(s).

Il peut s'agir de douleurs abdominales, fréquentes chez l'enfant et plus rarement chez l'adulte [**Orphanet,** 2011].

La douleur revêt un caractère différent chez l'enfant et l'adulte :

- Chez le jeune enfant elle atteint fréquemment les extrémités (mains et pieds) et est très souvent accompagnée de fièvre (sans qu'il y ait une infection sous-jacente). C'est souvent la première manifestation de la crise drépanocytaire.
- Chez le grand enfant et l'adulte, la crise est principalement osseuse et ostéo-articulaire, moins souvent thoracique et abdominale et rarement musculaire. Elle peut être accompagnée de fièvre, nausées, vomissements, constipation ... [**Céline. C,** 2009].

FACTEURS DECLENCHANTS

- Hypoxémie
- Acidose
- Déshydratation
- Infections
- Toxiques et produits de contrôles
- Fièvre, changement brutaux de température corporelle [**Karlin,**2009].

III-1-3- Complications aiguës

La fréquence est très variable selon les patients. Plus cette fréquence est élevée, plus le risque de mort prématurée est grand [**Platt,** 1991]. Même les patients peu symptomatiques ne sont pas à l'abri de la survenue d'une complication grave. Les principales complications aiguës sont : l'anémie aigue, les infections graves et les accidents vaso-occlusifs graves (syndrome thoracique aigu, priapisme, accident vasculaire cérébral).

III-1-3-1- Anémie aiguë

La valeur de la concentration en hémoglobine en phase stationnaire est stable et différente d'un patient à l'autre [**Ballas,** 2006]. Elle représente un paramètre important. Elle est généralement comprise entre 7g/dl et 9g/dl, avec une réticulocytose élevée (souvent > 500 000/mm3). Cependant, l'anémie peut s'aggraver dans certaines circonstances, notamment infectieuses, et demander une correction.

Les crises de séquestration splénique sont bien particulières aux petits enfants de moins de 4 ans, et intéresse surtout les patients ayant à l'état basal une concentration élevée en hémoglobine [**Wajcman,** 2004].

Les crises d'érythroblastopénie peuvent survenir dans la drépanocytose comme au cours de toute anémie hémolytique chronique congénitale ou acquise ; ces accidents d'érythroblastopénie sont souvent imputables au Parvovirus B 19 [**Girot,** 2003].

III-1-3-2- Infections graves

Les infections sont responsables d'une part importante de la mortalité et de la morbidité de la drépanocytose. La plus forte incidence des infections est observée chez les petits enfants dans les premières années de la vie. La fréquence des accidents infectieux diminue avec l'âge, mais leur risque persiste toute la vie.

L'altération de la fonction splénique liée à la survenue répétée d'infarctus est à l'origine de la susceptibilité aux infections constatée dans la drépanocytose. Les méningites et les septicémies sont les infections les plus graves car elles peuvent mettre en jeu le pronostic vital et laisser des séquelles. Les ostéomyélites sont des complications infectieuses courantes dans la drépanocytose par infection secondaire de régions osseuses infarcies.L'ostéomyélite est localisée surtout au niveau des os longs, souvent multifocales, pouvant évoluer vers la chronicité.

En ce qui concerne le paludisme, il a été montré que la drépanocytose conférait une protection relative mais non absolue à l'égard des formes pernicieuses de cette parasitose. Cependant il ne doit pas y avoir d'ambiguïté sur le fait que le risque d'infection par ce parasite lié à l'aggravation de l'hémolyse chez les homozygotes reste élevé, et que la prophylaxie est indispensable dans les zones à risque [**Lionnet,**2009].

III- 1-3-3- Syndrome thoracique aigu

Le syndrome thoracique est le 2ème motif d'hospitalisation. Il s'agit d'une pathologie potentiellement grave dont la mortalité approche 5 % dans certaines séries et qui représente près de 25 % des causes de décès chez l'adulte.

Il est caractérisé par la survenue d'une douleur thoracique associée à une symptomatologie pulmonaire (dyspnée, toux, expectoration) et une fièvre. Il existe un foyer pulmonaire clinique ou radiologique, associé dans 50 %des cas à un épanchement pleural. Le syndrome thoracique est accompagné d'une crise vaso-occlusive osseuse dans plus de 80 % des cas chez l'adulte, alors qu'il est souvent isolé chez l'enfant.Il existe une hyperleucocytose même en l'absence d'infection. Les gaz du sang artériel révèlent une hypoxémie, associée à une hypercapnie témoignant d'une hypoventilation alvéolaire, dans presque 50 % des cas. Les prélèvements bactériologiques sont le plus souvent négatifs, car le syndrome thoracique est rarement d'origine infectieuse chez l'adulte.La physiopathologie est en effet complexe et non univoque [**Anoosha ,** 2004].

III- 1-3-4- Priapisme

Le priapisme est défini par une érection prolongée, souvent douloureuse, survenant indépendamment de toute stimulation. Une prise en charge urgente est indispensable afin de réduire le risque de séquelles fonctionnelles graves [**Gbadoé,** 2007]. Dans la majorité des cas, il est dû à un mécanisme vaso-occlusif dans le corps caverneux.

Il en résulte un blocage du drainage veineux, une stase, une ischémie, une anoxie à l'origine de la douleur, pouvant évoluer, en l'absence detraitement, vers une nécrose du muscle lisse puis une fibrose et une impuissance définitive [**Fowler,** 1991].

III-1-3-5- Accidents vasculaires cérébraux

Les accidents vasculaires cérébraux surviennent principalement dans l'enfance et concernent 10 % des patients drépanocytaires homozygotes. La vasculopathie cérébrale chez les adultes drépanocytaires a été peu étudiée et la plupart des données actuellement utilisées sont retranscrites d'études faites chez les enfants. Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont de type ischémique dans la majorité des cas surtout chez les enfants, les accidents hémorragiques survenant essentiellement chez les adultes. Le risque de récidive après un premier AVC est élevé, estimé à 67%, survenant dans les 2-3ans après le premier épisode [**Ohene-Frempong,** 1998].

III-1-4- Complications chroniques

Sous ce terme, on regroupe les complications de la drépanocytose d'expression non aiguë, liées aux atteintes organiques provoquées par cette maladie, essentiellement du fait de la vasculopathie. Ces complications représentent une spécificité de la drépanocytose à l'âge adulte.

III-1-4-1- Ulcères de jambes

Les ulcères concernent 30 à 50% des malades drépanocytaires. Ils sont rarement cause de mortalité mais contribuent très largement à la morbidité de la drépanocytose. Les ulcères se situent le plus souvent au tiers inférieur des jambes, au niveau des malléoles internes et externes et en regard du tendon d'Achille, ils sont souvent bilatéraux.

Il est intéressant de noter qu'il n'a jamais été rapporté de transformations carcinomateuses d'ulcères chroniques au cours de la drépanocytose [**Lionnet,** 2009].

III-1-4-2- Atteinte ostéoarticulaires chroniques :

La complication la plus fréquente chez l'adulte reste la nécrose épiphysaire. Les hanches et les épaules sont les principales articulations atteintes par les nécroses osseuses dans la drépanocytose. Les nécroses de l'épaule sont généralement soumises à un traitement par kinésithérapie [**Hernigou,** 2003]. Quant à la nécrose de la hanche, au début elle est insidieuse, progressive et le plus souvent peu douloureuse.

III- 1-4-3- Atteintes oculaires

La drépanocytose est l'hémoglobinopathie qui donne les atteintes rétiniennes les plus fréquentes et les plus graves. Les complications oculaires les plus habituelles sont les rétinopathies prolifératives responsables de malvoyance, voire de cécité lorsque le suivi et la prise en charge ne sont pas rigoureux [**Pelosse,** 2003 ; **Tshilolo,** 2006]

III-2. Chez le sujet drépanocytaire de forme AS

- Sur le plan clinique :

En principe, elle est pratiquement asymptomatique. On observe que derares thromboses lors d'hypo-oxygénation profonde (anesthésie, voyage en avion non pressurisé).Elles peuvent se révéler par une hématurie ou un infarctussplénique. Lorsqu'il existe une anémie franche, même si elle est hémolytique, il faut rechercher systématiquement une autre cause. L'espérance de vie ne diffère pas de celle des sujets AA [**Bernard,** 1998].

- Sur le plan biologique :

Les caractéristiques hématimétriques du sang périphérique des patients drépanocytaires hétérozygotes sont identiques à celle du sang normal. Tant en ce qui concerne la lignée érythrocytaire que les lignées leucocytaire et plaquettaire. La morphologie des hématies est normale et il n'y a pas de drépanocytes en circulation. Cependant, lorsque les hématies sont incubées dans un milieu privé d'oxygène (test d'Emmel), le phénomène de falciformation se manifeste et fait apparaître des drépanocytes.

Une microcytose constatée chez un drépanocytaire hétérozygote doit faire penser à une carence martiale ; une macrocytose doit suggérer une carence vitaminique, notamment en acide folique ou en vitamine B12.L'électrophorèse de l'hémoglobine montre une fraction majeure d'hémoglobine A de 55 à 60%, une fraction importante d'hémoglobine S de 40 à 45% et enfinunconstituant mineur d'hémoglobine A2de 2 à 3%. Cet état doit être différencié du sujet drépanocytaire homozygote transfusé ; dans cette situation, l'hémoglobine A du donneur disparaît du tracé électrophorétique dans les semaines qui suivent la transfusion[**Hazoumé,** 1984].

IV- DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE LA DREPANOCYTOSE

IV-1. Tests de dépistage

Il existe deux types de tests de dépistage dont la positivité évoque la présence de l'hémoglobine anormale S.

IV-1-1- Test d'Emmel ou test de falciformation

Mis en évidence en 1917, ce test permet de mettre en évidence *in vitro* la falciformation des hématies en hypoxie, témoins de la présence de l'hémoglobine S. On utilise le métabisulfite de sodium à 2% pour provoquer l'hypoxie.

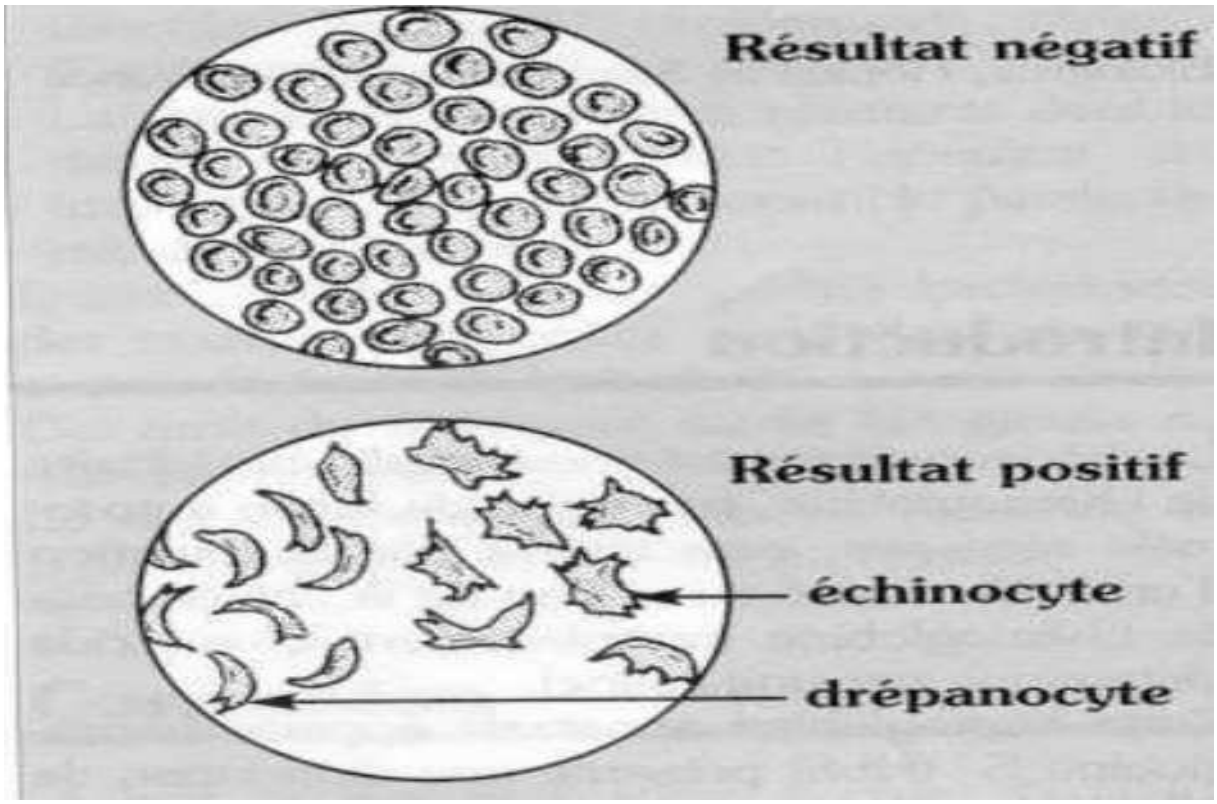


Figure 6: Résultats test d'EMMEL

IV-1-2- Test d'Itano ou test de solubilité

Il est fondé sur l'hypo solubilité en tampon phosphate concentré d'une solution d'hémoglobine S désoxygénée par le dithionite et se manifeste par un précipité dans la solution ainsi constituée.

Ce test n'est toutefois que semi-quantitatif et ne peut valablement faire la distinction entre les diverses formes génétiques de la maladie. De même il ne saurait être utilisé chez le nouveau-né ou chez un sujet porteur d'un taux faible d'HbS chez qui il peut être faussement négatif [**Wajcman,** 2004].

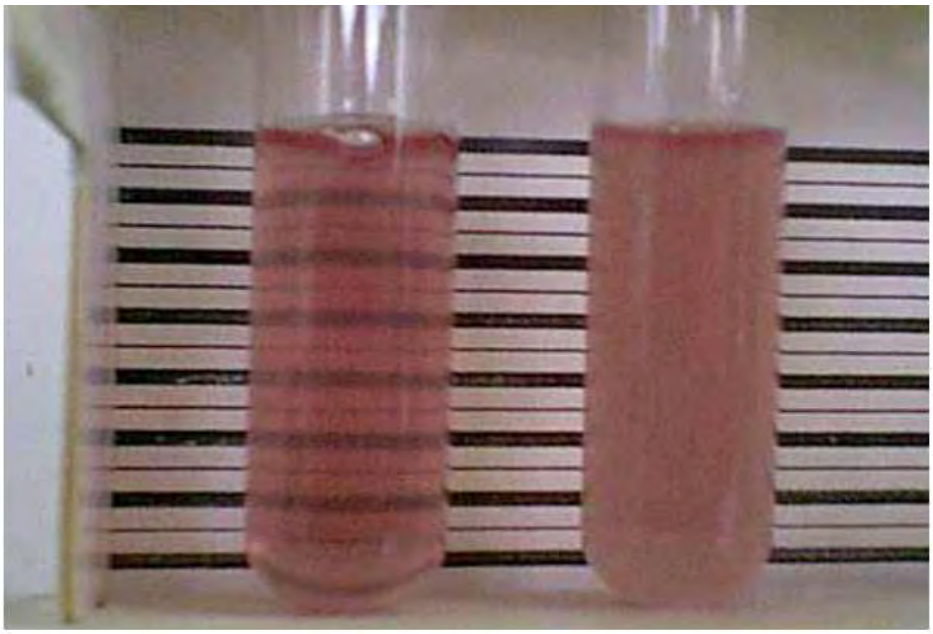


Figure 7: Résultats test d'Itano : Gauche (Témoin négatif) ; Droite (présence d'HbS)

IV-2. Tests de confirmation

Le diagnostic de la drépanocytose repose dans tous les cas sur l'identification formelle de l'HbS.

IV-2-1- Electrophorèse de l'hémoglobine

Elle se fait sur acétate de cellulose à pH alcalin ou acide. Elle met en évidence l'hémoglobine S et d'autres hémoglobines anormales.

Dans la drépanocytose homozygote seule sont présentes :

l'hémoglobine S majoritaire (75 à 95%) ;

l'hémoglobine A2 sensiblement normale (2 à 3,5%) ;

l'hémoglobine F dont le taux est variable (0 à 20%).

L'absence d'hémoglobine A1 est un élément fondamental du diagnostic.

IV-2-2- Isoéléctrofocalisation

C'est une variante électrophorétique qui peut remplacer les électrophorèses à différents pH ainsi qu'une partie des tests complémentaires nécessaires à l'identification d'un variant de l'hémoglobine.

C’est une technique de choix avec un excellent niveau de sensibilité et de spécificité pour détecter les hémoglobines anormales pendant la période néonatale [**Deme,** 2007].

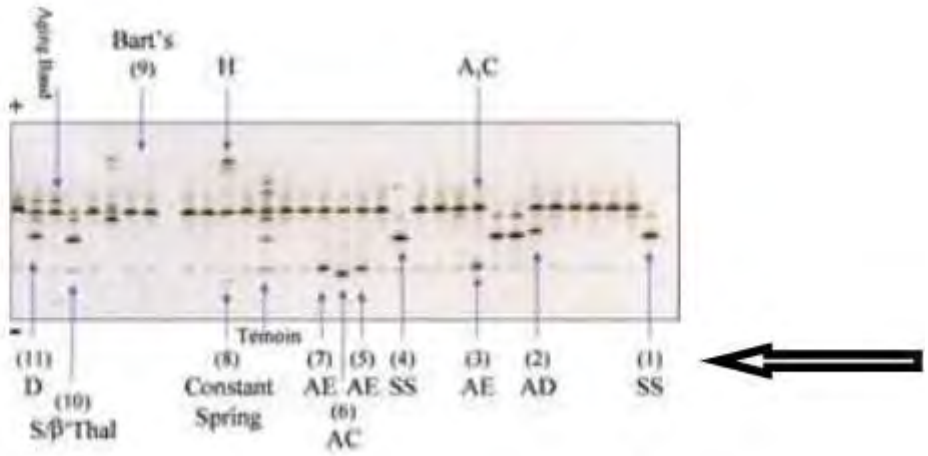


Figure 8: Isoélectrofocalisation en gel d’agarose (Isolab®) d’agar [**BASSET**, 1978].

IV-2-3- Chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP)

La CLHP, technique plus difficile à mettre en œuvre, elle permet l’identification et la quantification précise de la plupart des hémoglobines. C’est la technique de choix utilisée dans le suivi des drépanocytaires traités par l’hydroxyurée (hydréa), patients chez qui il est important de doser précisément le taux d’Hb F. De plus, grâce à l’analyse des temps de rétention, la CLHP est un outil précieux pour préciser ou confirmer l’identification d’Hb anormal **[Siguret,** 1997].

V- TRAITEMENT DE LA DREPANOCYTOSE

V-1- Principes généraux du traitement« classique»

Il n'existe quasiment aucun traitement curatif contre la drépanocytose, exception faite de la greffe de moelle osseuse mais l'on peut intervenir efficacement contre les douleurs et les autres aspects de la maladie.

Le plus important est une intervention précoce, dès la connaissance du diagnostic afin d'éviter les complications de la maladie.

Le traitement « classique » est basé sur :

- l'administration d'analgésiques de palier I, II ou III (paracétamol, codéine, dextropropoxyphène, morphine ...) en fonction de l'intensité de la douleur afin de calmer la souffrance liée aux crises vaso-occlusives, au priaprisme, au syndrome thoracique aigu, à la séquestration splénique … [**HABIBI,** 2004 ; **HAS,** 2005]

- l'administration d'antibiotiques et la vaccination en vue de prévenir les infections ;

- Une antibioprophylaxie par pénicilline est recommandée chez l'enfant atteint de drépanocytose SS, SC et Sβ à partir de 2 ans jusqu'à l'âge d'au moins 5 ans à la posologie de 100000 VI/Kg/jour jusqu'à 10kg puis 50000 VI/kg/jour de 10 à 40kg répartie en deux prises par jour.

- Les enfants drépanocytaires, comme les autres enfants, doivent recevoir la prévention vaccinale prévue selon le calendrier vaccinal contre la diphtérie, le tétanos, la poliomyélite, la coqueluche, les infections à *Haemophilus influenzae* de type B, la rougeole, les oreillons, la rubéole, la tuberculose et l'hépatite B.

En plus, ils doivent recevoir la vaccination antipneumococcique, antigrippale (dès 6 mois), antiméningococcique (dès 2 mois), contre l'hépatite A (dès 1 an si zone d'endémie), contre la typhoïde (dès 2 ans si zone d'endémie). Ils doivent être incité au repos et éviter des facteurs de risques (stress physique, psychique, hypoxie ...)

- une alimentation adéquate ;

- la supplémentation en acide folique : 1 comprimé à 5 mg tous les deux jours chez l'enfant et 1 à 2 comprimés par jour chez l'adulte tous les jours. L'acide folique est nécessaire au maintien de l'hématopoïèse et donc à la synthèse des globules rouges. Un déficit en acide folique chez un drépanocytaire contribue à aggraver l'anémie.

- l'absorption de grande quantité de liquide afin d'éviter le déclenchement des crises vaso-occlusives [**DE MONTALEMBERT,** 2004 ; **HAS,** 2005].

V-2- Traitements spécialisés

Parfois des procédures invasives telles que les transfusions sanguines et les interventions chirurgicales peuvent se révéler nécessaire :

- Les transfusions sanguines ont pour but d'augmenter la capacité de transport de l'oxygène du sang et de diminuer le nombre de drépanocytes. Elles sont notamment indiquées en cas de séquestration splénique aiguë en vue de corriger l'anémie et l'hypovolémie, et en cas de syndrome thoracique aigu pour diminuer l'hypoxie. Soit la transfusion est ponctuelle pour traiter une complication, soit elle est chronique dans un but de prévenir d'éventuelles complications.

- Les interventions chirurgicales sont indiquées dans certains troubles ophtalmologiques (hémorragie vitréenne, décollement de rétine), dans certains troubles cardio-vasculaires ...

De nouveaux traitements ont également été développés. Ils sont indiqués dans les formes graves de drépanocytose.

L'hydroxyurée est une molécule réactivatrice de la synthèse d'HbF (par blocage de la synthèse d'ADN ce qui entraine une myélosuppression et l'altération de la maturation de la lignée érythroïde). L'HbF ne s'intégrant pas dans les polymères d'HbS empêche la polymérisation et donc la falciformation des globules rouges. Il semblerait également que l'hydroxyurée diminue l'adhésion des réticulocytes à l'endothélium vasculaire et régule le processus inflammatoire.L'hydroxyurée est indiquée chez l'adulte et l'enfant ayant plus de 3 crises vaso-occlusives par an hospitalisés et/ou plus de 2 syndromes thoraciques aigus par an.

La posologie ne fait pas l'objet d'un consensus mais généralement la dose initiale est de 15mg/kg/jour avec une augmentation de 5mg/kg/jour toutes les 8 semaines sans dépasser 35mg/kg/jour pour éviter la toxicité au niveau de la

moelle osseuse. Les effets indésirables avec cette molécule sont relativement peu nombreux compte tenu de son mécanisme d'action : des cas de thrombopénies et neutropénies (due à la myélotoxicité), une azoospermie réversible à l'arrêt du traitement est quasi inéluctable, dans certains cas des manifestations cutanées ont été révélées (éruptions, ulcères) [**DE MONTALEMBERT ,** 2004 ;**HAS,** 2005 ; **GIROT R,** 2003 ; **ODIEVRE,** 2008].

- La greffe de moelle osseuse ou greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est le seul traitement potentiellement curateur, permettant d'espérer le remplacement pour lavie de toutes les cellules hématopoïétiques par celles du donneur. A ce jour, près de 200 greffes ont été réalisées dans le monde (approximativement 1/3 en France, 1/3 en Belgique et 1/3 aux Etats-Unis) à partir d'un donneur familial HLA identique de la fratrie AA ou AS [**Bernaudin**, 2004].

Il est très encourageant de noter que les résultats se sont améliorés avec le temps, puisque le risque actuel de rejet n'est plus que de 2% et qu'il n'y a eu aucun décès au cours des 30 dernières greffes réalisées dans le monde.

V-3- Recherche : quelques exemples

Les scientifiques se sont orientés vers la recherche d'autres molécules ayant le même mécanisme d'action que l'hydroxyurée (réactivation de la synthèse de l'HbF) mais dépourvues de toxicité. Le 5-aza-2'-déoxycytidine est en cours d'étude. D'autres molécules inhibant la déshydratation cellulaire, ou encore le monoxyde d'azote ou la phénylalanine font l'objet d'étude.

La recherche en Afrique a également permis de mettre au point, dans certains pays, des agents thérapeutiques efficaces pour la prévention des crises ou la réduction de leur fréquence et de leur gravité [**DE MONTALEMBERT M.,** 2004].

Deux articles scientifiques ont été publiés dans le journal *Nature Genetics* en septembre 2010 concernant le gène KLF1, impliqué dans l´activation de l´hémoglobine adulte (HbA) et dans la répression de l´hémoglobine fœtale (HbF). Lorsque les chercheurs bloquent partiellement l´activité de ce gène (KLF1) chez la souris, celle-ci exprime l´hémoglobine fœtale HbF de façon beaucoup plus importante chez l´adulte. Et un effet similaire a été observé dans des cellules humaines. Ces études sont le point de départ d'une piste à suivre : si le blocage partiel de ce gène chez les souris drépanocytaires améliore leur état, on pourrait rechercher un traitement qui aurait le même effet chez l´homme. Le travail est encore long, mais la piste semble intéressante... Effectivement, on sait que certains drépanocytaires qui font peu de crises présentent beaucoup plus d´HbF que la normale. D'autre part, l'hydroxyurée a aussi pour conséquence d'augmenter le taux d'HbF : il s'agirait donc de **développer un traitement alternatif à l'hydroxyurée**[**Journal Nature genetics,** 2010-2011].

Un nouveau traitement contre la douleur est en cours de recherche. Il s'agit d'une molécule de synthèse appelée **conolidine** qui semble avoir un mécanisme d'action inhabituel [**Tarselli,** 2011].

V-4 – Phytothérapie

Des traitements à base de plantes africaines ont été développés pour pallier les souffrances parmi ces plantes on peut citer :

- *Zanthoxylum fagara et ses extraits*
- *Eugenia caryophllum*
- *Sorgul bicolor*
- *Piper guineense*
- *Pterocarpus osun*
- *Cajanus cajan*
- *Carica papaya*
- *Alchornea cordifolia*

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, dont le promoteur est le Pr. Pierre GUISSOU qui a mis au point un mélange appelé FACA à base de *Zanthoxylum fagara* et de *Calotropis procera***[Zouibaa,** 2015**]**. Ces plantes agissent en synergie contre les principaux symptômes de la crise drépanocytaire.

Chapitre II : Méthode d'étude de l'activité antioxydante

I-1-Rappel sur le stress oxydatif et la toxicité des radicaux libres

L'oxygène est normalement transformé en molécules d'eau au niveau de la chaine respiratoire mitochondriale. Cette réaction est cruciale puisqu'elle apporte à la cellule toute l'énergie nécessaire (sous forme d'adénine triphosphate (ATP)) pour assurer ses multiples fonctions. Mais l'oxygène peut être également une source d'agression pour les organismes aérobies [**Ekoumou**, 2003].

Une faible partie de l'oxygène (2 à 5%) est convertie en espèces oxygénées actives (EOA) particulièrement réactives [**Pincemail** , 2001].

Le stress oxydant se définira donc comme un déséquilibre de la balance entre la formation d'EOA à caractère pro-oxydant et les antioxydants qui régulent leur production en faveur des premières

Tableau I: Principaux radicaux libres et leur formule chimique.

Radicaux libres	Formule chimique
Anion superoxyde	$O_2^{\circ-}$
Radical hydroxyde	OH°
Monoxyde d'azote	NO°
Peroxyde d'hydrogéne	H_2O_2
Acide hypochloreux	HOCl
Oxygène singulet	$^1O_2$
Peroxynitrite	$ONOO^-$
Radical alcoxy	RO
Radical peroxy	ROO

Ces radicaux libres (RL) pourront dès lors s'attaquer à toute série de substrats biologiques importants tels que les acides nucléiques, les protéines, les lipides, etc.

I-2-Principe général d'étude de l'activité antioxydante

L'étude de l'activité anti-oxydante repose sur le principe selon lequel deux espèces chimiques réactives sont mises ensemble dans des conditions et des proportions définies par un protocole expérimental. L'espèce chimique dont on étudie le pouvoir antioxydant est un réducteur c'est-à-dire un élément chimique capable de céder (donner) un électron, un proton ou un atome d'hydrogène à une autre espèce chimique appelée oxydant qui capte l'espèce chimique cédée. Parallèlement et au même moment, on prépare une solution de contrôle qualifiée de blanc (pas de principe antioxydant) et ne contenant que les solutions de préparation utilisées pour la préparation des gammes de concentration en plus de l'espèce réactive utilisée comme oxydant. Une autre solution de référence contenant une substance pure douée d'activité anti-oxydante est utilisée parallèlement pour une meilleure interprétation des résultats des substances à tester.

Il existe différentes méthodes pour déterminer le potentiel antioxydant d'un produit [**Blois**, 1958**]**

On peut proposer trois types d'analyses :

- **Le test ABTS** (2,2'-azinobis-(acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) ;
- **Le test ORAC** (Oxygen Radical Absorbance Capacity) avec l'AAPH (2,2'-azobis-2-méthyl-propanimidamide dichlorhydrate) ;
- **Le test au DPPH** (1,1 diphényl-2-picryl-hydrazyle).

Les antioxydants peuvent réduire les radicaux primaires par deux mécanismes :

- transfert d'électrons singulets (ABTS et DPPH) et
- transfert d'atomes d'hydrogène (ORAC).

Il existe souvent des différences de valeurs entre les méthodes, selon que les sources de radicaux libres soient différentes, et que les antioxydants répondent différemment aux méthodes de mesures.

Ainsi, selon la matrice testée, l'une ou l'autre méthode est applicable. Par exemple, pour des extraits végétaux, les trois tests sont applicables. En revanche pour du plasma sanguin, la méthode ORAC semble plus indiquée du fait que les radicaux péroxyles utilisés dans ce test sont couramment rencontrés dans le corps humain. La valeur en est de fait plus significative.

En dehors des trois méthodes (ABTS, ORAC, DPPH) que nous avons détaillées ci-après, et mises à part les variabilités de protocole que nous pouvons retrouver dans certaines études, nous distinguons :

- le test de réduction des ions ferreux (Fe^{3+}) en ions ferriques (Fe^{2+}) ;
- les tests de piégeage de radicaux oxygénés spécifiques d'un type de radical oxygéné (O_2, H_2O_2, HO^-, ROO^-) ;
- la méthode de décoloration du β-carotène.

Dans notre étude nous avons utilisés la méthode au DPPH dont la description se trouve dans la partie « matériels et méthodes ».

Chapitre III : étude botanique et chimique de *Combretum glutinosum* Perr.ex DC

I-1- Généralités sur Combretum glutinosum Perr.ex DC

Combretunm glutinosum, couramment appelé Kinkeliba coriace (Ratt en Wolof) est une plante de la famille des Combretaceae. Cette famille est constituée de 18 genres dont 370 espèces de Combretum [**Malgras,** 1992 ; **Mc Gaw,** 2001].

I-2-Classification et appellations

- **Classification** : (**Creté. P,** 1965)
  - Règne : Végétal
  - Sous règne : Eucaryotes
  - Embranchement : Spermatophytes
  - Sous embranchement : Angiospermes
  - Classe : Dicotylédones
  - Série : Dialypétales
  - Ordre : Myrtales
  - Famille : Combretaceae
  - Sous famille : Combretoideae
  - Genre : *Combretum*
  - Espèce : *glutinosum*
- **Synonymes :**[**Maydell ,** 1980]

- *Combretum passargei* Engl. Et Diels
- *Combretum leonense* Engl. Et Diels
- *Combretum hypopilinum* Diels

- **Noms vernaculaires**

Français : chigomier

Wolof : ratt

Sérére : yay

I-3-Description botanique :

Combretum glutinosum(ratt) se présente sous forme d'arbre ou d'arbuste pouvant atteindre 12m de haut. La plante est facilement reconnaissable par ses grosses feuilles alternes, verticillées ou opposées, et se distingue des autres espèces de Combretum par ses sept à dix nervures saillantes [**Maydell,** 1980].

Le tronc est souvent tordu et recouvert d'une écorce rugueuse. Les feuilles sont très polymorphes sur le même arbre. Elles sont collantes et poisseuses, très profondément réticulées à la face inférieure avec une pubescence blanchâtre ou parfois presque glabre. Le revêtement tomenteux des rameaux, toujours visible à la loupe, est un signe caractéristique typique de l'espèce.

Combretum glutinosum présente des fleurs en épis axillaires de couleur jaunâtre, mesurant 6 à 10cm de long.

Les fruits sont des akènes indéhiscents, avec quatre ailes membraneuses, renfermant une graine dépourvue d'albumen. Ils sont sans écailles, légèrement collants, mesurant 2,5 à 3cm de long sur 2,8 cm de diamètre. Ils sont verts dans la jeunesse, à maturité rouge-vif, et ficelés [**Malgras,** 1992 ; **Kerharo et Adam,** 1974].

Figure 9: *Combretum glutinosum* Perr.ex DC [**Bassene**, 1985]

I-4-Répartition géographique

Combretum glutinosum est une plante originaire de l'Afrique tropicale. Elle existe dans les régions soudano-guinéennes, du Sénégal jusqu'au Soudan. C'est une espèce également retrouvée dans les savanes boisées à l'intérieur du Sénégal et aux environs du lac des Guiers [**Kerharo et Adam,** 1974].

Combretum glutinosum est rencontrée au Sahel sur les dunes fixées, dans le Sahel soudanais, sur les sols pierreux, ainsi que dans la zone soudanienne sur les latérites. C'est un arbre qui colonise les jachères. Il est retrouvé au bord des mares, ainsi qu'en Mauritanie où il existe avec 200 mm de pluie. C'est une espèce qui résiste à la sécheresse [**Maydell,** 1980 ; **Kerharo et Adam,** 1974].

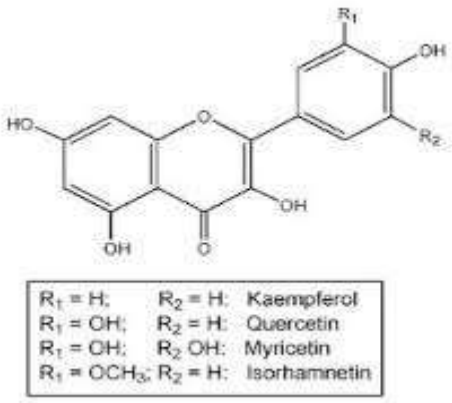
I-5- Chimie de la plante

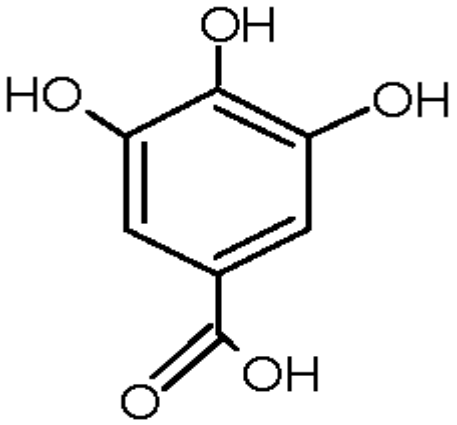
Dans les feuilles de l'espèce sénégalaise, ont été décelés les constituants chimiques suivants :

- quatre hétérosides flavoniques ;
- des composés poly phénoliques :
- des tanins hydrosolubles.

La combreglutinine est un tanin hydrolysable isolé de l'extrait méthanolique au Soxhlet des feuilles de l'espèce sénégalaise. Trois autres tanins ont été isolés de cet extrait. Il s'agit du 2,3 – (S) hexahydroxydiphénoyl - D – Glucose, de la punicaline et de la punicalgine [**Akino,** 1994].

- des flavonoides ;
- des stilbenoides (combretastatines) ;
- des acides organiques : acide gallique, acide ellagique, acide férulique ;
- des leucocyanidols et leucodelphinidols.





Structures de flavonoïdesacide gallique

I-6-Données pharmacologiques et toxicologiques

Une étude clinique portant sur les différentes indications thérapeutiques signalées a été réalisée. L'expérimentation réalisée avec le décocté aqueux de feuilles (cinq feuilles pour un litre d'eau) a mis en évidence une action intéressante comme diurétique et hypotenseur d'appoint [**Enda.sn,** 2003] De plus, une observation a été faite dans un cas de lithiase rénale et une autre dans un cas d'ictère hépatique [**Kerharo et Adam,** 1974].

Par ailleurs, il a été rapporté que les extraits chloroformiques et méthanoliques des feuilles et des tiges ont inhibé la croissance de *Bacillus substilis*, *Staphylococcus aureus*, Pseudomonas aeruginosa, *Escherichia coli*. Par contre, l'extrait aqueux a été inactif [**Keita,** 2002].

Par ailleurs, une expérimentation réalisée chez la souris a mis en évidence l'activité antitussive et antispasmodique [**Pousset,** 2004].

L'espèce *Combretum glutinosum*est peu toxique. L'expérimentation toxicologique réalisée à Dakar par Daffé (Enda.sn, 2003 a montré une toxicité quasi nulle [**Enda.sn,** 2003].

I-7- Utilisations en médecine traditionnelles

Combretum glutinosum est l'espèce de Combretum la plus répandue au Sénégal et la plus prescrite par les thérapeutes traditionnelles dans le traitement des affections courantes sur l'ensemble du territoire[**Kerharo et Adam,** 1974**].**

La grande considération dans laquelle elle est tenue se reflète même dans certains de ses noms vernaculaires. Ainsi, le nom Sérère « Yaye » signifie « la mère des médicaments» ; le nom Socé « Diambakatan » signifie « la feuille qui ne déçoit pas » [**Gaba,** 1980].

La plante est employée en médecine populaire dans le traitement des affections hépato-biliaires, les affections urinaires, les œdèmes, l'hypertension artérielle, la toux, le paludisme, les gastrites infantiles, la protéinurie [**Enda.sn,** 2003].La tisane obtenue à partir des feuilles est très utilisée par la population.

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

I- Matériels et méthodes

I-1- Matériels

I-1-1- Matériel végétal

Le matériel végétal est constituée de feuilles de *Combretum glutinosum* obtenu au marché Fass de Dakar dans une des boutiques dont le propriétaire a été formé par l'ONG ENDA Tiers-monde (environnement et développement appliquée au tiers-monde). Cette ONG est une organisation internationale à caractère associatif et à but non lucratif dont l'une de ses activités est la valorisation de certaines plantes médicinales avec sensibilisation au techniques de cultures et à l'utilisation thérapeutique des plantes.

Figure 10: Espace vente d'un tradipraticien (marché fass de Dakar**) [Thiam, 2016]**

I-1-2- Matériels de laboratoires utilisés dans ce travail

- Broyeur à marteau
- Balance sartorius
- Erlenmeyer
- Becher de 200 ml
- Entonnoir
- Etuve
- Portoir
- Chauffe-ballon
- Agitateur magnétique chauffant
- Pompe à vide
- Papier-filtre
- Fiole de Kisato
- Rotavapor type Büchi R-124
- Spectrophotomètre
- Lames et lamelles
- Vernis à ongle
- Micropipettes
- Microscope optique

I-1-3- Matériel chimique

Ce matériel contient les réactifs et les solvants utilisés durant toutes les manipulations. Tous les solvants ont été distillés avant leurs utilisations

- Méthanol
- Acétate d'éthyle
- Dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4)
- Diméthylsulfoxide (DMSO)
- Hydrogénophosphate de sodium ($NaHPO_4$)

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

- Chlorure de sodium (NaCl)
- Carbonate de sodium (Na_2CO_3)
- Chlorure ferrique (FeCl3)
- Réactif de stiasny
- Acétate de sodium
- Alcool chlorhydrique
- Alcool iso amylique
- Copeaux de magnésium

I- 2- Méthodes

I-2-1- Broyage

Les feuilles de *Combretum glutinosum* bien séchée à l'abri de la lumière, ont été finement broyées à l'aide d'un broyeur à marteau et la poudre obtenue a servi de soluté d'extraction pour le reste des manipulations.

I-2-2- Extraction

I-2-2-1- Solvants utilisées

Les solvants utilisés, par ordre de polarité décroissante, pour la macération sont : le méthanol et l'acétate d'éthyle.

Tableau II: Caractéristiques des solvants utilisés

Solvant	Méthanol	Acétate d'éthyle
Formule	CH_3OH	$C_4H_9O_2$
Indice de polarité	5,1	4 ,4
Densité	1,061	897,00 Kg/ m^3
Point d'ébullition	65 °C	77,1 °C
Point de fusion	−98 °C	-83,6 °C

I-2-2-2 Macération et filtration

Les macérations ont été faites avec ces deux solvants selon le protocole suivant :

- Dans un erlenmeyer, 60 g de poudre de la plante ont été mélangés à 300 ml de méthanol et le tout est soumis à une agitation magnétique pendant 48 h.
- Pour l'acétate d'éthyle, 40 g de poudre ont été utilisés pour 200 ml de solvant. le mélange a été soumis à une agitation mécanique pendant 48 h.
  Les deux macérâts ont été filtrées et évaporées au rotavapor R-124 (figure 11) pour obtenir respectivement l'extrait sec methanolique et l'extrait sec d'acétate d'éthyle.

Figure 11: Etape de la macération et filtration de l'extrait méthanolique **[Thiam, 2016]**

I-2-3- Screening phytochimique

I-2-3-1- Caractérisation des polyphénols

La présence de polyphénols est mise en évidence à l'aide du perchlorure ferrique.

Mode opératoire

Nous avons préparé une infusion de 5% autrement dit à 100 ml d'eau bouillante on a mis 5 g de poudre. Le mélange est laissé reposer pendant 30 mn puis filtrer.

A 2 ml de l'infusé est ajouté quelques goutte de solution alcoolique de $FeCl_3$. Une quantité égale d'infusé a été mis dans un autre tube à essai pour servir de témoin.

NB : cet infusé servira également à caractériser les tanins et les flavonoïdes.

T= tube témoin ; R= tube contenant le réactif

I-2-3-2- Caractérisation des tanins

- **Tanins catéchiques** ou condensées ou non hydrolysables :

  - **Mode opératoire** : à 1 ml de l'infusé est ajouté 0,5 ml du réactif de Stiasny (méthanal, acide chlorhydrique) ; le mélange obtenu est chauffé au bain marie à 90°C pendant 15 mn. L'apparition d'un précipité montre la présence de tanin catéchiques.

Un autre tube contenant 1 ml de l'infusé a été utilisé comme témoin.

-Tanins hydrolysables ou galliques :

Mode opératoire : pour révéler les tanins galliques, 0,5 ml de l'infusé précédent a été prélevé. Cette solution a été ensuite saturée avec l'acétate de sodium, à ce mélange 0,1 ml d'une solution de $FeCl_3$ à 2% est ajouté.

I-2-3-3- Caractérisation des flavonoïdes

Mode opératoire : à 1 ml de l'infusé est ajouté 1 ml d'alcool chlorhydrique (concentré à 50%). A ce mélange est ajouté 1 ml d'alcool iso amylique et quelques copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration :

- ✓ Rose orangé indique la présence de flavones
- ✓ Rose violacé indique la présence de flavanones
- ✓ Rouge indique la présence de flavonols

I-2-3-4- Caractérisation des saponosides

Pour mettre en évidence une drogue à saponosides, il suffit de mettre en évidence leur pouvoir aphrogéne en observant la mousse qu'elle génère.

Mode opératoire : un décocté de 1% est préparé (1 g de poudre dans 100 ml d'eau bouillante). On maintient une ébullition légère pendant 15 mn avant de filtrer la suspension. On introduit dans 10 tubes à essai de 1 à 10 ml du filtrat et en complétant avec de l'eau jusqu'à 10 ml. On agite le contenu de chaque tube pendant 15 secondes. La hauteur de la mousse est mesurée 15 mn après agitation. L'indice de mousse est calculé à partir du numéro de tube (N) dans lequel la hauteur de mousse est de 1 cm.

I-2-4- Préparation des solutions extraits

I-2-4-1- Préparation de la solution tampon phosphate à pH 7,4

La solution tampon phosphate saline est un milieu physiologique qui permet de maintenir les fonctions biologiques. Le pH utilisé (7,4) est celui du milieu intérieur.

Les quantités requises pour la préparation de 1 litre de solution tampon phosphate sont :

- 0,16 g de NaH_2PO_4 (Dihydrogénophosphate de sodium)
- 0,98 g de $NaHPO_4$ (Hydrogénophosphate de sodium)
- 8,10 g de NaCl (Chlorure de sodium)

Ces différents composés sont dissouts dans l'eau distillée. On utilise un agitateur mécanique pour dissoudre et homogénéiser la solution. On contrôle le pH à l'aide d'un pH-mètre.

I-2-3-2- Préparation des dilutions

- **Préparation des solutions mères**

Concernant notre étude, deux solutions mères ont été préparées à partir des extraits secs (méthanolique et d'acétate d'éthyle)

Mode opératoire :

- solutions mères à partir d'extraits secs méthanoliques

A 100 mg d'extraits secs, on complète à 10ml avec la solution tampon phosphate à pH 7,4 ce qui donne une concentration de 10 mg /ml.

- solutions mères à partir d'extraits secs d'acétate d'éthyle:

- A 50mg d'extraits secs, on complète à 5 ml avec la solution tampon phosphate à pH 7,4 et on obtient une concentration de 10 mg / ml

- **Préparation des solutions filles de 5 ; 0,5 et 0,05 mg / ml**

PRINCIPE :

Elle repose sur le fait que la solution initiale et la solution finale contiennent autant de quantité de matière de soluté :

(1) N initiale = N finale

⇒

(2) $C_i V_i = C_f V_f$

avec : Ci = concentration initiale de la solution mère qui a servie à la dilution

Vi = volume de la solution mère

Cf = concentration de la solution fille (5 ; 0 ,5 ou 0,05 mg / ml)

Vf = volume de la solution fille (à fixer de manière arbitraire)

Ainsi en calculant à partir de la formule (2) le volume de solution mère à prélever (Vi) et connaissant le volume de la solution fille (Vf), nous pouvons connaitre le volume de solution tampon à ajouter pour obtenir la concentration finale (Cf) escomptée

V solution tampon = Vf – Vi

I-2-4- Evaluation de l'activité anti-oxydante

Cette activité a été testée sur l'extrait méthanolique et la méthode utilisée est celle au DPPH.

La méthode est basée sur la dégradation du radical DPPH (**Figure 12**). Ce dernier est un radical libre de coloration violette qui présente une bande d'absorption caractéristique à 517 nm liée à la résonance des électrons non appariés. En présence d'une substance chimique anti-radicalaire (anti-oxydante), les électrons non appariés sont capturés de façon stéochiométrique, ce qui provoque une baisse de l'absorption liée à la décoloration de la solution de DPPH en jaune. Un antioxydant aura la capacité de donner un électron singulet au radical synthétique DPPH de coloration violette pour le stabiliser en DPPH de coloration jaune. La mesure de la décroissance de coloration violette au cours du temps permet de déterminer la concentration inhibitrice à 50% notée CI_{50}, temps au bout duquel 50% de la coloration violette est perdue. Généralement, CI_{50} est interprétée sur la base de la quantité d'un antioxydant nécessaire pour faire diminuer de 50% la quantité initiale de DPPH . Le résultat est dépendant de la concentration en DPPH° initiale. On peut aussi exprimer la capacité anti-oxydante par le pourcentage d'inhibition.

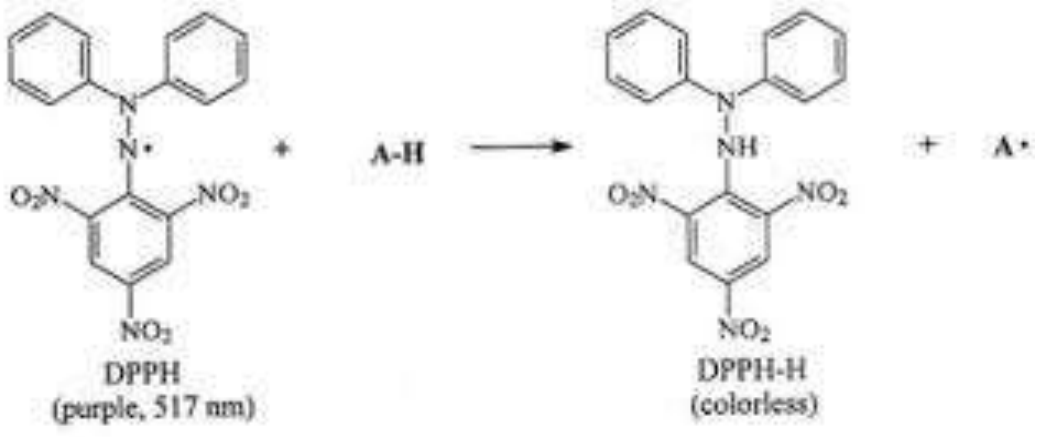


Figure 12: Structure du DPPH avant et après réaction avec l'antioxydant (AH)

I-2-4-1 Protocole opératoire de la méthode au DPPH

La méthode utilisée est celle de Molyneux (2003). Une quantité de 4 mg de poudre de DPPH° sont dissout dans 100 ml d'éthanol. La conservation de la solution se fait à l'abri de la lumière pendant 12 heures. Puis dans une série de tubes à essai contenant 0,1 ml d'extrait à différentes concentrations, sont ajoutés 3,9 ml de la solution de DPPH°. Les extraits sont testés aux concentrations suivantes : 0,25 - 0,5 - 0,75 - 1 et 5 mg/ml.

L'acide ascorbique utilisé comme antioxydant de référence est aussi testé. La lecture de l'absorbance se fait au bout de 30 minutes au spectrophotomètre à 517 nm en utilisant l'éthanol comme blanc. L'absorbance de la solution de DPPH est relevée à T_0.

Trois essais ont été effectués pour chaque concentration testée (n = 3). Les résultats sont d'abord exprimés en pourcentage d'inhibition (PI) de l'activité antiradicalaire et en CI_{50} (Concentration en antiradicalaire permettant de piéger 50% de radicaux libres).

La CI_{50} s'obtient à partir du graphe représentant le pourcentage de piégeage (% PI) en fonction de la concentration (mg/ml). Cette valeur dépend de la concentration de DPPH utilisée pour le test [**Fall**, 2013]. Plus la valeur de CI_{50} est petite, plus l'activité de l'extrait est grande [**Pokorny**, 2001].

Calcul des pourcentages d'inhibition (PI)

Les pourcentages d'inhibition sont calculés suivant la formule suivante :

$$PI = (A_0 - A_1) * 100 / A_0$$

A_0 = absorbance du DPPH

A_1 = absorbance après ajout de l'extrait à une concentration donnée après un temps donné.

I-2-5- Collecte de sang

Le sang est obtenu par ponction veineuse au niveau du pli du coude sur un tube contenant de l'EDTA (anticoagulant), ensuite un test d'EMMEL est effectué afin de savoir si le patient est drépanocytaire ou pas. Si tel est le cas, une centrifugation est effectuée puis une électrophorèse permet de confirmer la nature SS ou AS du patient. Dans notre étude, nous avons travaillé uniquement avec du sang de patients drépanocytaire SS.

I-2-6- Protocole du test au laboratoire

Le principe est le même que celui du test d'Emmel. Une goutte de sang est placée sur une lame, au contact d'une goutte sensiblement équivalente de métabisulfite de sodium et d'extrait. L'étalement et le mélange sont faits avec les rebords de la lame ; ensuite du vernis à ongle permet de fixer la lamelle sur la lame empêchant ainsi toute entrée d'air ; l'ensemble lame et lamelle est observé au microscope au bout de 15 mn. Pour chaque prélèvement un premier test est effectué directement sur du sang frais qui n'a encore subi aucune manipulation (témoin). Toutes les 30 mn, un décompte des drépanocytes est effectué, ce qui donne pour chacune d'elle un total de 5 tests respectivement aux T_0, T_{30}, T_{60}, T_{90}, et T_{120} mn. Par rapport à la lame témoin nous apprécions à T_0, T_{30}, T_{60}, T_{90}, T_{120} le nombre de drépanocytes sur chacune de nos prélèvements.

Un décompte est opéré sur chaque lame pour déterminer le taux de drépanocytes résiduels. Dans la pratique nous choisissons cinq champs, comportant chacun approximativement une centaine d'éléments et nous évaluons ainsi le nombre moyen de drépanocytes pour 100 hématies.

Le temps T_0 est en réalité la première lecture effectuée au moins 15 mn après avoir privés les hématies d'oxygène.

Le pourcentage de drépanocytes résiduels représente le rapport entre le nombre de drépanocytes à T_0 et le nombre de drépanocytes à T_x.

$$\% \text{ de drépanocytes résiduels} = \frac{moyenne\ des\ drépanocytes\ à\ T_x}{moyenne\ des\ drépanocytes\ à\ T_0} * 100$$

I-2-7- Dosage des composés polyphénolyques totaux (PPT)

La teneur en phénols totaux des feuilles *Combretum glutinosum* a été déterminéepar la méthode Folin Ciocalteu.

Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par ce réactif, elle entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleue qui absorbe à 765 nm, le dosage de PPT est effectué par la comparaison de l'absorbance mesurée à celle obtenue par un étalon d'acide gallique de concentration connue [**Saikat**, 2013].

Un volume de 0,5 ml d'extrait méthanolique de *Combretum glutinosum* (0,1 mg/ml) est mélangé avec 2,5 ml du réactif de Folin Ciocalteu dilué au 1/10^{e} avec de l'eau distillée et 2 ml de carbonate desodium 0,5 M (Na_2CO_3). Après 30 mn d'incubation à température ambiante, l'absorbance est lue au spectrophotomètre à 765 nm. L'acide gallique est l'antioxydant de référence. Des concentrations de 0 ; 0,01 ; 0,015 ;0,025 ; 0,05 ; 0,075 ; 0,1 ; 0,15; 0,2 mg/ml sont préparées dans des tubes à hémolyse. Dans chaque tube, on rajoute 2,5 ml du réactif de Folin Ciocalteu dilué au 1/10^{e} et 2 ml de carbonate de sodium. Les tubes sont incubés à température ambiante pendant 30 mn puis lus au spectrophotomètre à 765 nm contre un blanc (même solution sans la solution d'acide gallique). Les résultats obtenus ont permis de tracer la courbe d'étalon (l'absorbance en fonction de la concentration). La projection de la valeur de la DO de l'extrait sur la courbe permet de déterminer la teneur en phénols en termes d'équivalent d'acide gallique (mg/g de matière sèche). Toutes les analyses sont réalisées en triplicata.

II- Résultats et discussion

II-1- Résultats

II-1-1- Calcul des rendements

Soit X la masse de l'extrait sec et ME la masse de la prise d'essai.

Le rendement (R) de l'extraction est donné par la formule suivante :

R= X/ME x 100

Ainsi le rendement des différents extraits secs sont mis dans le tableau suivant :

Tableau III: Rendements des différents extraits secs

Extrait sec	Méthanolique	Acétate d'éthyle
Prise d'essais	60 g	40 g
Masse en g	4,47	0,22
Rendement (%)	7,45	0,55

II- 1- 2 Screening phytochimique

Le screening phytochimique est un moyen indispensable pour mettre en évidence la présence de groupes de familles chimiques présente dans une drogue donnée. Toutefois ce screening phytochimiques ne renseigne point sur la nature des molécules chimiques.

Le principe est soit basé sur la formation de complexes insolubles en utilisant les réactions de précipitation, soit sur la formation de complexes colorés en utilisant des réactions de coloration.

Pour notre plante (*Combretum glutinosum perr.)* nous avons fait une caractérisation générale des polyphénols puis celles des tanins, des flavonoïdes des alcaloïdes et des saponosides.

II-1-2-1- Caractérisation des polyphénols

La présence de polyphénols est mise en évidence à l'aide du perchlorure ferrique.

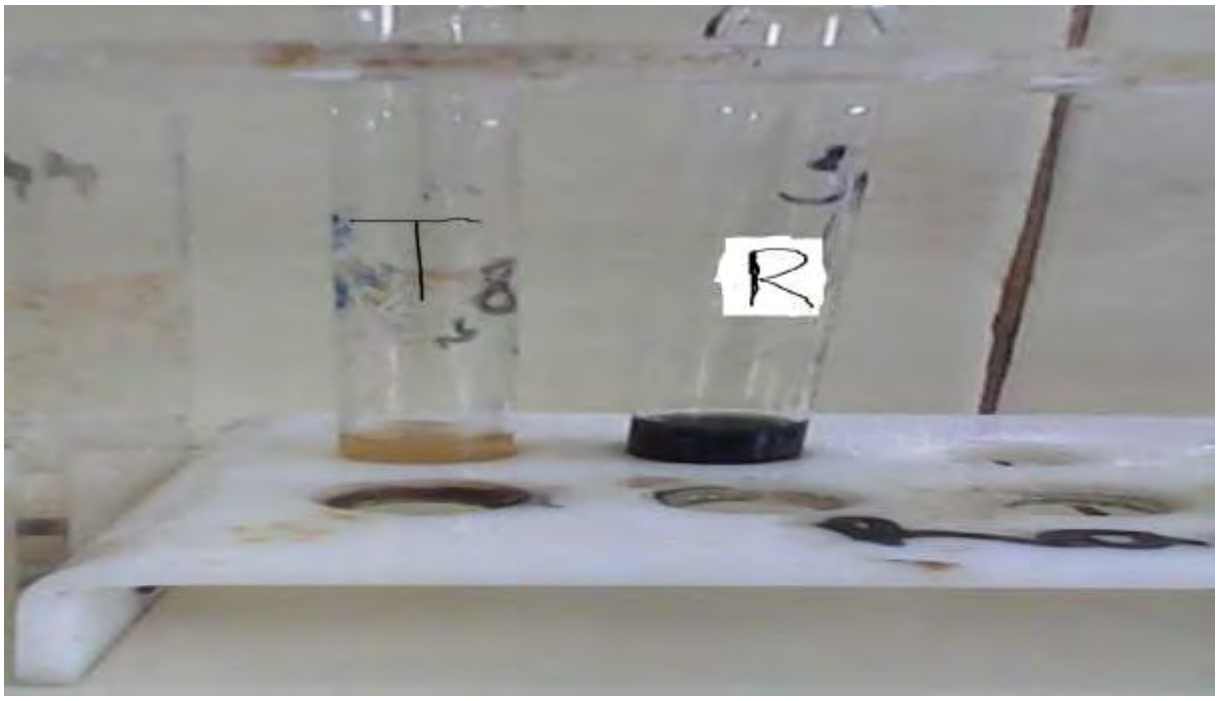


Figure 13: Caractérisation des polyphénols présents dans les feuilles de *C. glutinosum* **[Thiam, 2016]**

T= tube témoin ; R= tube contenant le réactif

Conclusion : la coloration bleue noirâtre étant bien observée, nous pouvons conclure qu'il y'a présence de polyphénols dans les feuilles de *C. glutinosum.*

II-1-2-2- caractérisation des tanins :

- **tanins catéchiques** ou condensées ou non hydrolysables :

- **Résultats** : aucun précipité n'a été observé dans le tube contenant le réactif.
- **Conclusion** : le test de mise en évidence des tanins catéchiques est négatif ce qui signifie leur absence dans les feuilles de *C. glutinosum*.

-tanins hydrolysables ou galliques :

Résultat : Il a été observé le développement instantané d'une coloration bleue noire intense révélatrice de la présence de tanins galliques non précipités par le réactifs de Stiasny.

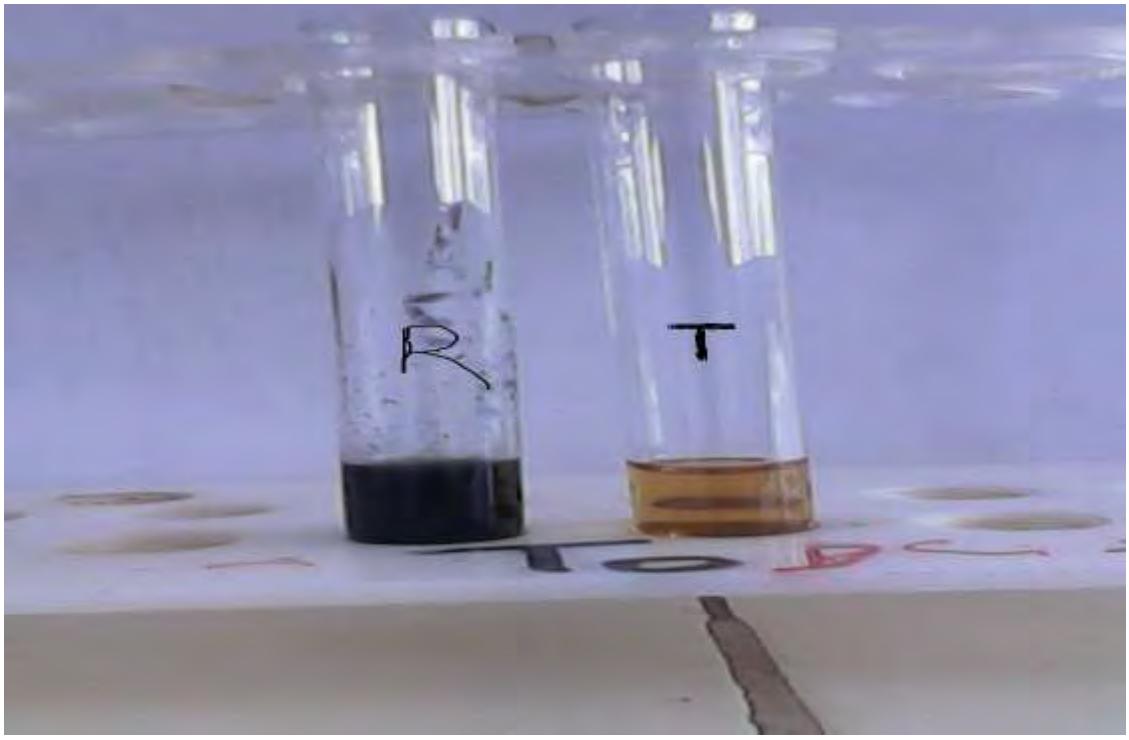


Figure 14: Caractérisation des tanins hydrolysables dans les feuilles de *C. glutinosum* **[Thiam, 2016]**

- **Conclusions** : le test est donc positif et il y'a présence de tanins hydrolysable dans les feuilles de *C. glutinosum* (Figure 14).

II-1-2-3- caractérisation des flavonoïdes:

Résultat : une forte coloration rose orangé a été observé (Figure 15)

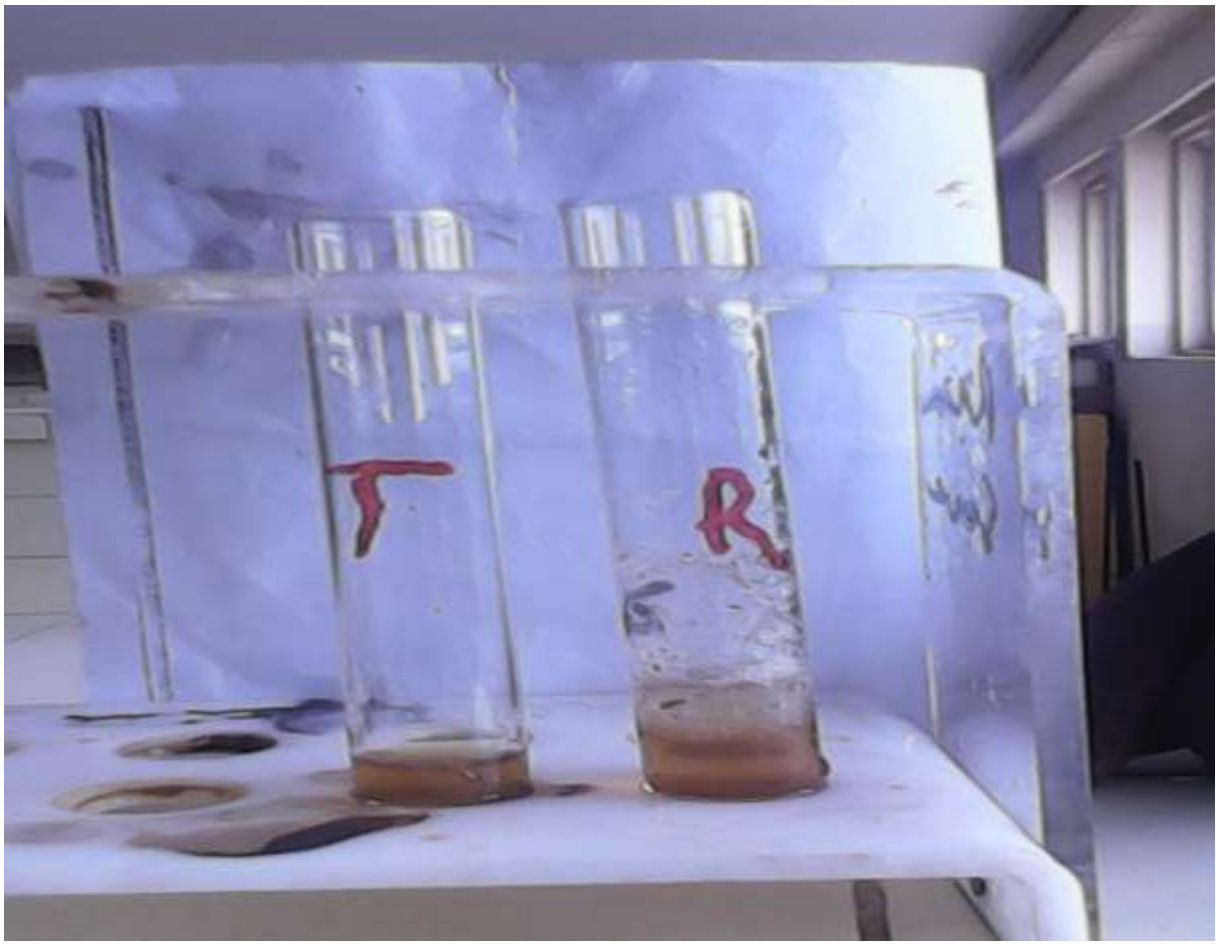


Figure 15: Caractérisation des flavonoïdes dans les feuilles de *C. glutinosum* **[Thiam, 2016]**

Conclusion : il y'a présence de flavonoïdes dans les feuilles de *C. glutinosum*

II-1-2-4- caractérisation des saponosides :

Pour mettre en évidence une drogue à saponosides, il suffit de mettre en évidence leur pouvoir aphrogéne en observant la mousse qu'elle génère.

Résultat : Le tube numéro 10 a une hauteur de mousse égale à 1 cm (voir figure 16)

Im= 1000/N= 1000/10= 100

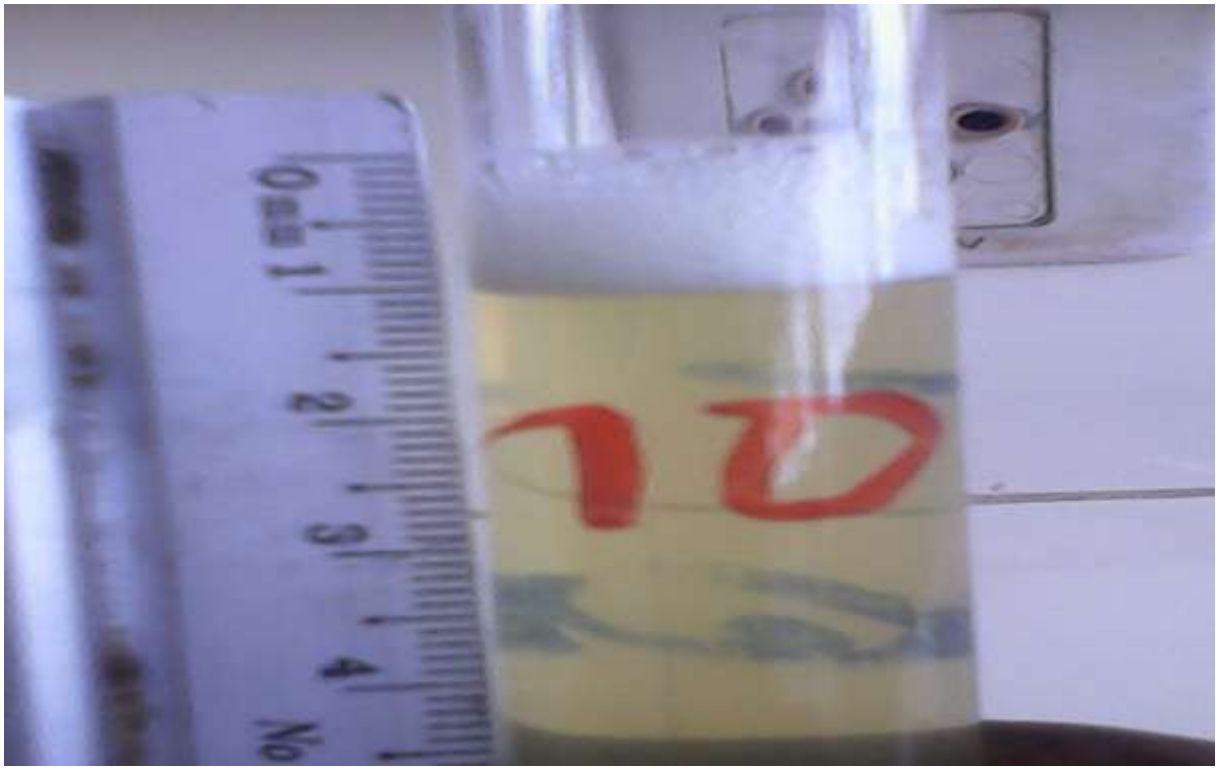


Figure 16: Mise en évidence des saponosides dans les feuilles de *C. glutinosum* **[Thiam, 2016]**

En résumé :

Groupes chimiques	Polyphénols	Tanins catéchiques	Tanins hydrolysables	flavonoides	saponosides
Résultats	+++	-	+++	+++	++

+++ = forte présence ; ++ = présence moyenne ; + = faible présence ;

- =absence

II-1-3- Résultats de l'activité anti-oxydante de l'extrait méthanolique des feuilles de *combretum glutinosum*

Les tableaux suivants donnent les pourcentages d'inhibition de l'extrait méthanolique et de l'acide ascorbique à différentes concentrations

Tableau IV: Pourcentage d'inhibition extrait méthanolique

Concentration (mg/ml)	PI 1	PI 2	PI 3	Moyenne
0,25	24,96	25,2	28,11	26,09
0,5	36,14	31,71	32,4	33,41
0,75	57,04	57,89	59,27	58,06
1	70,02	70,67	70,85	70,51
5	87,1	84,76	85,94	85,93

Tableau V: Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique

Concentration (mg /ml)	PI 1	PI 2	PI 3	Moyenne
0,096	27,20	23,91	26,57	25,89
0,1	28,25	27,39	29,62	28,42
0,15	45,79	44,89	46,74	45,81
0,2	60,71	60,97	63,13	61,60
0,25	77,94	74,34	77,41	76,56
0,5	92,12	92,82	92,64	92,53

La méthode DPPH a été utilisée pour effectuer les tests. A toutes les concentrations testées, l'extrait méthanolique des feuilles de *Combretum glutinosum* inhibe moyennement le DPPH° de manière dose-dépendante comme l'atteste la figure 17 .

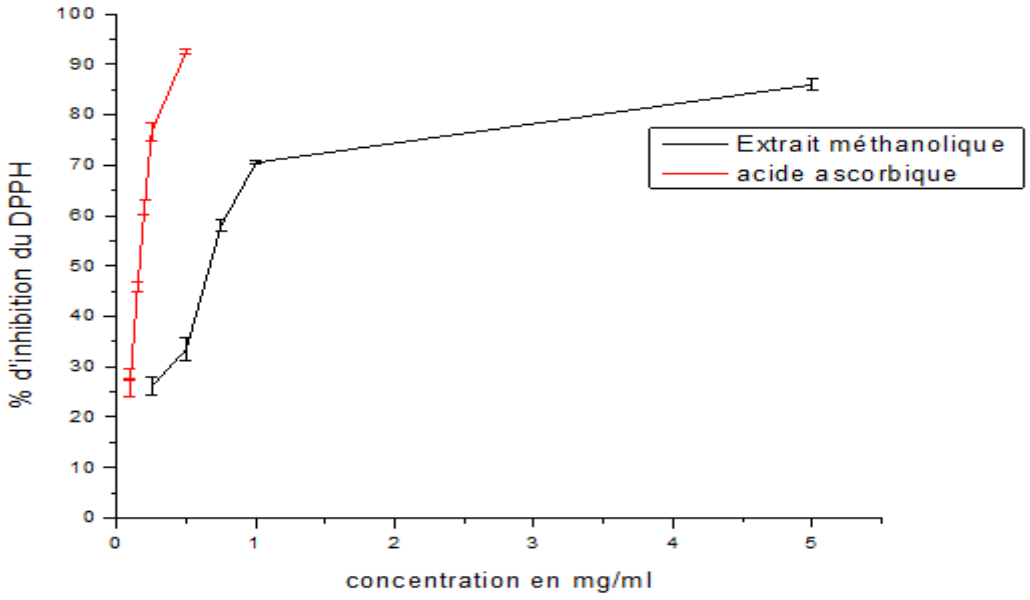


Figure 17: Action de l'acide ascorbique et de l'extrait méthanolique des feuilles de *Combretum glutinosum* sur le radical DPPH

D'après la figure précédente on peut affirmer que la CI_{50} de l'acide ascorbique est de 0,17 mg/ml alors que pour notre extrait méthanolique elle est de 0,65 mg /ml

II-1-4- Résultats dosage des composés phénoliques totaux

L'extrait méthanolique total de notre plante, après lecture au spectrophotomètre, a donné une absorbance moyenne égale à 0,233. A l'aide de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique suivante nous allons déterminer la teneur en phénols totaux exprimée en mg équivalent d'acide gallique /g de poudre de notre plante.

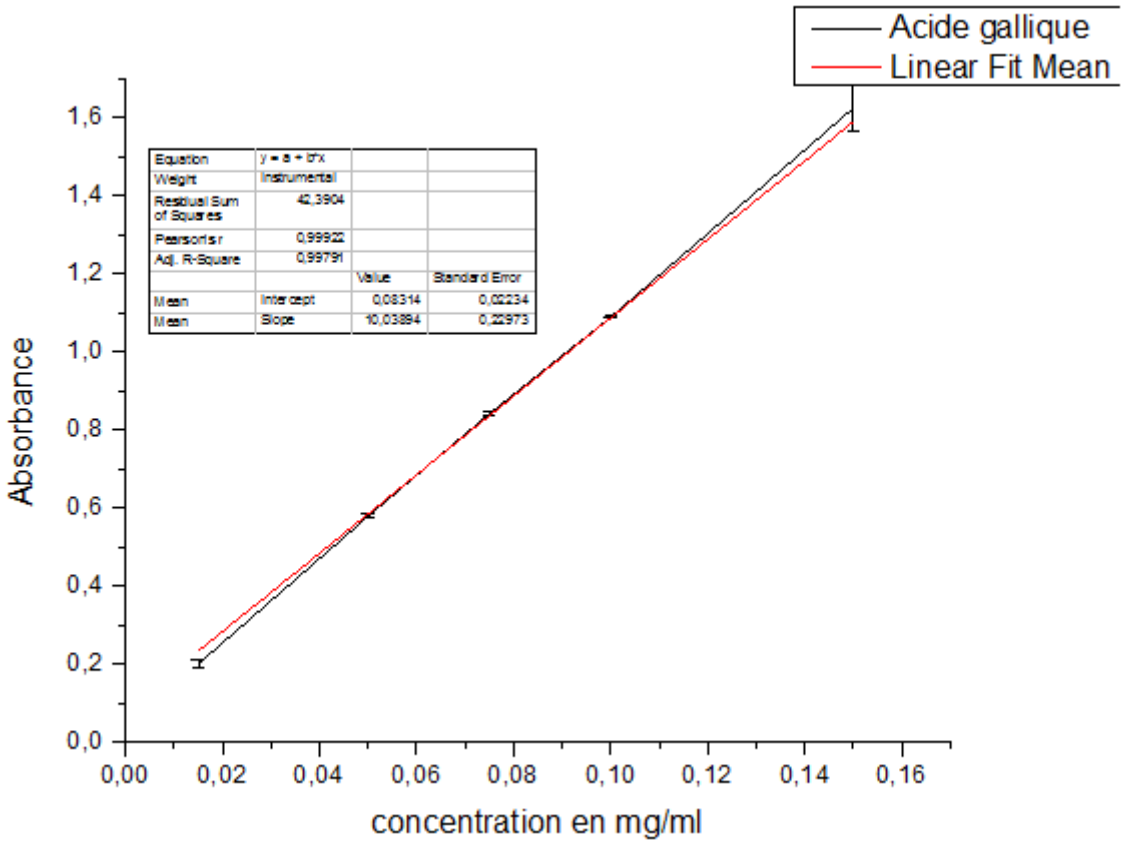


Figure 18: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Tableau VI: Tableau des différentes absorbances de l'acide gallique en fonction de la concentration

Concentrations	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Moyenne	Ecart type
0,015	0,198	0,191	0,213	0,200	0,011
0,05	0,574	0,585	0,577	0,578	0,005
0,075	0,842	0,846	0,837	0,841	0,004
0,1	1,09	1,091	1,088	1,089	0,001
0,15	1,652	1,664	1,554	1,623	0,060

La teneur en phénols totaux est calculée à partir de la formule de la droite de régression :

$$Y = ax + b$$

Y = absorbance

X = concentration en mg /ml

a = 10 ,038

b = 0,0831 (constante)

La concentration en phénols (**X**) correspondant à l'absorbance 0,233 :

X = y-b /a

X = 0,233-0,0831/10,038

X = 0,015 mg /ml

Connaissant la valeur de **X** et la concentration d'extrait méthanoliques utilisées (0,1 10^{-3} g/ml) nous pouvons calculer la teneur (T) en polyphénols totaux de l'extrait méthanolique secs des feuilles de *Combretum glutinosum*

T= 0,015/0,1.10^{-3}

T = 150 mg équivalent d'acide gallique(EAG)/g d'extrait sec

II-1-5- Résultats des tests biologiques

A partir de la formule permettant de calculer le pourcentage de drépanocytes résiduels, on a pu dresser les tableaux et graphiques suivants :

Tableau VII:Pourcentage de drépanocytes en fonction du temps à la concentration 10 mg / ml

Temps (mn)	**Témoin(%)**	**EM (%)**	**EAE (%)**	**Arg (%)**
T_0	45,58	100	100	100
T30	55,88	70,64±2,93	69,61±0,92	78,6
T60	69,11	50,03±0,72	52,89±1,03	60,86
T90	88,23	37,03±0,95	46,32±2,12	43,47
T120	100	19,42±1,75	31,18±1,06	26,08

Témoin = sang+métabisulfite ; **EM** = extrait méthanolique ; **EAE** = extrait d'acétate d'éthyle ; **Arg** = arginine

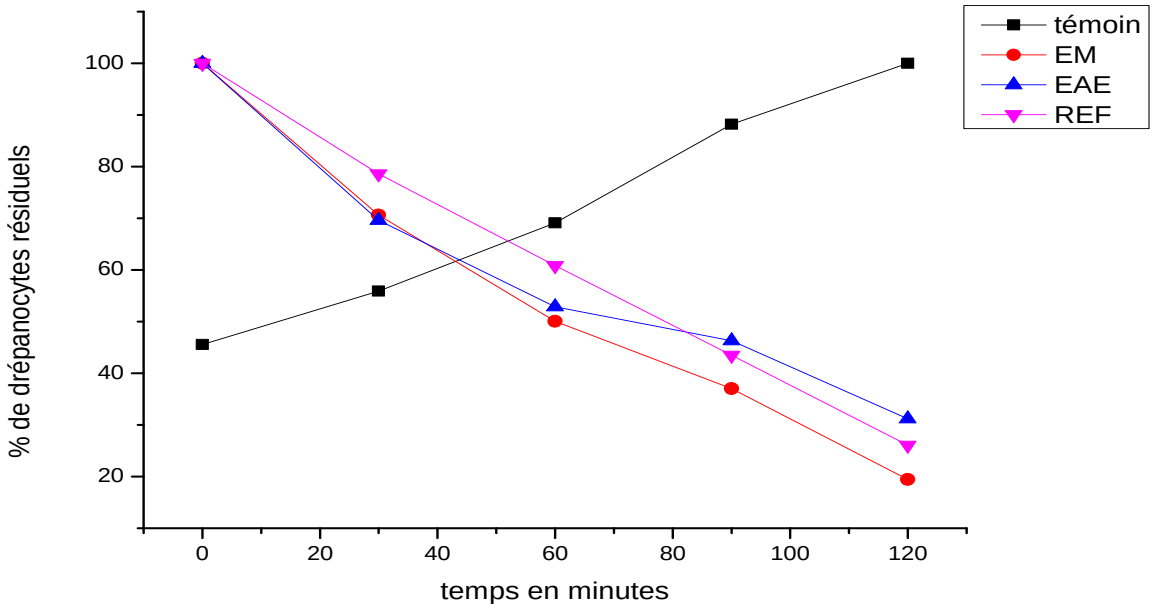


Figure 19:Evolution moyenne des drépanocytes en fonction du temps à la concentrations de 10 mg/ml

Tableau VIII: Pourcentage de drépanocytes en fonction du temps à la concentration de 5 mg/ml

Temps (mn)	**Témoin(%)**	**EM (%)**	**EAE (%)**	**Arg (%)**
T0	45,58	100	100	100
T30	55,88	58,86±2,43	62,29±0,55	59,00±0,7
T60	69,11	42,01±1,19	58,27±0,54	51,00±0,5
T90	88,23	30,06±0,92	37,34±0,54	47,00±0,9
T120	100	22,47±1,48	33,71±0,71	39,00±0,3

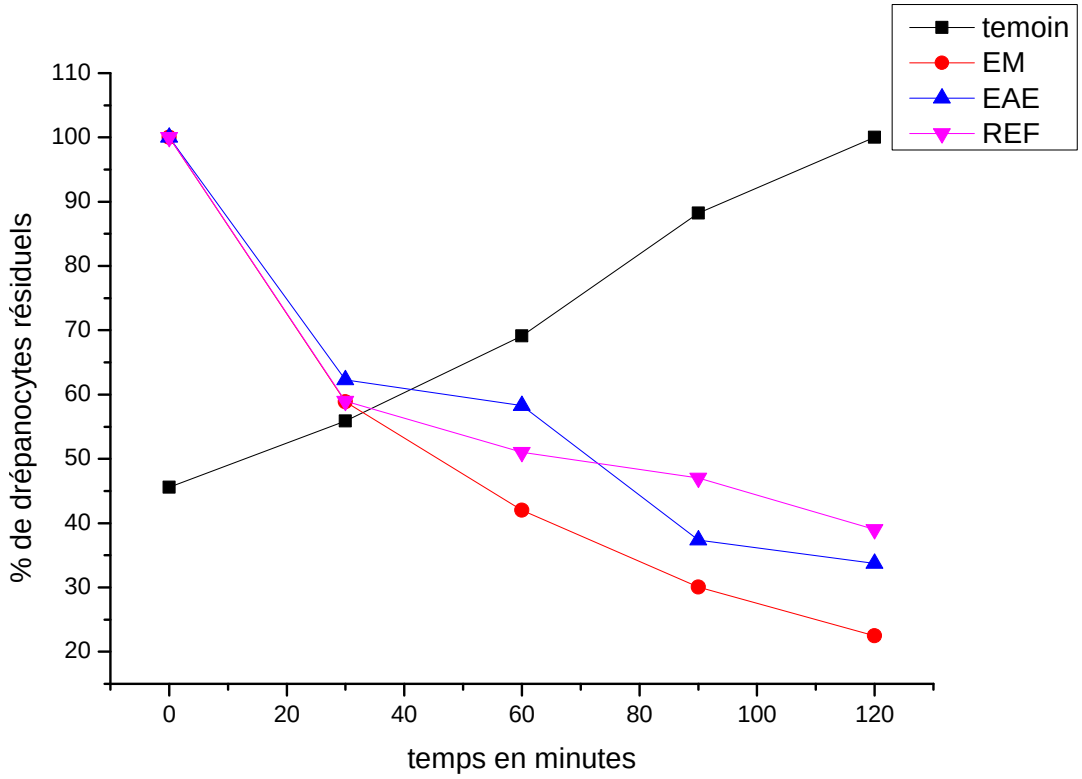


Figure 20: Evolution moyenne des drépanocytes en fonction du temps à la concentration de 5mg/ml

Tableau IX: Pourcentage de drépanocytes en fonction du temps à la concentration de 0,5 mg/ml

Temps (mn)	**Témoin**	**EM**	**EAE**	**Arg**
T0	45,31±0,60	100	100	100
T30	60,93±0,80	59,41±0,83	76±1,41	80,76±0,75
T60	76,56±0,90	50,19±4,44	54±1,41	61,53±0,85
T90	87,5±1,40	34,31±1,39	44,5±0,71	46,15±0,9
T120	100	28,03±1,94	39,5±0,71	30,76±1,4

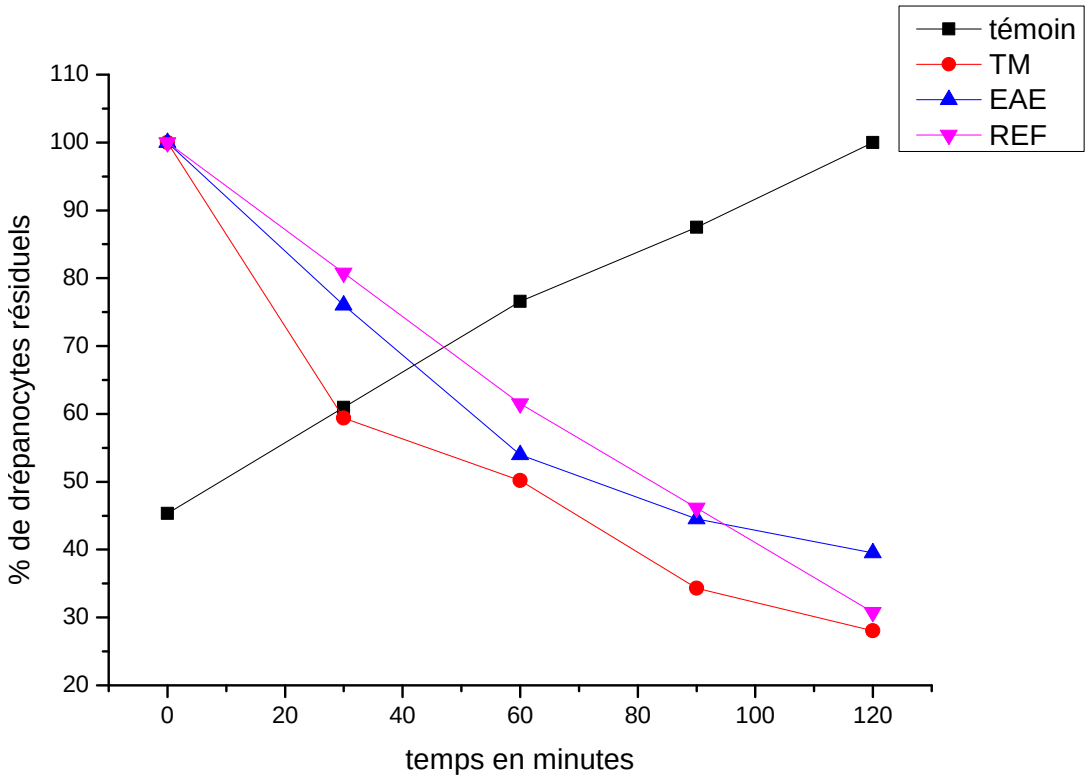


Figure 21: Evolution moyenne des drépanocytes en fonction du temps à la concentration de 0,5 mg /ml

Discussion

II-2- Discussion

- **Rendement**

l'extrait méthanolique total des feuilles de *C. glutinosum* donne un rendement égale à 7,45 % proche de celui obtenu par **Amadou [2005]** qui est de 7,69 % (rendement obtenu avec les écorces de tronc et racines de *C. glutinosum*). L'extrait d'acétate d'éthyle donne un rendement très faible (0,55) comparé à l'extrait méthanolique. Ceci s'explique par le fait que le méthanol est plus polaire que l'acétate d'éthyle et donne par conséquent un rendement d'extraction plus élevé.

- **Screening phytochimique**

Le screening phytochimique montre une forte présence de composés polyphénoliques révélés par le perchlorure ferrique ($FeCl_3$). Ces derniers sont essentiellement constitués de tanins hydrolysables (figure 14) et de flavonoïdes. En effet d'après une étude effectuée par Akino et ses collaborateurs en 1994, quatre tanins galliques ont été isolés de la plante : la combreglutinine, le 2,3-(S)-hexahydroxyphenoyl-D- glucose, la punicalline et la punicalgine. Ces composés polyphénolyques sont des substances reconnues pour leur propriété antioxydante [**Traoré**, 1999]. En plus des tanins et des flavonoïdes, des saponosides ont été également mise en évidence, cependant on note une absence d'alcaloïdes. Pour la mise en évidence des alcaloïdes on a effectués, en plus des tests chimiques, la chromatographie sur couche mince qui s'est révélé négatif. Ces résultats sont confirmés par [**Albagouri** 2014, **Yahaya** 2012] lors de leur screening phytochimique réalisés sur les feuilles de *C. glutinosum*. La seule différence est qu'ils ont révélé également la présence d'alcaloïdes. Ceci peut être expliqué par la nature différente des solvants utilisés, la période de récolte des feuilles ainsi que le type de sol ou la plante a poussée.

La caractérisation des saponosides (figure 16) donne un indice de mousse égal à 100, inférieur à celui obtenu par **Amadou en 2005** avec les écorces de tronc (143,33) et de racines (500). Ces substances, comme les tanins, sont présentes dans la plupart des espèces de *Combretum* et peuvent être responsables de l'activité antibactérienne [**Kerharo** et **Adam**, 1974 ; **McGaw et al,** 2001].

Les flavonoïdes ont été mis en évidence à l'aide de trois réactifs : alcool chlorhydrique, alcool isoamylique, et copeaux de magnésium. Ils justifient en partie l'action diurétique (Pousset, 2004).

- **Dosage des composés phénoliques totaux**

Le dosage a été effectué selon la méthode de Folin-Ciocalteu. Après lecture au spectrophotomètre de notre extrait méthanolique nous avons eu une absorbance égale à 0,233. Cette absorbance nous a permis de calculer la teneur en composés phénoliques totaux (TPT) de notre plante qui est de 150 mg EAG / g de matière sèche. Ces résultats sont meilleurs que ceux obtenus par [**Yahaya**, 2012]. En effet, il a obtenu une TPT égale à 130 mg EAG/g de matière sèche. Ces valeurs montrent une teneur élevée en composés phénoliques si l'on compare *C. glutinosum* à d'autres combretacées. En effet, d'après les études de **Kabran** en 2012, le *C. paniculatum* présente une TPT égale à 14,42 mg EAG/ g de matière sèche. Les études de **Karou** en 2006 sur le *C. micranthum* ont donné une TPT égale à 37,80 mg EAG / g de matière sèche. L'extraction par le méthanol influe également sur le rendement de l'extraction.

- **Résultats des tests biologiques**

Seuls les extraits méthanoliques (EM) et d'acétate d'éthyle (EAE) présentent une activité antifalcémiante. Les extraits dichlorométhaniques et cyclohexaniques ont donné des résultats négatifs.

- A la concentration la plus élevées (10 mg/ml), l'EM présente un pourcentage de réversibilité de la falciformation à T_{120} supérieur à 80%. Il a la plus grande activité antifalcémiante (figure 18). Ceci peut être justifié

par le fait que le méthanol est le solvant le plus polaire parmi les deux solvants utilisés et a donc un pouvoir extractible plus élevés. La référence donne un pourcentage de réversibilité à T_{120} environ égale à 75% légèrement inférieur à celui de l'EM. L'EAE est moins actif que l'EM et montre un retour de falciformation environ égale à 70%.

- A 5 mg / ml (figure 19) les pourcentages de réversibilité à T_{120} de l'EM (77%) et de l'EAE (65%) restent élevés mais diminuent par rapport aux valeurs obtenus avec les concentrations précédentes. Cependant l'EM est toujours plus actif que la référence (75%). On peut également souligner un effet dose dépendant car plus la concentration augmente plus le pourcentage de réversibilité est importante.
- A 0,5 mg /ml l'extrait méthanolique reste toujours plus actif. Dès la 30^{éme} minute on note un pourcentage de réversibilité de plus de 60% contre 25% pour l'extrait d'acétate d'éthyle et 20% pour la référence. A T_{120} l'extrait méthanolique et la référence ont presque le même pourcentage de réversibilité (environ 70%) alors que l'extrait d'acétate d'éthyle donne une réversibilité de 60%.

A toutes les concentrations nous observons que la meilleure réponse est toujours observée pour l'extrait méthanolique. Les extraits acétate d'éthyle, arginine sont les moins actifs face à la réversibilité de la falciformation. La dominance de l'activité de l'extrait méthanolique pourrait être liée à la présence de flavonoïdes qui sont de véritables antioxydants. Les flavonoïdes sont impliqués dans l'inhibition des effets délétères des espèces réactives de l'oxygène produites au cours de la drépanocytose. Dans la littérature, il a été démontré que les flavonoïdes tels que la myricétine, la quercétine et la rutine ont des effets protecteurs contre les espèces réactives de l'oxygène. De plus, les flavonoïdes améliorent la fonction endothéliale en permettant l'activation de la synthèse de l'oxyde nitrique vasorelaxant pouvant donc jouer un rôle important dans le traitement de la drépanocytose.

La vaso-relaxation entraîne une meilleure circulation sanguine, ce qui permet d'éviter la survenue de crises vaso-occlusives [**Seck**, 2015].

Une des principales caractéristiques de la drépanocytose est la production d'une grande quantité de radicaux libres conduisant à un stress oxydatif sévère et la consommation de monoxyde d'azote par les radicaux libres d'oxygène. Le stress oxydatif affecte également le rapport $Fe^{3+/}Fe^{2+}$, très élevé dans les drépanocytes et impliqué dans l'hémolyse [**Pius** 2016]. L'identification des propriétés antioxydantes d'une plante indiquerait sur son action favorable sur la prise en charge de la drépanocytose. En effet, nous avons démontré in vitro que l'extrait méthanolique de la poudre de feuilles de *Combretum glutinosum* inhibe l'activité du radical DPPH avec une CI_{50} de 0,65 contre 0,163 pour l'acide ascorbique. La teneur en composés polyphénoliques déterminée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique est de 150 mg EAG / g. Ces résultats montrent que l'extrait méthanolique agit également sur la réduction du stress oxydatif engendré par la drépanocytose.

CONCLUSION

La drépanocytose ou anémie falciforme est une maladie héréditaire récessive autosomique touchant les globules rouges. Elle induit la formation d'une hémoglobine anormale : HbS. Cette anomalie résulte d'une substitution de l'adénine par la thymine dans le codon 6 du gène de la chaîne β de la globine entraînant la substitution d'un acide glutamique par une valine dans la chaîne protéique. Cette altération de la protéine provoque une déformation du globule rouge en forme de faucille dans certaines conditions.

La drépanocytose reste la plus fréquente des hémoglobinopathies dans le monde avec environ 120 millions de personnes atteintes. En Afrique, elle est l'anomalie génétique la plus fréquente avec 10 à 40 % de porteurs de l'HbS. Au Sénégal, 1,2 million de personnes sont porteurs du gène de la maladie soit 10% de la population avec près de 1 700 naissances d'enfants présentant la forme grave de la drépanocytose c'est-à-dire la forme SS.

Cette anomalie de l'hémoglobine entraîne des crises vaso-occlusives qui se manifestent par l'anémie, la douleur, la fièvre, la jaunisse. Lorsqu'elle n'est pas prise en charge, la drépanocytose peut engendrer de nombreuses complications comme des accidents vasculaires cérébraux, des ulcères de jambes, des rétinopathies, des complications ostéoarticulaires.

Le traitement de cette pathologie est, de nos jours, essentiellement symptomatique. C'est pourquoi il faut insister sur la prophylaxie en effectuant d'abord le test prénuptial avant le mariage ou alors éviter les facteurs favorisant les crises tels que le froid, l'hypoxie, les voyages en hautes altitudes…

Combretum glutinosum est l'espèce de Combretum la plus répandue au Sénégal et la plus prescrite par les thérapeutes traditionnelles dans le traitement des affections courantes sur l'ensemble du territoire.

L'objectif général de notre travail était d'évaluer les activités antifalcémiante et antioxydante des feuilles de *Combretum glutinosum*. Pour ce faire il a fallu passer par quelques objectifs spécifiques que sont :

- La récolte, le séchage et le broyage des feuilles de *Combretum glutinosum*

- La macération de la drogue par quatre solvants de polarité décroissante (méthanol, acétate d'éthyle, dichlorométhane, cyclohexane)
- La filtration et l'évaporation des macérés afin d'obtenir les résidus secs ce qui nous a donner les rendements suivants : 7,45% pour l'extrait méthanolique (EM), 0,55% pour l'extrait d'acétate d'éthyle (EAE), 2,42% pour l'extrait dichlorométhanique (ED) et 3,15% pour l'extrait cyclohexanique
- Le screening phytochimique qui a permis de caractériser plusieurs groupes chimiques à savoir :
  - Les composés phénoliques
  - Les tanins
  - Les flavonoïdes
  - Les saponosides

- L'étude de l'activité antioxydante qui a abouti à la détermination de la CI_{50} de l'extrait méthanolique des feuilles de notre plante (0,65mg/ml)
- Le dosage des composés phénoliques totaux qui a donner une teneur T = 150 mg équivalent d'acide gallique (EAG)/g d'extrait sec. Ceci est une valeur élevée comparée à d'autres espèces de Combretum telles que *C. micranthum* et *C. punicalatum* d'après des études faites sur ces plantes.
- Enfin les tests sur l'activité antifalcémiante :

  Seuls les extraits méthanolique et d'acétate d'éthyle présentent une activité antifalcémiante. En effet le méthanol et l'acétate d'éthyle sont des solvants très polaires et possèdent un pouvoir extractibles élevé.

  A toutes les concentrations testées, l'extrait méthanolique donne les pourcentages de réversibilité des drépanocytes les plus élevés à T_{120}.Ceci s'explique par la présence dans cet extrait de quantité importante de flavonoïdes qui sont de véritables antioxydants et qui améliorent également la fonction endothéliale en permettant l'activation de la

synthèse de l'oxyde nitrique, vasorelaxant pouvant donc jouer un rôle important dans le traitement de la drépanocytose. En effet la vaso-relaxation entraîne une meilleure circulation sanguine, ce qui permet d'éviter la survenue de crises vaso-occlusives.

- A 10mg/ml on note, pour l'extrait méthanolique, un pourcentage de réversibilité des drépanocytes environ égale à 80% contre 70% pour l'acétate d'éthyle
- A 5mg/ml l'extrait méthanolique provoque un retour de falciformation de 78% des drépanocytes contre 67% pour l'extrait d'acétate d'éthyle.
- A 0,5mg/ml 72% de drépanocytes retrouve leur forme normale à T_{120} contre 61% pour l'acétate d'éthyle.

D'après ces données on observe un effet dose-dépendant peu significatif, néanmoins l'activité antifalcémiante reste élevé pour toutes les concentrations testées. On peut donc dire que les extraits méthanoliques et d'acétate d'éthyle possèdent un fort pouvoir antifalcémiant. La comparaison de l'activité de la référence utilisée (Arginine) avec celle de nos extraits a révélé que ces dernièrs étaient généralement plus actives.

Ces travaux constituent un premier pas fructueux dans l'étude des activités antifalcémiante et antioxydante des feuilles de *Combretum glutinosum.* Ils doivent être poussés afin de détecter les groupements chimiques impliqués dans la réversibilité des drépanocytes et élucider leurs mécanismes d'action. L'étude toxicologique des extraits doit être également menée.

Tous ces travaux pourront aboutir à la mise en place d'un phytomédicament à partir de *Combretum glutinosum* seul ou en association avec d'autres plantes aussi utilisées dans les crises vaso-occlusives, à l'image du Faca au Burkina Faso et du Niprissan au Nigeria.

REFERENCES

Akino J., Pousset J. L., Bodo B. (**1994**).
Combreglutinin, a hydrolysable tannin from Combretum glutinosum. Journal of Natural Products. Vol 57, N° 6, pp 732 – 737

Albagouri AH, ElegamiA A, Koko WS, Osman EE, Dahab MM. **(2014)**
In Vitro Anticercarial Activities of some Sudanese Medicinal Plants of the Family Combretaceae. Journal of Forest products & Industries; 3(2), 93-99.

Anoosha Habibi, Dora Bachir, Bertrand Godeau (2004)
Complications aiguës de la drépanocytose La revue du praticien : 54 page 1552

Balédent F.(2006)
Génétique et diagnostic biologique de la drépanocytose. Développement et santé, 182: p 4-13

Ballas S.K., Marcolina M.J. (2006)
Hyperhemolysis during the evolution of uncomplicated acute painful episodes in patients with sickle cell anemia. Transfusion; 46: p 105-110

Basset P., Beuzard Y., Garel M; C., Rosa J.(1978)
The isoelectric focusing of human haemoglobins and its application to screening to the characterization of seventy variants , and to the study of modified fractions of normal haemoglobins . Blood 51 : 971-982

Belcher J. D., Beckman J. D., Balla G., Balla J., Vercellotti, G. (2010). Heme degradation and vascular injury.Antioxid. Redox Signal 12, 233–248.

Benkerrou M., Vilmer E., Elion J.(2003)
L'anémie chez l'enfant drépanocytaire. John Libbey Eurotext, 2; 97-104

Bernard J.; Levy J-P. ; Varet B.; Clauvel J-P.; Rain J-D.; Sultan Y. (1998)
Hématologie. Ed Masson,**.** ; 9éme édition.

Bernaudin F., Pradère I., Taïeb O., Abbal T., Champion M., Dutray B.N'gaba D., Coïc L., Bonnet D., Moro M.R. (2004)
Perspectives thérapeutiques, cliniques et psychologiques dans les formes sévères de drépanocytose. Editions Karthala; 293-306

Beyeme Owono M, Chiabi A.(2004)
Epidémiologie de la drépanocytose. Clinics in Mother and Child Health. : P6-8.

Bourrée P., Ensaf A. (2012)
La drépanocytose en France : des données épidémiologiques pour améliorer la prise en charge. Bulletin de l'épidémiologie hebdomadaire 27-28:311-29.

Cartron J.P., Elion J.(2008)
Elytroid adhesion molecules in sickle cell disease: effect of hydroxyurea Transfus. Clin. Biol; 15 : 39-50

Claster S, Vichinsky EP. (**2003)**
Managing sickle cell disease, BMJ.; 327:11515.

Creté P. (1965).
Précis de botanique. Systématique des angiospermes. Tome II, Ed 2 révisée,Faculté de pharmacie, Paris Masson, 429 p

DE MONTALEMBERT M.(2004)
Options thérapeutiques dans la drépanocytose La revue du praticien; 54: 1557-1567

Deme Ly I. (2007)
HLA-E et susceptibilité aux infections bactériennes sévères chez les enfants et adolescents drépanocytaires homozygotes sénégalais. Thèse de doctorat de médecine : Dakar : ; n°135

Derlin Glawdis Ndong ALLOGO, **(2012)**
La drépanocytose à l'officine : dispensation du SIKLOS® et éducation thérapeutique, thèse page : 30-32
Disponible à l'adresse : www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/Drepanocytose-FRfrPub125v01.pdf

Eaton W.A., Hofrichter J.(1987)
Hemoglobin S gelation and sickle cell disease. Blood**;** 70: 1245-1266

Ekoumou C. (2003) : Etudes phytochimiques et pharmacologiques de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse Doct. Pharm., Bamako, 145 p.

Emmel VE. (**1917)**
A study of erythrocytes in a case of severe anemia with elongated and sickle-shaped red blood corpuscles .Arch Internal Medicine; 20:586

Encyclopédie Orphanet Grand Public, (**2011)**
La drépanocytose, Mars **2011**, page 4.

Enda Tiers monde (2003).
Reconnaissez, protégez et utilisez les plantes sûres et efficaces : www.enda.sn/plantesmed/combretum.html

Fowler J.J., Koshy M., Strub M., Chin S.K. (1991)
Priapism associated with the sickle cell hemoglobinopathies: prevalence, natural history and sequelea. J Urol; 145: 65-68.

Gbadoé A.D., Diagne I., Ilboudo A., Diop S., Géraldo A., Guédénon
Girot R., Begue P., Galacteros F. (**2003)**
La drépanocytose Editions John Libbey eurotext, Paris**.**

Girot R.,De Montalembert M.
Les syndromes thalassémiques et les syndromes drépanocytaires.

Gladwin MT (**2008)**
Current and Future therapies of Sickle Cell Anemia: Historical Perspective hematology

Habibi A., Bachir D., Godeau B.(2004)
Complications aigues de la drépanocytose La revue du praticien, ; 54 : 1548-1556

Hazoumé F.A (1984)
Traitement préventif général et surveillance de la drépanocytose en zone tropical in La maladie drépanocytaire.Edition Sandoz**,** Recueil Malmaison ; p 264-269.

Hebbel RP, Yamada O, Moldow CF, Jacob HS, White JG, Eaton JW.(1980)
Abnormal adherence of Sickle Erythrocytes to cultured vascular endothelium: possible mechanism for microvascular occlusion in sickle cell disease . J Clin Invest .**;** 65:156.

Hernigou P. (2003)
Complications ostéo-articulaires dans la drépanocytose chez l'adulte. La drépanocytose John Libbey Eurotext, ; 171-175.

Herrick JB.(1910)
Peculiar elongated sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. Arch Internal Medicine (USA); 6: 517.

Ingram, V.M. (**1956)**
A Specific Chemical Difference between Globins of Normal and Sicklecell Anemia Hemoglobins. Nature 178: 792-794.

J Makani, S. F.Ofori-acquah, O. Nnodu, A. Wonkam, and K. Ohene-frempong (2013)
Sickle cell disease: New Opportunities and challenges in Africa, the scientific world journal, article 193252; page 3

J., Akpako P. (2007)
Priapisme chez le drépanocytaire sénégalais: prévalence, attitudes et Connaissances. Bull Soc Patho Exot; 100(3): 179-181.

James Neel. (**1949)**
The inheritance of sickle cell anemia, Science, vol.110, Page 543-548.

Karlin L., Coman T. (2009)
Hématologie. Ed Elsevier Masson ; p 168-169-170

Keita R. M. (2002).
Etude de l'activité antifongique et antibactérienne de 14 plantes utilisées dans le traitement des I.S.T. Thèse de pharmacie, Bamako, 130p

Kerharo J. et Adam J. G. (1974).
La pharmacopée sénégalaise traditionnelle : plantes médicinales et toxiques. Ed. Vigot Frère, Paris, 1011 p, pp 343-345
La drépanocytose John Libbey Eurotext, **2003** ; 205-210

Labie D., Elion J.(2003)
Génétique et physiopathologie de la drépanocytose. John Libbey.; 1-11.

Lionnet F., Stankovic K., Girot R. (2009)
Drépanocytose de l'adulte. Hématologie, EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), 13-006-D**.**

Malgras D.(1992).
Arbres et arbustes guérisseurs des savanes maliennes. Ed. Karthala et ACCT, 478 p, pp 128-129.

Maydell Von H. J.(1980).
Arbres et arbustes du Sahel : leurs caractéristiques et usages. Ed. GTZ nº 147, pp 212-213.

Mc Gaw L. J., Rabe T., Sparg S. G., Jäger A. K., Eloff. J. N., Van Staden J. (2001).
Aninvestigation on the biological activity of Combretum species. Journal of ethnopharmacology 75, pp 45 – 50.

Nat Genet.(2010)
Sep;42(9):742-4. Nat Genet. 2010 Sep;42(9):801-5.
http://www.drepavie.org/drepanocytose_recherche.htm consulté le 20/06/2016

Neel JV.(1949)
The inheritance of Sickle Cell Anemia .Science.; 110:64.

Odievre M-H, Benkerrou M., Belloy M., ELION J. (2008)
Hydroxurea treatment in sickle cell children Pediatric and perinatal drug therapy**;** 8 (4) : 158-170.

Ohene-Frempong K, Weiner SJ,Sleeper LA et al.(1998)
Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. Blood; 91 :288-94.

OMS (2006)
Drépanocytose : 59ème assemblée mondiale de la santé - point 11.4 de l'ordre du jour provisoire, WHA59.20 Disponible à l'adresse URL : http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf files/WHA59/A59 R20-fr.pclf Consulté le 18/04/2016.

Pauling L, Itano HA , Singer Sj , Wells IC. (1949)
Sickle Cell Anemia, a molecular disease. Sience ; 110:543.

Pelosse B.
Manifestations ophtalmologiques au cours de la drépanocytose.

Pius DT TM, Kato te NN, Sha Tshibey(2016)
Les alicaments et la drépanocytose: une mini-revue. Compte rendu chimie. 2016 ; 19. 884-889.

Platt O.S., Thorington B.D., Brambilla D.J., Milner P.F., Rosse W.F., Pousset J. L. (2004)
Plantes médicinales d'Afrique. Comment les reconnaître et les utiliser? Edisud, Aix-en-Provence, 287p.

Pincemail J., Lecomte J., Collart E., Castiaux J. P.
(2001) : Stress oxydant, antioxydants et exercice physique. Vaisseaux, Cœur, Poumons, 6(5) : 1 - 3.

RAS-Recommandation pour la pratique clinique (2005)
Prise en charge de la drépanocytose chez l'enfant et l'adolescent.

Seynabou T. M, (**2012)**
Enquête ethnobotanique sur la prise en charge de la drépanocytose à Dakar et à Fatick, thèse pharmacie numéro 76, page 15.

Siguret V., Andreux J.P. (1997)
Diagnostic biologique des hémoglobinopathies par analyse du phénotype.Annale de biologie clinique Vol 55, n°2, 103-12, Mars-Avril**.**

Structure des protéines : http://pages.usherbrooke.ca/bcm-514-bl/2d.html
Stryer L.(**2003**)
Biochimie, 5ieme éd. Paris, Flammarion Médecine-sciences ,**.**

Stuart M. J., Nagel R. L.(2004). Sickle-cell disease. Lancet 364,1343–1360.
Sy S.,Le stress oxydatif est responsable des risques cardiovasculaires. Société, 2004, vol 41.

Tarselli,**(2011)**
M. A. et al. Nature Chem. 3, 449–453
http://www.drepavie.org/drepanocytose_recherche.htm consulté le 20/06/2016.

Tshilolo L. (2006)
Les complications habituelles de la drépanocytose chez l'enfant en Afrique. Développement et santé; 182 : 13-20.

Vichinsky E.P.(**1991)**
Pain in sickle cell disease. Rates and risk factor. J Med; 325:11-16.

Wajcman H. (2004)
Diagnostic et dépistage de la drépanocytose. Rev Prat ; 54(5) :1543-1547.

Zouibaa Romayssae, (2015)
Contribution à l'étude de l'activité antidrépanocytaire de l'extrait butanoliques des racines de *Leptadenia hastata,* thèse pharmacie ; numéro 54.

Blois, **1958.**
Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil.Elsevier, Food ChemistryVolume 85, Issue 4, Pages 633-640.

Gaba J., Olschwang D., Giono – Barber H., Pousset J. L. **(1980).** Plantes médicinalesafricaines III. Etude de l'action antitussive de Combretum glutinosum Perr. Annalespharmaceutiques françaises, Vol. 38, N° 6, pp 529 – 536.

Saikat Sen, Biplab De, N Devanna, Raja Chakraborty. (2013)
Total phenolic, total flavonoid content, and antioxidant capacity of the leaves of *Meyna spinosa* Roxb., an Indian medicinal plant. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 11(2): 0149−0157 (reference dosage)

SOUBEIGA Freddy Yannick Wennonga, **(2013)**

MORBIDITE ASSOCIEE AU PORTAGE DU TRAIT DREPANOCYTAIRE, thèse pharmacie 2013 numero 157

Yahaya O, YabefaJA and Usman B. **(2012)**
Phytochemical Screening and Antibacterial Activity of Combretum glutinosum extracts against Some Human Pathogens. British Journal of Pharmacology and Toxicology; 3(5): 233-236.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes Condisciples.

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la Santé Publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

PERMIS D'IMPRIMER

Vu :

Le président du jury

Vu :

Le Doyen……

Vu et Permis d'imprimer

Pour le recteur, le Président de l'assemblée d'Université Cheikh Anta Diop de Dakar et par délégation

Le Doyen