

EFFET DE *MORINDA LUCIDA BENTH.* (RUBIACEAE) ET DE *NEWBOULDIA LEAVIS P. BEAUV.* (BIGNONIACEAE) SUR LA FALCIFORMATION

Joppa KM¹, Vovor A², Eklou-Gadegbeku K¹, Agbonon A¹, Aklikokou K¹, Gbeassor M¹

1 - Centre de Recherche et de Formation sur les Plantes Médicinales (CERFOPLAM), Département de Physiologie Animale, Faculté des Sciences, Université de Lomé, BP 1515, Lomé, Togo.

2 - Service d'Hématologie du Centre Hospitalier Universitaire de Lomé-Tokoin.

Med Trop 2008 ; 68 : 251-256

RÉSUMÉ • Ce travail a été réalisé dans le but d'évaluer l'activité inhibitrice de falciformation *in vitro* des extraits de deux plantes couramment utilisées dans le traitement de la drépanocytose au Togo : *Morinda lucida* et *Newbouldia leavis*. Lorsque les hématies sont incubées en présence des extraits végétaux et du métabisulfite de sodium à 2 %, on note une diminution concentration-dépendante du taux de falciformation par rapport au sang témoin qui a été incubé en présence de NaCl à 0,9 % à la place des extraits. *Morinda* a montré un taux d'inhibition de 17,30 % à la concentration de 1 mg/ml et de 92,31 % à la concentration de 30 mg/ml sur le sang SS. Sur le sang AS, à la concentration de 1 mg/ml de cet extrait, l'inhibition est de 48,10 % et 99,34 % pour 30 mg/ml. Avec *N. leavis* on a obtenu une inhibition de 15,66 % à 1 mg/ml et 90,42 % à 30 mg/ml sur le sang SS. Sur le sang AS cette inhibition est de 64,03 % pour 1 mg/ml et 99,02 % pour 30 mg/ml. Ce protocole semble approprié pour travailler aussi bien avec le sang AS qu'avec le sang SS car les effets comparés de chacun des extraits sur la falciformation du sang AS et SS ont donné un coefficient de corrélation de Pearson qui est de 0,92 pour *Newbouldia* et de 0,89 pour *Morinda*. Nos résultats montrent que ces deux plantes ont un effet anti-falciformant évident *in vitro* et soutiennent l'intérêt de leur usage en médecine traditionnelle.

MOTS-CLÉS • Drépanocytose - Falciformation - *Morinda lucida* - *Newbouldia leavis*.

.....
EFFECT OF MORINDA LUCIDA BENTH. (RUBIACEAE) AND NEWBOULDIA LEAVIS P. BEAUV. (BIGNONIACEAE) ON SICKLING OF RED BLOOD CELLS

ABSTRACT • The purpose of this study was to evaluate the *In vitro* anti-sickling activity of two plants widely used for treatment of sickle cell disease in Togo, i.e., *Morinda lucida* et *Newbouldia leavis*. A concentration-dependent decrease in the rate of sickling was observed after incubation of red blood cells with plant extracts and 2% sodium metabisulfite as compared to incubation with 0.9% NaCl. On samples with a SS blood genotype the inhibition rate of *Morinda lucida* was 17.30% at a concentration of 1 mg/ml and 92.31% at a concentration of 30 mg/ml. On samples with an AS blood genotype, the inhibition rate of *Morinda lucida* 48.10% at a concentration of 1 mg/ml and 99.34% at a concentration of 30 mg/ml. Using *Newbouldia leavis* the inhibition rates at concentrations of 1 mg/ml and 30 mg/ml were 15.66% and 90.42% respectively on samples with a SS blood genotype and 64.03% and 99.02% respectively on samples with an AS blood genotype. The study protocol appeared to be adequate for both SS and AS blood genotypes since the Pearson correlation coefficient between rates measured on the two types of samples was 0.92 for *Newbouldia* and 0.89 for *Morinda*. These findings show that these two plants have clear-cut *in vitro* anti-sickling activity and support their use in traditional medicine.

KEY WORDS • Sickle cell disease – Sickling - *Morinda lucida* - *Newbouldia leavis*.

La drépanocytose encore appelée anémie falciforme est une hémoglobinopathie héréditaire due à une mutation ponctuelle. Cette mutation du gène de l'hémoglobine conduit à une hémoglobine anormale appelée hémoglobine S qui présente de nouvelles propriétés : l'instabilité mécanique, la diminution de solubilité et la polymérisation (1). Ces der-

nières sont à la base de l'état pathologique de la drépanocytose qui se manifeste chez l'individu homozygote. Cet état pathologique est caractérisé par une déformation des hématies en forme de faucille qui a pour conséquence une anémie hémolytique et la vaso-occlusion, à l'origine des principales causes de décès des drépanocytaires (2, 3).

La prévalence est de 2 % en moyenne sur le continent africain (2, 4, 5, 6) avec une espérance de vie inférieure à 20 ans contre 0,02 % en moyenne sur les autres continents (7). En Afrique moins de 50 % des drépanocytaires homozygotes atteignent l'âge de 5 ans et moins de 18 % arrivent à l'âge adulte (2). Malgré cette épidémiologie et mortalité inquié-

• Correspondance : gbeassor@tg.refer.org

• Article reçu le 02/02/2007, définitivement accepté le 20/05/2008.



Figure 1. Photo des organes aériens de *N. leavis*.

tante, rares sont les produits anti-drépanocytaires qui sont sur le marché.

Par ailleurs, l'incidence économique de la drépanocytose est de grande importance dans les pays en développement. Au Bénin, Zohoun *et al.* (8) ont évalué le traitement par an des drépanocytaires à trois fois le budget de la santé soit le dixième du budget national. Guissou *et al.* (10) ont rapporté que le coût moyen du traitement d'une crise drépanocytaire de six jours est évalué à 60 000 F CFA au Burkina. Cette incidence économique, associée à la forte prévalence de la drépanocytose, amène à dire que la drépanocytose constitue un problème de santé publique (8).

Ce coût de traitement est hors de portée des populations de l'Afrique subsaharienne où l'utilisation des plantes



Figure 2. Photo des organes aériens de *M. lucida*.

médicinales fait partie de la culture et de la tradition. Elles recourent très souvent aux plantes médicinales dans le traitement des crises drépanocytaires.

Afin de contribuer au screening des propriétés anti-drépanocytaires des plantes utilisées dans le traitement de la drépanocytose, ce travail a été réalisé dans le but d'évaluer l'activité inhibitrice de falciformation *in vitro* des extraits semi-éthanoliques de deux plantes couramment utilisées dans le traitement de la drépanocytose au Togo : *Newbouldia leavis* P. Beauv. (Bignoniaceae, Scrophulariales, Fig. 1) et *Morinda lucida* Benth. (Rubiaceae, Rubiales, Fig. 2) (10). Le décocté des feuilles de *M. lucida* est pris à satiété pour traiter les crises drépanocytaires tandis que la poudre de l'écorce des racines de *N. leavis* est utilisée en association avec l'écorce des racines de *Zanthoxylum macrophylla* en traitement préventif.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le matériel biologique

Le matériel végétal est constitué des écorces de racine de *N. leavis* (Fig. 1) récoltées le 06 août 2005 à Démé, localité située environ à 160 km de Lomé et des feuilles de *M. lucida* (Fig. 2) récoltées en novembre 2005 dans l'enceinte de l'Université de Lomé. Elles sont séchées sous climatisation et réduite en poudre. Pour chaque plante, la poudre obtenue est macérée dans un mélange éthanol-eau à 50% (V/V) pendant 72 heures sous agitation manuelle toutes les 6 heures (200 g/2 litres pour *M. lucida* et 100 g/1,5 litre pour *N. leavis*). Les filtrats sont évaporés sous vide dans un bain de 45°C à l'aide du rotavapor R114.

L'extraction de *M. lucida* a donné une poudre brune avec un rendement de 20,03%. Celle de *N. leavis* est une poudre vert-foncée avec un rendement de 30,2%.

Rendement = (Masse de l'extrait / Masse de plante sèche) X 100

Le matériel animal est constitué de rats Wistar de poids compris entre 90 g et 100 g. Ces rats sont élevés dans les conditions standard à l'animalerie du département de Physiologie Animale de l'Université de Lomé.

Les échantillons de sang des génotypes AS et SS sont prélevés sur des personnes consentantes dans des tubes EDTA et sont utilisés à l'état frais.

Produits chimiques

Pour l'induction de la falciformation nous avons utilisé le métabisulfite de sodium (Na₂S₂O₅). La molécule de référence inhibitrice de la falciformation, l'HYDREA®, fabriqué par Bristol-Myers Squibb a été fournie par une pharmacie de la place.

Pour la préparation des solutions d'extrait végétal aux différentes concentrations, nous avons utilisé une solution de NaCl à 0,9%.

Induction de la falciformation

Nous avons mélangé dans un microtube, 50 µl de sang et 50 µl de solution de métabisulfite de sodium à 2 %. Après avoir homogénéisé le mélange, on monte une goutte de la préparation entre lame et lamelle et on fait la lecture sous microscope à intervalle de temps régulier pendant 48 heures. Afin d'éviter la dessiccation des lames, elles sont incubées dans une boîte de pétri dont le fond est garni de papier filtre imbibé d'eau.

Etude de l'effet des extraits végétaux sur la falciformation

La préparation incubée entre lame et lamelle est prélevée du mélange constitué de 50 µl de sang, de 50 µl de solution de métabisulfite de sodium à 2 % et de 50 µl de la solution d'extrait végétal aux différentes concentrations (1, 5, 15, 20, 25, 30, 50, 100 mg d'extrait végétal par ml de sang). Pour les témoins, la solution de NaCl à 0,9 % est utilisée à la place des solutions d'extrait végétal. On effectue la lecture après 4 heures d'incubation pour le sang SS et après 24 heures pour le sang AS.

Etude de toxicité limite

Pour une étude toxicologique des deux extraits, le test de toxicité limite est effectué sur les extraits. Ce test a porté sur trois lots de 4 rats (2 mâles et 2 femelles). On a un lot témoin dans lequel les animaux ont reçu de l'eau distillée à la dose de 5 ml/kg. Le deuxième lot et le troisième lot ont respectivement reçu les extraits semi-éthanoliques de *M. lucida* et de *N. leavis* à la dose de 5 g/kg. L'administration des extraits a été faite par voie orale. Les rats sont mis en observation pendant 7 jours au cours desquels ils ont accès libre à l'eau et à la nourriture.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Induction de la falciformation

Le métabisulfite de sodium à 2 % additionné au sang à volume égal a induit la falciformation des hématies. Le pourcentage de cette falciformation est fonction du temps (Fig. 3).

Pour les hématies SS, le taux de falciformation est maximal (96,5 %) au bout de 3 heures. Ce taux atteint une valeur maximale de 34,39 % à partir de la 24^e heure pour les hématies AS.

Avec le métabisulfite de sodium à 2 %, nous avons induit la falciformation des hématies des génotypes AS et SS. Cette falciformation est temps dépendant.

Le taux de falciformation de 83 % des hématies SS au bout d'une heure est corroboré par les travaux de Elekwa et

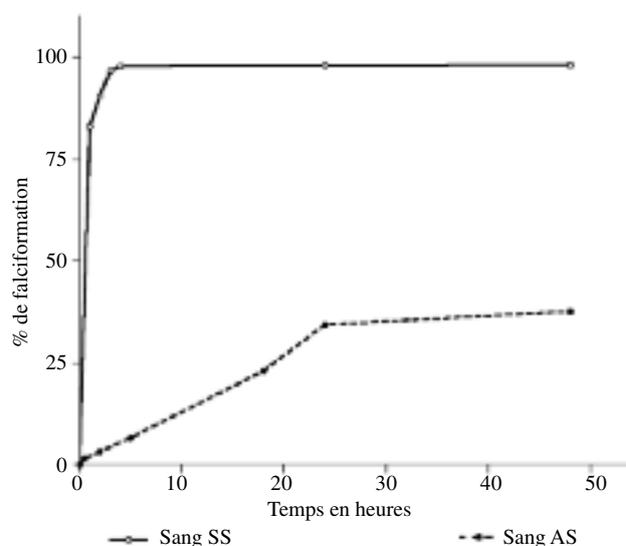


Figure 3. Pourcentage de falciformation en fonction du temps et du génotype drépanocyttaire. Le sang total AS et SS sont incubés entre lame et lamelle en présence du métabisulfite de sodium à 2 % à volume égal (50 µl) pendant 48 heures. On dénombre à intervalle de temps donné, sous microscope, les drépanocytes et les hématies normales.

al. (11) qui ont obtenu 80 % de falciformation après une heure d'incubation dans les mêmes conditions expérimentales.

Par ailleurs, l'étude de la falciformation dans le temps a montré qu'elle n'est pas un phénomène instantané (Fig. 4). Elle se déroule dans le temps et sa cinétique est fonction du génotype drépanocyttaire (5).

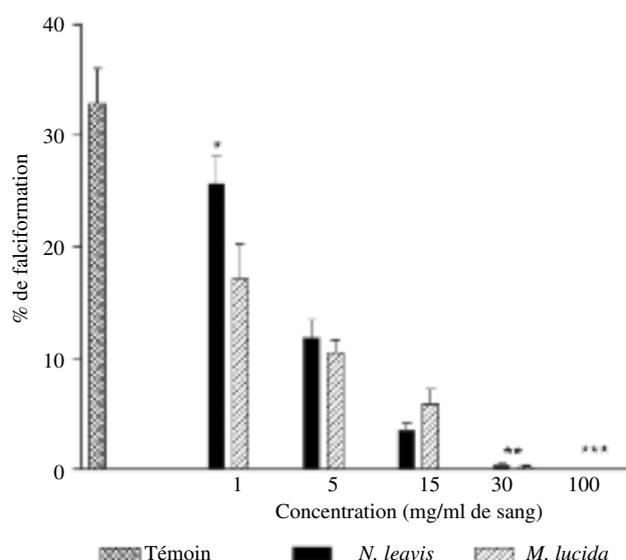


Figure 4. Pourcentage de falciformation des hématies AS en présence et en absence des extraits semi-éthanoliques de *M. lucida* et de *N. leavis*. Le sang total AS est incubé entre lame et lamelle en présence du métabisulfite de sodium à 2 % à volume égal (50 µl) et d'extrait de *M. lucida* ou de *N. leavis* aux différentes concentrations pendant 24 heures. La diminution du taux de falciformation est significative pour toutes les concentrations ($p < 0,002$; $**p < 0,001$) sauf pour celle de 1 mg/ml de *N. leavis* ($*p > 0,05$). A 100 mg/ml le taux de falciformation est nul pour les deux extraits.

Génotypes	Concentrations (mg/ml)	<i>M. lucida</i>	<i>N. leavis</i>
SS	1	17,30	9,26
	15	86,19	82,32
	20	90,11	88,78
	30	92,31	90,42
	50	92,52	91,17
	100	92,84	91,56
AS	1	48,10	21,99
	15	82,16	89,42
	20	92,74	95,00
	30	99,33	99,02
	50	99,39	99,44
	100	100	100

Tableau I. Pourcentage d'inhibition induite par les extraits semi-éthanoliques de *M. lucida* et de *N. leavis* sur la falciformation des hématies de génotypes AS et SS.

En effet, la polymérisation qui conduit à la falciformation est précédée de l'étape de nucléation qui consiste à la formation des noyaux de polymérisation. Cette phase de nucléation correspond au «delay time» qui peut aller de quelques millisecondes (5) à plusieurs jours (12-14) en fonction du pourcentage de l'HbS (5) et de l'âge des hématies (12). Ceci explique l'augmentation du taux de la falciformation dans le temps. La différence de la cinétique de falciformation obtenue avec les différents génotypes est due à la variation de la concentration de l'HbS dans les hématies AS et SS.

Effet des extraits végétaux sur la falciformation des hématies SS

Les deux extraits ont réduit de façon significative la falciformation des hématies SS (Fig. 5).

Les extraits semi-éthanoliques des plantes étudiées, inhibent fortement la falciformation des hématies SS induite par le métabisulfite de sodium (Tableau I). Les CI₅₀ sont : 2,2 mg/ml pour *M. lucida* et 8,9 mg/ml pour *N. leavis*. Ces résultats sont très significatifs au vu de ceux obtenus par d'autres auteurs. En effet, Ohnishi *et al.* (14) ont obtenu avec 6 mg/ml d'*Alium sativum* une inhibition de 30%

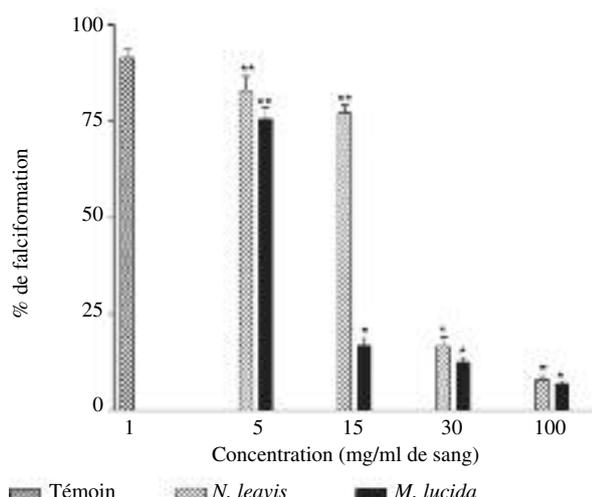


Figure 5. Pourcentage de falciformation des hématies SS en présence et en absence des extraits semi-éthanoliques de *M. lucida* et de *N. leavis*. Le sang total SS est incubé entre lame et lamelle en présence du métabisulfite de sodium à 2% à volume égal et d'extrait de *M. lucida* et *N. leavis* à différentes concentrations pendant 3h. La réduction de la falciformation des hématies SS est significative pour toutes les concentrations des deux extraits (** $p < 0,05$; * $p < 0,001$).

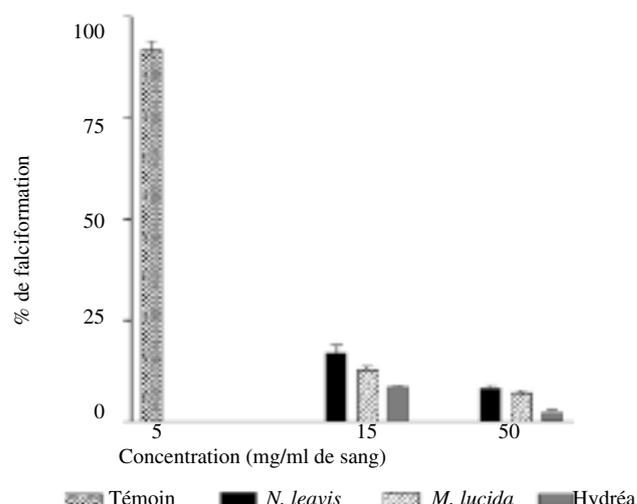


Figure 6. Effets comparés des extraits végétaux et de l'HYDREA® sur la falciformation des hématies SS. Le sang total SS est incubé en présence de solutions d'HYDREA®, d'extrait semi-éthanolique de *M. lucida* à différentes concentrations et de métabisulfite de sodium à 2% pendant 3 heures entre lame et lamelle. $p < 0,001$ pour les concentrations de 15, 30 et 50 mg/ml des trois produits testés. Le pourcentage d'inhibition de 90% est obtenu aux concentrations de 15 mg/ml de l'HYDREA®, 20 mg/ml de *M. lucida* et 30 mg/ml *N. leavis*.

de la formation de «dense cells» induite avec l'urée à 500 mM ; Jawad *et al.* (15) avec les inhibiteurs calciques ont obtenu des inhibitions allant de 12 % à 21 %. Aussi, Iyamu *et al.* (16) ont atteint 50 % d'inhibition avec Niprisan®, un produit antifalciformant à base de plante, alors qu'à la concentration de 5 mg/ml, *M. lucida* inhibe de 81 % la falciformation.

Ces résultats justifient alors l'utilisation de ces deux plantes dans le traitement de la drépanocytose dans la pharmacopée. En effet, les drépanocytaires en crise se soulagent avec une prise régulière du décocté des feuilles de *M. lucida*. Par contre, la poudre de l'écorce de racines de *N. leavis* et celle de *Zanthoxylum macrophylla* sont quotidiennement utilisées en association à raison d'une cuillerée à café dans la bouillie pour prévenir les crises drépanocytaires.

Effet des extraits végétaux sur la falciformation des hématies AS

En présence des extraits végétaux, on note une diminution significative du pourcentage de falciformation par rapport au témoin (Tableau I). Cette diminution est dose dépendante pour les deux extraits (Fig. 4).

Les inhibitions exercées par *N. leavis* sur le sang AS et SS sont presque identiques. Les deux courbes sont parallèles avec un léger décalage à droite de la courbe d'inhibition de falciformation des hématies SS (Fig. 7). Avec *M. lucida* ces deux courbes sont grossièrement parallèles (Fig. 8).

Cette corrélation entre l'effet de l'extrait sur les deux génotypes est confirmée par le coefficient de corrélation de Pearson qui est de 0,92 pour *N. leavis* et de 0,89 pour *M. lucida*.

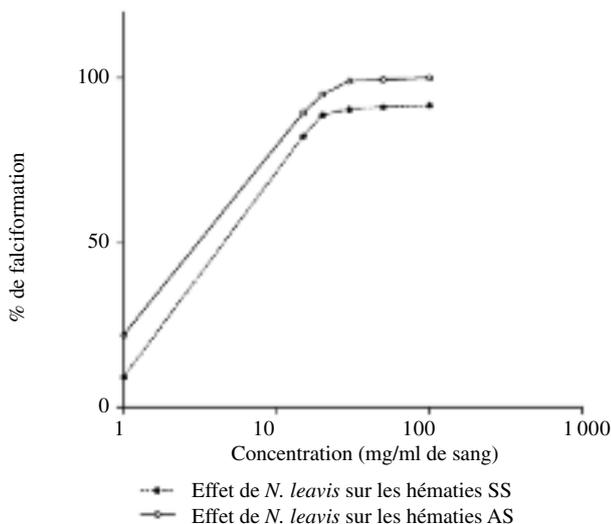


Figure 7. Effets comparés de *N. leavis* sur la falciformation des hématies AS et SS sur échelle logarithmique. Afin d'étudier la possibilité d'utiliser dans ce protocole le sang AS à la place du sang SS qui est rare, nous avons comparé l'effet de chacun des extraits sur la falciformation des hématies AS et SS. Nous avons également étudié la corrélation entre les deux effets. La courbe exprimant l'inhibition de la falciformation des hématies SS est parallèle à celle des hématies AS mais schifftée vers la droite.

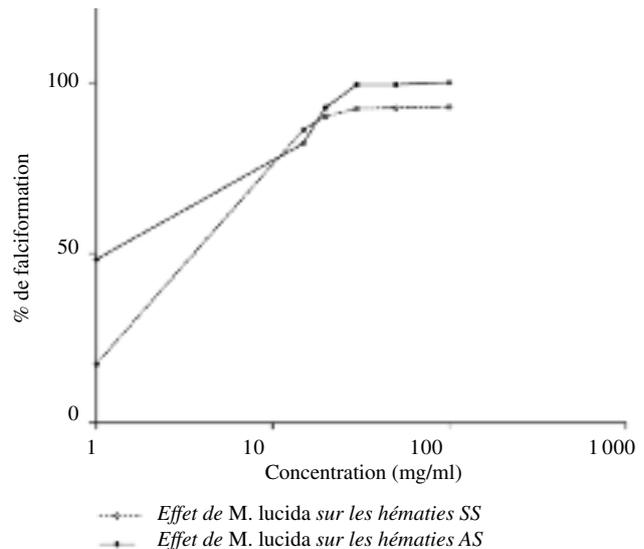


Figure 8. Effets comparés de *M. lucida* sur la falciformation des hématies AS et SS sur échelle logarithmique. Le coefficient de corrélation de Pearson entre les deux effets est de 0,92 pour *N. leavis* et de 0,89 pour *M. lucida*. L'extrait a donc les mêmes effets sur la falciformation des deux génotypes sauf que l'effet est plus important sur la falciformation des hématies AS.

Le léger décalage de la courbe de l'effet de l'extrait sur les hématies SS vers la droite avec une corrélation tendant vers 1 permet de dire qu'avec ce protocole, au lieu de travailler avec le sang SS qui est difficile à trouver, on peut utiliser le sang AS. En effet, sur les hématies AS l'inhibition est déjà très significative à de faibles concentrations des extraits végétaux car le taux de désoxyhémoglobines polymérisées est plus faible dans ces hématies que dans celles SS. Il suffirait alors d'augmenter la concentration de l'extrait végétal pour obtenir le même effet que celui obtenu sur le sang AS.

La toxicité des extraits végétaux

Au cours de la période d'observation, on n'a constaté aucun changement de comportement ni mort de rat. Ce qui nous amène à dire que les deux extraits auraient leur DL50 supérieure à 5 g/kg.

CONCLUSION

Le métabisulfite de sodium induit *in vitro* la falciformation dans les conditions d'anoxie. Le taux de cette falciformation est fonction du temps et du génotype.

Les résultats de l'étude des propriétés inhibitrices de falciformation des extraits semi-éthanoliques de *M. lucida* et de *N. leavis* montrent que les deux plantes ont un effet anti-drépanocyttaire évident *in vitro* selon nos conditions expérimentales utilisées. Ils inhibent fortement la falciformation induite par le métabisulfite.

Par ailleurs, le test de toxicité limite a montré que les extraits semi-éthanoliques de *M. lucida* et de *N. leavis* ne sont

pas toxiques. Il faudrait alors confirmer ces résultats avec les tests de toxicité subaiguë, sub-chronique et chronique de ces deux plantes.

D'autres études sont nécessaires pour élucider les mécanismes d'action des deux plantes et évaluer le potentiel toxique à court et long terme.

RÉFÉRENCES

- 1 - Catonné Y - Aspects orthopédiques de la drépanocytose. *Conférences d'Enseignement de la Sofcot* 2002; 79 : 245-62.
- 2 - Latoundji S, Anani L, Ablet, Zohoun I. Morbidité et mortalité drépanocytaire au Bénin. *Med Afr Noire* 1991; 38 : 569-74.
- 3 - Bunn HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med* 1997; 337 : 762-9.
- 4 - Gbadoé AD, Atsou K, Agbodjan-Djossou OA, Tsolényanu E, Nyadanu M, Dogba AD *et al.* Prise en charge ambulatoire des drépanocytaires : évaluation de la première année de suivi des patients dans le service de pédiatrie de Lomé (Togo). *Bull Soc Pathol Exot* 2001; 94 : 101-5.
- 5 - Steinberg MH - Management of sickle cell disease. *N Engl J Med* 1999; 340 : 1021-30.
- 6 - Amégzin KP. Les anomalies de l'hémoglobine au Togo. Etude sur 2684 sujets. *Rev Soc Med Biol du Togo* 1981; 5 : 33-6
- 7 - Galactéros F - Drépanocytose. *Encyclop Orphanet* 2000 ; pp 1-5.
- 8 - Zohoun IS, Mérault G, Reinette P, Rosa J. Politique de santé et drépanocytose. *Rev Prat* 1992; 42 : 1873-7.
- 9 - Guissou IP, Sawadogo M, Sawadogo A, Ouattara A. Etude de l'efficacité anti-drépanocytaire de gélules de FACA chez les enfants en milieu hospitalier de Ouagadougou. *Pharm Med Trad Afr Presses de l'UB Lomé* 1995; 29-38.
- 10- Adjanohoun EJ. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Niger. 1987 ; 250 p.
- 11 - Elekwa I, Monanu MO, Anosike EO. Effects of aqueous extracts of *Zanthoxylum macrophylla* roots on membrane stability of human erythrocytes of different genotypes. *Biochemistri* 2005; 17 : 7-12.
- 12 - Galactéros F. Bases physiopathologiques de la drépanocytose, prise en charge et actualités thérapeutiques. *Bull Soc Pathol Exot* 2001; 94 : 77-9.
- 13 - Ohnishi ST, Ohnishi T, Ogunmola G. Green tea extract and aged garlic extract inhibit anion transport and sickle cell dehydration *in vitro*. *Blood Cells Mol Dis* 2001; 27 : 148-57.
- 14 - Cissé R, Sano D, Traoré A, Chateil JF, Sawadogo A, Sanou A *et al.* Apport de l'imagerie médicale dans les manifestations viscérales de la drépanocytose chez l'enfant. *Med Afr Noire* 1998; 45 : 227-30.
- 15 - Jawad HA, Manal S, Al-Diwan, Jawad AM. Effect of methoxyverapamil, diltiazem, morphine and their combination on the formation of irreversibly sickled cells: an *in vitro* study. *East Medit Health J* 1997; 3 : 301-9.
- 16 - Iyamu EW, Turner EA, Asakura T. *in vitro* effects of Niprisan® (Nix-0699): a naturally occurring potent antisickling agent. *Br J Haematol* 2002; 118 : 337-47.

BULLETIN D'ABONNEMENT

Revue Médecine Tropicale

IMTSSA

BP 46 - Le Pharo - 13998 MARSEILLE - ARMEES •

Tel. : 04 91 15 01 47 • Fax : 04 91 15 01 29 • e-mail : medtrop@imtssa.fr

Service Abonnements • Tel. 04 91 15 01 23

NOM et Prénoms :

Profession :

(ou désignation de l'Etablissement)

Adresse :

(destinataire de la Revue) :

..... Date et Signature

Les abonnements débutent à la date de la commande. Ils assurent le service de quatre numéros annuels et donnent droit aux numéros spéciaux susceptibles d'être publiés en cours d'année.

Tarif d'abonnement 2008 (Tarif unique pour tous pays, frais de port inclus)

40 Euro

Prix d'un numéro

8 Euro

Règlement

- Par chèque bancaire ou postal, à l'ordre de : Régisseur d'avances et de recettes de l'IMTSSA, Parc du Pharo, BP 46, 13998 Marseille-Armées, France.
- Par virement à : Domiciliation : TP MARSEILLE, n° banque : 10071, n° guichet : 13000, n° compte : 00001005337, RIB 38

