

## **SOMMAIRE**

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>3</b>
<b>CHAPITRE I : LE STRESS OXYDATIF.....</b>	<b>4</b>
I.    ORIGINES ET ROLE DES EROs.....	4
II.   PRINCIPALES CIBLES BIOLOGIQUES DES EROS.....	5
III.  LES SYSTEMES ANTIOXYDANTS.....	7
IV.   LE STRESS OXYDANT ET LES FACTEURS FAVORISANTS.....	13
V.    DREPANOCTOSE ET STRESS OXYDATIF.....	14
<b>CHAPITRE II : METHODES D'ETUDE DES ACTIVITES ANTIOXYDANTES ET ANTI FALCEMIANTES.....</b>	<b>16</b>
I.    PRINCIPES GENERAUX.....	16
II.   LES DIFFERENTES METHODES D'ETUDE DES PROPRIETES ANTIOXYDANTES.....	17
<b>CHAPITRE III : GENERALITES SUR <i>Parkia biglobosa</i>.....</b>	<b>21</b>
I.    BOTANIQUE.....	21
II.   BIOGEOGRAPHIE .....	22
III.  BIOLOGIE.....	23
IV.   COMPOSITION CHIMIQUE.....	25
V.    IMPORTANCE SOCIO-ECONOMIQUE.....	27
<b>DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE.....</b>	<b>30</b>
<b>CHAPITRE I : METHODOLOGIE .....</b>	<b>31</b>
I.    CADRE D'ETUDE.....	31
II.   OBJECTIF DE L'ETUDE.....	31
III.  MATERIEL ET REACTIFS.....	31
IV.   LES METHODES D'ETUDE.....	35
<b>RESULTATS.....</b>	<b>40</b>

<b>DISCUSSION.....</b>	<b>48</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>52</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>54</b>

## **LISTE DES ACRONYMES**

---

AAPH: 2,2'-azobis-2-méthyl-propanimidamide dichlorhydrate

ABTS: (2,2'-azinobis-(acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonque))

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ADP: Adenosine Di Phosphate

AGPI : Acides Gras Poly-Insaturés

ATP: Adenosine Tri Phosphate

DPPH: 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyle

EDTA : Ethylène Diamine Tétracétique

EROs : Espèces réactives de l'oxygène

GPxs : Glutathion Peroxydases

GSH : Glutathion réduit

GSSG: Glutathion oxydé

HMG CoA : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A

LDL: Low Density Lipoprotein

NADPH: Nicotinamide Adenine dinucleotide phosphate réduit

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ORAC : Oxygen Radical Absorbance Capacity

SDM : Syndromes Drépanocytaires Majeurs

SOD: Superoxide Dismutases

TEAC-Trolox Equivalent Antioxydant Capacity

Trolox : (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétramethylchromane-2-Carboxylique

TrxR : thiorédoxine réductase

## LISTE DES FIGURES

---

Figure 1 : Principales EROs et les antioxydants associés.....	12
Figure 2 : Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants .....	13
Figure 3: Structure de l'ABTS avant et après oxydation.....	18
Figure 4: Structure du Trolox.....	19
Figure 5: Structure de l'AAPH. ....	19
Figure 6: Structure du DPPH avant et après réaction avec l'antioxydant .....	20
Figure 7 : Spécimen, fleur et fruits de <i>Parkia biglobosa</i> .....	22
Figure 8. Distribution géographique de <i>Parkia biglobosa</i> . Une vingtaine de pays	29
Figure 9 : Broyeur à mortier RM 100 .....	32
Figure 10 : Broyeur moulinex .....	33
Figure 11 : Evaporateur rotatif.....	34
Figure 12: Action de la solution méthanolique d'acide ascorbique sur le DPPH...	42
Figure 13 : Action de l'extrait méthanolique d'écorce de <i>Parkia biglobosa</i> sur le DPPH.....	43
Figure 14: Résultats comparatifs des effets de l'acide ascorbique et de l'extrait d'écorce de <i>P. biglobosa</i> sur le radical DPPH.....	44
Figure 15 : Effets de l'extrait d'écorce de <i>Parkia biglobosa</i> ( $1 \text{ mg/ml}$ , $10^{-1} \text{ mg/ml}$ , $10^{-2} \text{ mg/ml}$ ) sur la falcification des hématies chez les porteurs du trait drépanocytaire AS .....	46
Figure 16 : Variation Effets cumulés de l'extrait d'écorce de <i>Parkia biglobosa</i> ( $1 \text{ mg/ml}$ , $10^{-1} \text{ mg/ml}$ , $10^{-2} \text{ mg/ml}$ ) sur la falcification des hématies chez les porteurs du trait drépanocytaire AS et chez les témoins normaux AA. ....	47

## LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau I: Sources de stress oxydant endogènes et exogènes .....	14
Tableau II: Effet piégeur de l'acide ascorbique sur le radical DPPH.....	41
Tableau III : Effet piégeur de l'extrait méthanolique de l'écorce de <i>Parkia biglobosa</i> sur le radical DPPH.....	43
Tableau IV : Pourcentage d'inhibition du DPPH (moyenne ± Ecarts type) par l'acide ascorbique et l'extrait méthanolique d'écorce de <i>Parkia biglobosa</i> .....	44
Tableau V : pourcentage de drépanocytes en fonction de la concentration en extrait méthanolique d'écorce de <i>Parkia biglobosa</i> .....	45

# **INTRODUCTION**

L'Afrique regorge de ressources naturelles d'une grande diversité utilisées par les tradipraticiens depuis des siècles pour traiter les maladies des populations autochtones.

La richesse de cette pharmacopée est largement sous exploitée faute de vulgarisation et de validation scientifique des différentes médications utilisées.

En effet, bon nombre de préparations sont administrées sans connaissances précises sur leurs effets pharmacologiques ni sur leur innocuité, encore moins sur leurs mécanismes d'actions, ce qui pose un problème de sécurité pour les utilisateurs.

*Parkia biglobosa* fait parti de ces espèces végétales utilisées dans la médecine traditionnelle Ouest-africaine pour traiter différentes pathologies; notamment la drépanocytose (47).

Notre étude a pour objectif général de déterminer l'intérêt de l'utilisation des écorces de *Parkia biglobosa* dans le traitement de la drépanocytose.

Nos objectifs spécifiques sont d'étudier les effets de l'extrait d'écorce sur le stress oxydatif et la falcification des hématies qui sont deux des principaux mécanismes observés dans la physiopathologie drépanocytaire (29)

Ainsi, nous allons:

- Dans une première partie, faire une revue bibliographique sur le stress oxydatif, sur la relation stress oxydatif-drépanocytose et sur *Parkia biglobosa*.
- Dans une seconde partie, étudier les propriétés anti oxydantes et antifalcémiantes de l'extrait méthanolique d'écorce de *Parkia biglobosa*

## **PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

# **CHAPITRE I : GENERALITES SUR LE STRESS OXYDATIF**

## **I.ORIGINES ET ROLE DES EROs**

La chaîne respiratoire mitochondriale, dans laquelle les êtres aérobies puisent leur énergie, joue un rôle capital dans la cellule en couplant l'oxydation de coenzymes transporteurs d'hydrogène ou d'électrons avec la phosphorylation de l'ADP (Adénosine Di Phosphate) en ATP (Adénosine Tri Phosphate).

Les conséquences de cette activité mitochondriale sont doubles et paradoxales. D'une part, la mitochondrie fournit à la cellule une source d'énergie importante puisque 36 molécules d'ATP à haut potentiel énergétique sont générées lors de la réduction de l'oxygène. Par contre, dans les conditions physiologiques, environ 0,4 à 4 % d'électrons s'échappent, réagissent directement avec l'oxygène dissous dans le cytoplasme et donnent naissance à des Espèces Réactives de l'oxygène (EROs).

Celles-ci sont :

- Soit des radicaux libres comme l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), ou le radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ )
- Soit des molécules comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou l'oxygène singulet ( $1O_2$ ),

Dans cette chimie particulière, les métaux de transition, comme le  $Fe^{2+}$  et le  $Cu^{2+}$ , agissent comme catalyseurs dans la formation du radical hydroxyle (7).

Le rôle des EROs est très complexe car elles peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique en fonction de leur concentration. Dans des conditions normales, elles sont générées en faible quantité et jouent un rôle de messagers secondaires capables notamment de réguler le phénomène de l'apoptose ou d'activer des facteurs de transcription. Citons aussi le processus de fécondation, au cours duquel les spermatozoïdes sécrètent de grandes quantités d'EROs pour percer la paroi membranaire de l'ovule.

Le monoxyde d'azote radicalaire ou  $\text{NO}\cdot$  est un composé important; il est notamment synthétisé par les cellules endothéliales via l'action de NO synthétases sur la L-arginine. C'est une molécule labile très diffusible, dont les effets régulateurs s'exercent sur la plupart des fonctions physiologiques de l'organisme (maintien du tonus vasculaire, neurotransmission, fonctionnement rénal,...).

Toutefois, le  $\text{NO}\cdot$  peut former avec l'anion superoxyde le peroxynitrite ( $\text{HOONO}$ ), un oxydant puissant et diffusible, capable d'endommager de nombreuses molécules organiques.

Formés en trop grande quantité, les EROs deviennent «pathologiques» en activant l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires ou des protéines d'adhésion. En outre, leur nature instable les rend très réactifs vis-à-vis de substrats biologiques et capables d'induire des modifications oxydatives délétères potentiellement impliquées dans l'apparition de pathologies.

## **II. PRINCIPALES CIBLES BIOLOGIQUES DES EROS**

### ***1. L'acide désoxyribonucléique ou ADN***

L'ADN est une cible privilégiée pour les EROs. La guanine, par exemple, peut réagir avec  $\cdot\text{OH}$  pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement.

### ***2. Les protéines***

Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des EROs. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus avec, pour conséquences, l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes (non- reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte d'activité

enzymatique). Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire.

### ***3. Les lipides membranaires***

Le radical hydroxyle est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des acides gras poly-insaturés (AGPI) : c'est la phase d'initiation. Le radical lipidique réagit avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxyde ( $\text{ROO}^\bullet$ ), suffisamment réactif pour arracher un  $\text{H}^+$  à un AGPI voisin, propageant ainsi la réaction (1).

Il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire. Les peroxydes générés seront neutralisés par la glutathion peroxydase ou continueront à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes (malondialdéhyde, 4-hydroxynonénal) dont les activités pro-athérogènes sont bien connues.

### ***4. Les lipoprotéines***

L'attaque radicalaire des lipoprotéines circulantes aboutit à la formation de LDL oxydées, qui seront captées par des récepteurs spécifiques des macrophages. L'activité de ces récepteurs n'étant pas régulée par la concentration intracellulaire en cholestérol, les macrophages se transforment petit à petit en cellules spumeuses (rôle important dans les premières étapes de l'athérosclérose) (33). En outre, ces LDL oxydées sont immunogènes et les immuns complexes formés peuvent activer la voie classique du complément et générer la sécrétion de cytokines pro inflammatoires par les macrophages (40).

## **III. LES SYSTEMES ANTIOXYDANTS**

Pour se protéger des effets délétères des EROs, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes (Fig.1). On distingue deux sources d'antioxydants : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque; l'autre est endogène et se compose d'enzymes (supéroxyde-dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruleoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs

comme les endonucléases. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes.

## ***1. Systèmes de défense enzymatiques***

### ***1.1. Les superoxyde-dismutases (SOD)***

Ces métalloprotéines, qui représentent une des premières lignes de défense contre le stress oxydant, assurent l'élimination de l'anion super-oxyde  $O_2\cdot^-$  par une réaction de dismutation, en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. Chez l'homme, on décrit 3 isoenzymes : la Cu/Zn-SOD1 cytosolique, la Mn-SOD2 mitochondriale et la Cu/Zn-SOD3, qui diffèrent par la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire. La SOD3 est sécrétée par les cellules musculaires lisses et constitue le système antioxydant majeur de la paroi artérielle : son expression et sa sécrétion sont augmentées par les facteurs vasoactifs (histamine, endothéline 1, angiotensine II) et diminuées par l'homocystéine.

### ***1.2. Les glutathion peroxydases (GPxs)***

La GPx est une sélénoprotéine (cinq isoformes) qui réduit les peroxydes aux dépens de son substrat spécifique, le glutathion réduit (GSH). Son rôle principal consiste en l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'action du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés. La GPx est effondrée en cas de déficit majeur en sélénium, elle est donc un bon reflet de cette carence. Toutefois, pour un apport adéquat en sélénium, les teneurs en GPx atteignent un plateau. Le dosage en GPx ne peut donc être utilisé comme marqueur d'une intoxication en sélénium. Cependant, sa synthèse étant rénale et hépatique, d'autres facteurs tels que l'insuffisance rénale ou la cytolysé hépatique peuvent modifier sa concentration

### ***1.3. Le système thiorédoxine***

Le milieu intracellulaire est plutôt réducteur, les protéines contiennent des groupements thiols libres et les ponts disulfures sont rares. L'antioxydant majeur responsable du maintien des protéines à l'état réduit est la thiorédoxine qui sera régénérée par le NADPH sous l'action de la thiorédoxine réductase (TrxR) qui possède un groupement sélénocystéine dans son site actif.

Elle intervient dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène, ainsi que dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique.

## ***2. Systèmes antioxydants non enzymatiques***

### ***2.1. Le glutathion et les protéines-thiols***

Le glutathion est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine). Il est le thiol (-SH) majoritaire au niveau intra-cellulaire (l'albumine étant son équivalent plasmatique) où il est présent sous forme essentiellement réduite (GSH). Dans des conditions physiologiques, sa forme oxydée (GSSG) est en concentration très faible. Le rapport GSH/GSSG est considéré comme un excellent marqueur de la peroxydation lipidique et permet d'objectiver l'importance du stress. Au cours du vieillissement et lors d'un exercice intense, ce rapport tend à diminuer. Les autres propriétés antioxydantes du GSH sont nombreuses : cofacteur de la GPx, chélateur des métaux de transition, régénérateur final des vitamines E et C, à partir de leur forme radicalaire. L'apport recommandé journalier est d'environ 300 mg (agrumes).

La plupart des protéines dont l'albumine contiennent des groupements « thiols » qui possèdent des propriétés réductrices et piègent facilement les espèces oxygénées activées.

### ***2.2. La vitamine C***

La plupart des mammifères sont capables de synthétiser la vitamine C dans leur foie ou dans leurs reins. Ce n'est pas le cas de l'homme qui doit assurer un apport journalier d'environ 100 mg via une alimentation riche en fruits. La vitamine C est, avant tout, un excellent piégeur des EROs ( $\text{HO}^\bullet$  ou  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ). Elle inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques. Ses fonctions sont nombreuses : contribution au bon fonctionnement du système immunitaire, implication dans la synthèse du collagène et des globules rouges ainsi que dans les mécanismes de métabolisation du fer.

### **2.3. La vitamine E**

Ce terme désigne un ensemble d'isomères, les tocophérols (constitués d'un noyau chromanol et d'une chaîne latérale saturée à 16 atomes de carbone) et les tocotriénols (qui diffèrent des tocols par la présence de 3 doubles liaisons sur cette chaîne latérale). D'un point de vue biologique, deux isomères sont particulièrement intéressants, l' $\alpha$ - et le  $\gamma$ -tocophérol. Leur caractère hydrophobe leur permet de s'insérer au sein des membranes riches en acides gras polyinsaturés, où ils jouent un rôle protecteur en réagissant avec les radicaux peroxyyles ( $\text{ROO}^\bullet$ ) pour former un radical tocophéryle, empêchant ainsi la propagation de la peroxydation lipidique. Si l' $\alpha$ -tocophérol est le plus abondant, il semble que le  $\gamma$ -tocophérol soit le plus efficace à ce niveau. Les apports journaliers d' $\alpha$ -tocophérol sont de l'ordre de 10 mg : il se retrouve en quantité variable dans les huiles (soja, maïs, olive) et dans les noix et noisettes. Le  $\gamma$ -tocophérol est présent essentiellement dans l'huile de sésame.

### **2.4. Les caroténoïdes**

Plus de 600 caroténoïdes différents ont été isolés à partir de sources naturelles, mais seul un petit nombre d'entre eux se retrouvent dans le sang et les tissus animaux. Les fruits et les légumes en sont les principales sources alimentaires. De façon formelle, tous les caroténoïdes dérivent d'une structure linéaire ( $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$ ) avec de nombreuses doubles liaisons, le lycopène, pigment rouge présent notamment dans la tomate et le pamplemousse. Le chef de file des caroténoïdes est cependant le  $\beta$ -carotène, également appelé provitamine A car, après hydrolyse hépatique, il donne naissance à deux molécules de vitamine A. Tous les caroténoïdes ne possèdent toutefois pas cette propriété particulière. Le  $\beta$ -carotène se retrouve dans l'abricot, le melon, la carotte, les légumes verts (épinards, laitue...) : l'apport journalier recommandé est de 1 à 5 mg.

Plusieurs études, dont l'étude YALTA (Young Adult Longitudinal Trends in Antioxidants), ont montré que l'effet bénéfique du  $\beta$ -carotène ne survenait qu'à des doses physiologiques ou alimentaires, alors qu'il est plutôt délétère à doses pharmacologiques, particulièrement chez le fumeur (18). Le tabagisme expose à des

taux élevés d'EROs endogènes et exogènes et pourrait altérer le métabolisme de certains caroténoïdes, libérant des métabolites pro-carcinogènes.

## 2.5. *Le Coenzyme Q10*

Le coenzyme Q10, appelé ubiquinone en raison de son ubiquité dans les cellules, est un dérivé benzoquinolique avec une longue chaîne latérale isoprénique. Cette chaîne latérale confère à la molécule un caractère lipophile qui lui permet de s'insérer dans les membranes et les lipoprotéines. Il joue un rôle essentiel dans la chaîne mitochondriale de transport d'électrons et est un puissant inhibiteur de peroxydation lipidique, en synergie avec la vitamine E. S'il n'existe pas d'apport journalier recommandé pour cet antioxydant, il semble toutefois qu'il soit nécessaire d'en ingérer au moins 30 mg par jour.

Il est à noter que la synthèse de cet antioxydant est, en tout point, parallèle à celle du cholestérol. La formation de ces deux molécules dépend, en effet, de l'acide mévalonique formé à partir de la transformation de la HMG CoA( 3-hydroxy-3 methylglutaryl-CoA) par la HMG-CoA réductase. Or, les agents hypcholestérolémiants comme les statines agissent en inhibant cette dernière enzyme, ce qui a comme effet secondaire une réduction significative du taux plasmatique d'ubiquinone. Connaissant le rôle de cette dernière au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, on comprend pourquoi les personnes prenant des statines se plaignent régulièrement de douleurs musculaires (**20**).

## 2.6. *L'acide urique*

Produit terminal majeur du métabolisme des purines chez l'homme, il est à pH physiologique majoritairement ionisé sous forme d'urate, un piègeur puissant de radicaux (OH<sup>•</sup>, ROO<sup>•</sup>, NOO<sup>•</sup>...). Ces réactions conduisent à des espèces radicalaires qui seront à leur tour réduites (notamment par la vitamine C). Les propriétés antioxydantes de l'urate *in vivo* peuvent être appréciées indirectement par le fait qu'un produit de réaction de l'urate avec les EROs, l'allantoïne, est présent à des taux élevés lors d'un stress oxydant.

## **2.7. *La bilirubine***

La bilirubine est un produit terminal de la dégradation de l'hème et résulte essentiellement du catabolisme de l'hémoglobine par les cellules réticulo-endothéliales. Composé non hydrosoluble, elle se lie à l'albumine dans un rapport stœchiométrique 1/1, ce qui empêche sa pénétration dans des tissus riches en lipides tels que le cerveau. La bilirubine est capable de piéger ROO<sup>•</sup> et l'oxygène singulet. Ainsi, elle protège l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires.

## **2.8. *Les polyphénols***

Ils constituent une famille importante d'antioxydants présents dans les végétaux. L'alimentation fournit environ 1g de polyphénols par jour principalement par l'apport en fruits et, dans une moindre mesure, en légumes et en céréales. Ils sont présents sous forme d'anthocyanine dans les fruits rouges et le vin rouge, sous forme de flavonoïdes dans les agrumes, l'huile de lin et sous forme d'épicatéchine dans le vin, le thé, le chocolat, les pommes, les oignons et les alguesbrunes. Globalement, ce sont d'excellents piégeurs des EROs et de très bons chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre.

## **3. Les oligoéléments**

### **3.1. *Le sélénium***

Le sélénium n'est pas un antioxydant en tant que tel, car il ne peut piéger les radicaux libres, mais il joue un rôle primordial comme cofacteur de la GPx. Dans l'alimentation, on retrouvera essentiellement du sélénium organique, lié à un acide aminé, la cystéine. Le sélénium organique est mieux absorbé, il subit une métabolisation hépatique qui conduit à des intermédiaires nécessaires à la synthèse de dérivés physiologiquement actifs comme la GPx.

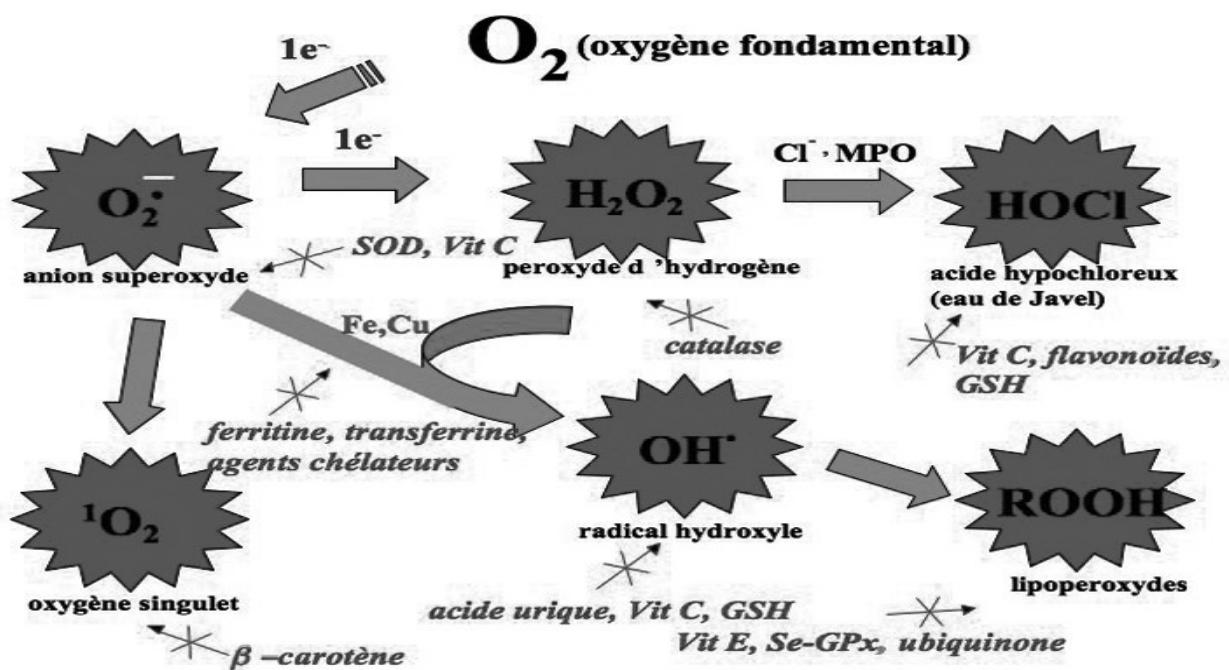
La dose journalière recommandée est de 50-70 µg/jour. Les aliments riches en sélénium sont, notamment, les noix de Brésil, les brocolis, l'ail...

### 3.2. Le cuivre

A concentration physiologique, le cuivre est le cofacteur d'enzymes comme la SOD, la cytochrome C oxydase, la dopamine  $\beta$ -hydroxylase. Cependant, en tant que métal de transition, il joue un rôle important dans le déclenchement de réactions de production d'EROs (réactions de Fenton) et peut lorsque sa concentration est élevée devenir pro-oxydant. Les apports journaliers recommandés sont de l'ordre de 2,5 mg. Il est présent dans le son, l'avoine, le seigle, le foie de veau.

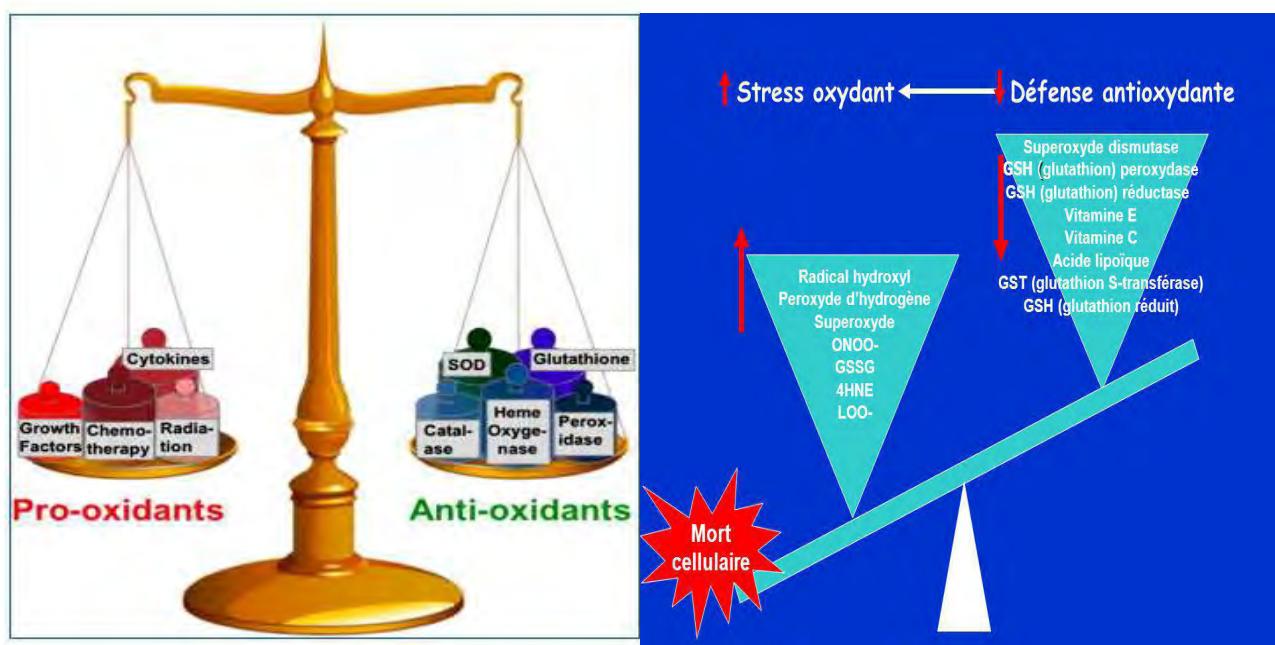
### 3.3. Le zinc

Le zinc joue un rôle de cofacteur pour de nombreuses enzymes et intervient ainsi dans de nombreuses fonctions comme le métabolisme des nucléotides, la synthèse des prostaglandines, le fonctionnement de l'anhydrase carbonique. Comme le cuivre, le zinc est un des cofacteurs essentiels de la SOD. Il protège également les groupements thiols des protéines et il peut inhiber les réactions de formation d'EROs induites par des métaux de transition comme le fer ou le cuivre. Le rapport Cu / Zn, (normalement inférieur à 1,5) sera un excellent indicateur de l'état de stress oxydant d'un individu. Les aliments les plus riches en zinc sont les viandes et les poissons, les céréales complètes et les légumes secs; les apports journaliers recommandés sont de l'ordre de 20 mg



**Figure 1 :** principales EROs et les antioxydants associés

#### IV. LE STRESS OXYDANT ET LES FACTEURS LE FAVORISANT



**Figure 2 : Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants**

Dans des conditions physiologiques, la production des EROs est parfaitement maîtrisée par les systèmes de défense de notre organisme : la balance antioxydants/pro-oxydants est en équilibre (figure 2). Le stress oxydant résultera d'une situation où l'organisme ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques. Il est potentiellement impliqué dans le développement du vieillissement ou de pathologies associées au vieillissement (maladies cardio-vasculaires et neuro-dégénératives, cancer, diabète, dégénérescence maculaire, asthme, ...). Comme le montre le tableau I, les sources de stress oxydant peuvent avoir diverses origines endogènes et exogènes

**Tableau I : sources de stress oxydants**

<b>Mode de vie</b>	Tabagisme Faible consommation en fruits et légumes Alcool Médicaments Pilule contraceptive Exposition au soleil Exercice intense ou mal géré
<b>Environnement</b>	Pollution Ozone Amiante Radiations Contacts avec des substances cancérogènes
<b>Mécanismes biochimiques</b>	Xanthine-oxydase (ischémie-reperfusion) Inflammation Altération de la fonction endothéliale Surcharge en fer Oxydation de l'hémoglobine Altérations mitochondrielles Biosynthèse des prostaglandines Interventions chirurgicales (Circulation extra-corporelle, transplantations)

## **V. DREPANOCYTOSE ET STRESS OXYDATIF**

Les radicaux libres comme le radical superoxyde  $O^{\cdot\cdot}$  et le radical hydroxyle  $\cdot OH$  sont des espèces très réactives capables de provoquer des dommages cellulaires par le biais de la peroxydation des lipides membranaires (12). L'hémoglobine extracellulaire provoque l'accumulation des radicaux libres à partir du fer de l'hème par la production de radicaux hydroxyles via la réaction de Fenton (13; 41). Plusieurs auteurs ont montré que le fer de l'hème est susceptible d'entraîner l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL), ce qui peut provoquer des dommages au niveau vasculaire (12 ; 27). De même, les radicaux libres générés par les macrophages activés sont impliqués dans les syndromes de détresse respiratoire, de nécrose

tissulaire et d'athérosclérose (3 ; 28). Ces effets néfastes sont inhibés partiellement par la fixation de l'hémoglobine sur l'haptoglobuline.

Des études ont montré une précipitation d'hémoglobine au niveau des cellules tubulaires rénales durant de sévères hémolyses intravasculaires ou durant la transfusion de dérivés sanguins contenant de l'hémoglobine extracellulaire. Cette précipitation de l'hémoglobine au niveau du tissu rénal était accompagnée d'une atteinte de la fonction rénale et une déplétion de la concentration en haptoglobuline circulante (43 ; 10). L'étude des mécanismes par lesquels l'haptoglobuline protégerait le rein contre les dommages causés par l'hémoglobine libre a montré que l'haptoglobuline agissait essentiellement par neutralisation du potentiel oxydant et des propriétés vasoconstrictrices de l'hémoglobine (21 ; 22 ; 23).

Ainsi dans la drépanocytose, l'état inflammatoire quasi permanent est maintenu et alimentée par l'hémoglobine libérée lors d'épisodes hémolytiques qui constitue un important médiateur de maladies touchant le système cardiovasculaire. Sa toxicité et sa nature inflammatoire sont dues en particulier à sa capacité à consommer le monoxyde d'azote et à servir de substrat à la réaction de Fenton, qui va entraîner la production d'ions superoxydes et hydroxyles créant ainsi un stress oxydatif important qui est une des composantes principales de la maladie drépanocytaire

## **CHAPITRE II : METHODES D'ETUDE DES ACTIVITES**

### **ANTIOXYDANTES ET ANTI FALCEMIANTES**

#### **I. PRINCIPES GENERAUX**

##### **▪ Activité anti oxydante**

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 de produits alimentaires, d'actifs, d'ingrédients, etc. 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 peroxyyles utilisés dans ce test soient 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 ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en ions ferriques ( $\text{Fe}^{2+}$ ), les tests de piégeage de radicaux oxygénés spécifiques d'un type de radical oxygéné ( $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HO}^-$ ,  $\text{ROO}^-$ ), la méthode de décoloration du  $\beta$ -carotène.

#### ▪ Activités antifalcémiantes

Il existe différentes méthodes d'étude des propriétés antifalcémiantes décrites dans la littérature qui diffèrent par certaines spécificités opérationnelles mais ont en commun le même principe.

En effet l'étude des propriétés antifalcémiantes repose sur la réalisation d'un test d'Emmel et l'observation des érythrocytes d'un sujet drépanocytaire en l'absence d'incubation avec la solution à tester et avec incubation avec cette dernière.

L'analyse des résultats peut porter :

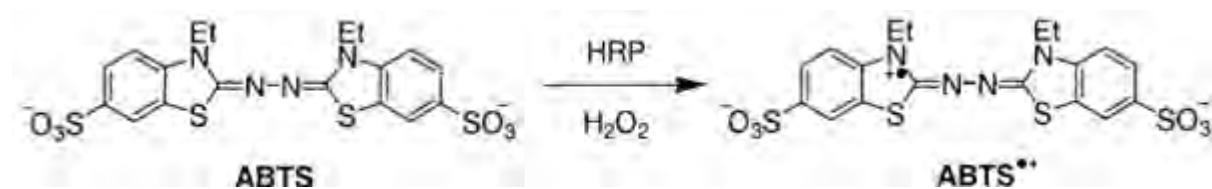
- Soit sur le pourcentage final de drépanocytes observés après un temps déterminé d'incubation avec la solution à tester
- Soit sur le pourcentage de drépanocytes observés à intervalle de temps régulier (19)

## **II. LES DIFFERENTES METHODES D'ETUDE DE L'ACTIVITE ANTI OXYDANTE**

### **1. Test ABTS (2,2'-azinobis{acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique})**

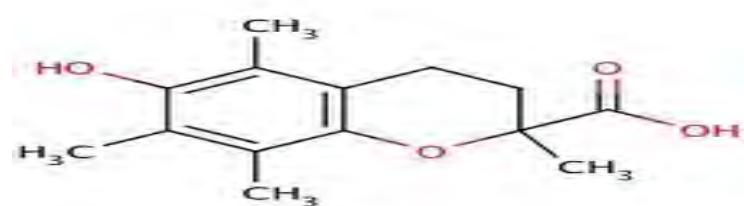
Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS<sup>+</sup> de coloration bleu-vert en la transformant en ABTS incolore (Figure 3), par

piégeage d'un proton par l'antioxydant. Une comparaison est faite avec la capacité du Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétramethylchromane-2-Carboxylique : analogue structural hydrosoluble de la vitamine E) à capturer l'ABTS.



**Figure 3:** Structure de l'ABTS avant et après oxydation.

La décroissance de l'absorbance causée par l'antioxydant reflète la capacité de capture du radical libre. La capacité antioxydante exprimée en équivalent Trolox (TEAC-Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) correspond donc à la concentration de Trolox (**Figure 4**) ayant la même activité que la substance à tester avec une concentration donnée. Le résultat est donné en micromoles ( $\mu\text{M}$ ) ou millimoles (mM) d'équivalent Trolox par gramme de produit ou par millilitre (ml) s'il s'agit d'un liquide. La méthode standardisée avec un temps fixe d'incubation peut, dans certains cas, engendrer une sous-estimation de la valeur obtenue. Dans ce cas on peut envisager de laisser se dérouler la réaction jusqu'à terme et recalculer la valeur TEAC.

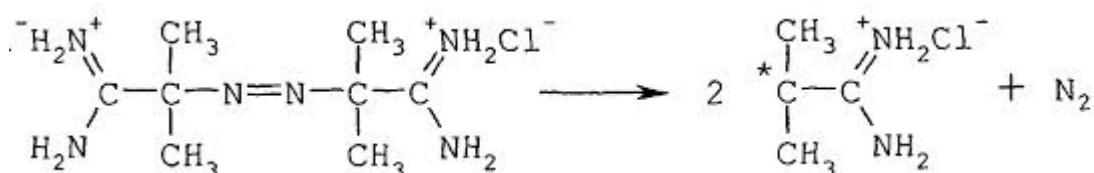


**Figure 4:** Structure du Trolox.

## 2. Test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Cette méthode est basée sur la décroissance de la fluorescence en présence d'un antioxydant chimique l'AAPH (2,2'-azobis-2-méthyl-propanimidamide dichlorhydrate **Figure 5**). Le produit à tester peut être capable de protéger la

fluorescence et réduire la vitesse de dégradation de la fluorescence. Il possède alors un pouvoir antioxydant. La méthode est réalisée en microplaques dans lesquelles est mesuré, en parallèle, le déclin de la fluorescence au cours du temps en présence de concentrations croissantes de Trolox et des échantillons à tester à différentes concentrations. Le but est d'obtenir une réponse comparable à celle de la gamme.



**Figure 5:** Structure de l'AAPH.

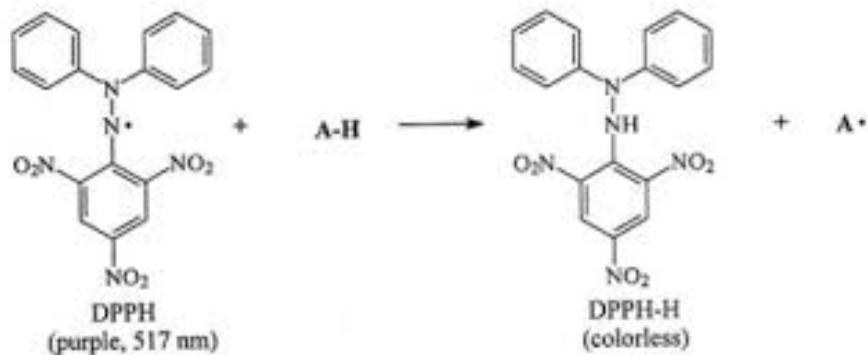
On peut ainsi, après traitement des données, calculer l'équivalent Trolox.

La méthode faisant intervenir une cinétique, la mesure de la capacité se fait par l'intermédiaire du calcul des aires sous la courbe. C'est la seule méthode qui combine à la fois le pourcentage d'inhibition de la réaction d'oxydation et la longueur dans le temps de cette inhibition en une seule mesure. Elle donne une mesure globale de la capacité antioxydante. L'avantage majeur du test ORAC est de proposer une mesure standardisée et largement acceptée.

### 3. Test DPPH (1,1 Diphenyl-2-picryl-hydrazyl)

La méthode est basée sur la dégradation du radical DPPH (**Figure 6**). Ce dernier est un radical libre de coloration violette qui présente une bande d'absorption caractéristique à 517nm 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-vert. 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-verte. La mesure de la décroissance de coloration violette au cours du temps permet de déterminer la concentration inhibitrice à 50% notée IC<sub>50</sub>, temps au bout duquel 50% de coloration

violette est perdue. Généralement, IC<sub>50</sub> est interprétée sur la base de la quantité d'un antioxydant nécessaire pour faire diminuer de 50% la quantité initiale de DPPH (des comparaisons d'IC<sub>50</sub> sont réalisées). Le résultat est dépendant de la concentration en DPPH initiale. On peut aussi exprimer la capacité anti-oxydante par le pourcentage d'inhibition.



Scheme 1 - Structure of DPPH before and after reaction with antioxidant (AH)

**Figure 6:** Structure du DPPH avant et après réaction avec l'antioxydant (AH)

En ajoutant une référence connue, on pourrait standardiser la méthode en ramenant par exemple les résultats à un équivalent Trolox. Cette méthode est beaucoup utilisée pour étudier la capacité anti-oxydante totale des extraits végétaux alimentaires.

## CHAPITRE III : GENERALITES SUR *Parkia biglobosa*

### (MIMOSACEA)

#### I. BOTANIQUE

Communément appelé ‘néré’ (en bambara) dans plusieurs pays d’Afrique de l’ouest, arbre à farine, caroubier africain, houlle (wolof) ou encore ‘african locust bean’ (6), *Parkia biglobosa*, est une espèce de la famille des Leguminosae, sous famille des Mimosoidea et de la tribu des Mimosae. Elle appartient au genre *Parkia* qui compte à ce jour environ 34 espèces répartis dans trois centres de diversité distincts en Amérique du Sud (18 espèces), en Afrique (quatre espèces dont une à Madagascar) et en Asie (12 espèces) (17; 25). Ce nombre est encore provisoire car il existe probablement des espèces non encore décrites en Amérique du Sud, et pour lesquelles il manque cependant du matériel végétal d’assez bonne qualité pour la détermination. En outre, une espèce d’origine philippine connue seulement à partir du spécimen-type a peut-être maintenant disparu (Hopkins com. personnelle). Des quatre espèces africaines (*Parkia biglobosa* (Jacq.) G. Don, *Parkia bicolor* A. Chev., *Parkia filicoidae* Olivier et *Parkia madagascariensis* R.Viguier), seule *Parkia biglobosa* est caractéristique des savanes.

Les espèces africaines, exceptée *P. madagascariensis*, celle de Madagascar, se distinguent des autres espèces du genre par le type et la disposition des fleurs sur le capitule, la couleur et la forme des inflorescences, la taille des feuilles et la fusion de la corolle (25). La diversité morphologique est plus élevée en Amérique du Sud, qu’en Asie et en Afrique où elle est moins importante. Les trois espèces d’Afrique continentale se caractérisent par la couleur rouge de leur capitule et la fusion de leur corolle (25) et se distinguent l’une de l’autre par une combinaison des caractères de leurs feuilles, capitules (nombre et taille des fleurs de différents types), gousses et graines. Bien qu’elle appartienne à la même section que les trois autres, *P. madagascarensis* qui est la moins bien connue, a des gousses de type différent (16). La structure du pollen de *P. biglobosa* indique que les poliades sont de forme

elliptique ( $85 \mu$  de diamètre) et comptent jusqu'à 32 grains et l'ornementation de l'exine, la membrane externe du grain de pollen, est verrueuse (9).



**Figure 7 :** Spécimen, fleur et fruits de *Parkia biglobosa*

## **II. BIOGEOGRAPHIE**

La biogéographie est l'étude de la répartition des êtres vivants dans la biosphère, de leur adaptation dans le temps et dans l'espace aux influences locales, de leurs migrations et des associations qu'ils constituent. La datation de fossiles de pollen, la diversité des caractères morphologiques des différentes espèces et l'existence dans le Nouveau Monde (Amérique) d'espèces à pollinisation entomophile (insectes) au sein d'un genre plutôt chéiroptérochore (pollinisé par les chauves-souris) laissent supposer

que les espèces du Nouveau Monde précédent celles du Vieux Monde (Afrique) et que ces deux groupes auraient un ancêtre commun, originaire du Nouveau Monde (**2**; **9**). Ainsi le centre d'origine de *Parkia* serait l'Amérique du Sud. La présence à la fois d'espèces à pollinisation entomophile et d'espèces chéiroptérochores dans le Nouveau Monde témoignerait d'une évolution récente des premières vers les secondes. La distribution pantropicale de *Parkia* se serait faite à une période reculée, probablement avant l'Eocène (34 à 56 millions d'années avant notre ère) qui correspond à l'époque de la découverte des premiers fossiles de chauve-souris. D'une certaine manière, bien que précédant les chauves-souris, le genre *Parkia* a une histoire et une géographie qui semblent associées à celles de ces dernières. En effet, la plupart des espèces sont effectivement pollinisées par les chauves-souris, faisant de *Parkia* l'un des groupes connus les plus riches en espèces chéiroptérochores (**25**). En outre, certains caractères morphologiques de l'inflorescence ( cercle de nectar, exine verruqueuse, etc.) des espèces du genre *Parkia* semblent être particulièrement adaptés à la pollinisation par les chauves-souris. De nos jours, *P. biglobosa* est une espèce des savanes soudaniennes et soudano-guinéennes répandue dans les champs et jachères, et présente dans une vingtaine de pays. Elle supporte un large éventail climatique, la principale constante étant en général une saison sèche de 5 à 7 mois par an. Ainsi, elle peut se développer dans des zones où la pluviométrie est comprise entre 500 mm en région sahélienne et 2200 mm en Guinée-Bissau avec des records de plus de 3500 mm en Sierra Léone et de 4500 mm en Guinée Conakry. Quoique préférant les sols limoneux profonds, *P. biglobosa* peut se rencontrer également sur des sols latéritiques peu profonds, des sols latéritiques épais, des buttes caillouteuses et des collines rocallieuses. L'espèce pousse dans des zones de températures moyennes annuelles comprises entre 26°C et 28°C et peut se retrouver à des altitudes allant du niveau de la mer (50 m - côte du Sénégal Gambie) jusqu'à 1350 m dans les Monts du Fouta Djalon en Guinée Conakry (**14**).

### **III. BIOLOGIE**

Les observations réalisées par Backer & Harris (1957) (**2**) et Hopkins (1983) (**16**) ont permis d'établir une description détaillée de la biologie florale et de la pollinisation

de l'espèce. Les capitules sont constitués de nombreuses fleurs (près de 2552) de trois types: fleurs fertiles [2206], fleurs nectarifères [261] et staminoides [85] (Hopkins HC, 1983). A l'instar de *P. filicoidea* et de *P. bicolor* et peut-être de *P. madagascariensis*, *P. biglobosa* est une espèce chéiroptérochore.

Elle est pollinisée par des chauves-souris frugivores de l'ordre des chiroptères, du sous-ordre des Mégachiroptères et de la famille des Pteropidés (Megachiroptera: Pteropodidae) dont notamment *Epomophorus gambianus*, *Eidolon helvum*, *Nanonycteris veldkampi*, *Micropterpus pustuleuses*. Le comportement des chauves-souris de petite taille notamment, caractérisé par de fréquentes et brèves visites des fleurs sur différents arbres, comparable à celui observé par Backer & Harris (2) sur *P. biglobosa*, a été décrit par Hopkins & Hopkins (1982) (15) chez *P. nitida*, espèce sud américaine, comme une stratégie évolutive pour échapper aux éventuelles attaques de prédateurs dont les serpents. Ce comportement qui pourrait en outre favoriser une pollinisation efficace, peut avoir eu un effet important sur l'écologie de la pollinisation de *Parkia* (15). D'autres polliniseurs effectifs, des insectes notamment (abeilles, bourdons, guêpes, etc.) sont également répertoriés (38). L'anthèse est nocturne et dure une nuit (16). *P. biglobosa* est une espèce diploïde dont le nombre exact de chromosomes reste toujours à élucider. Les nombres avancés sont de  $2n = 24$  selon Mangenot & Mangenot (1957) (26) et de  $2n = 26$  selon Goldblatt (1981). *Parkia biglobosa* est relativement facile à régénérer. Sa propagation se fait principalement par voie de semis des graines.

La multiplication végétative, y compris la micro-propagation sont également des voies possibles de régénération de l'espèce (45 ; 42). Les semis de graines en pépinière se font généralement en pots. Leur entretien nécessite un arrosage régulier, un désherbage et un binage toutes les deux semaines, ce qui assure une bonne croissance des plantules. Au bout de 20 semaines d'élevage, les plantules mesurent entre 20 et 24 cm et peuvent être plantées (36). En plantation, la croissance de l'espèce est relativement rapide et l'on obtient en un an des plants mesurant 1 m, et certains pieds parmi les meilleures provenances peuvent atteindre 7 m environ au bout de 6 ans. Un écartement de 10m x 10m est convenable pour un bon

développement des plants. L'arbre commence à fleurir entre 5 et 7 ans alors qu'il est encore petit et n'atteindra sa taille définitive qu'entre 30 et 50 ans (5). Des essais comparatifs de provenances nationales et africaines installées par le CNSF du Burkina Faso en 1986 et 1995 ont permis de mettre en évidence les provenances les mieux adaptées aux conditions locales des stations

#### **IV. COMPOSITION CHIMIQUE**

Plusieurs substances chimiques biologiquement actives ont été isolées à partir des feuilles, des racines et de l'écorce de l'arbre, les concentrations les plus élevées étant retrouvées au niveau de l'écorce ; ainsi on note la présence de tritérpènes, stérols, de composés polyphénoliques tels que des tanins, flavonoides, coumarines, anthocyanidines.

Il existe d'autres composés qui sont des saponosides et des sucres réducteurs.

Le screening chimique de l'écorce de tronc de *Parkia biglobosa* montre :

- : absent; + : present ; ++: abondant; +++: très abondant; ±: traces

<b>Solvants polaires</b>	Composés chimiques	écorce
--------------------------	--------------------	--------

Sterols et triterpenes	+++
------------------------	-----

Emodols	-
---------	---

#### **Chlorofome**

(CHCl <sub>3</sub> )	Alcaloides	-
----------------------	------------	---

Coumarines	+
------------	---

Flavonones	±
------------	---

Anthocyanines	+++
---------------	-----

	Composés	
	Reducteurs	+++
<b>Ethanol - Eau</b>	Tanins	++
<b>(EtOH- H<sub>2</sub>O -</b>	Anthracenosides	+
<b>70:30)</b>	Saponosides	+++
	Alcaloides	-

L'analyse de la pulpe de fruit montre la composition suivante :

Humidité : 8.41%

Protéines : 6.56%

Lipides : 1.8%

Fibres : 11.75%

Carbohydrates : 67.30%

Taux de sucre : 9° Brix

Caroténoides : 49.175µg /100g

Vitamine C : 191.20mg/100g

Les substances non nutritives sont :

Acide phytique : 60mg/100g

Saponines grossières : 17.80mg/100g

Tannins : 81mg/100g

Phénols : 204.6mg/100g

Acide hydrocyanique : 17.3mg/100g

Les graines elles sont riches en protéines, en iodé et en fer (15.5 mg/100g)

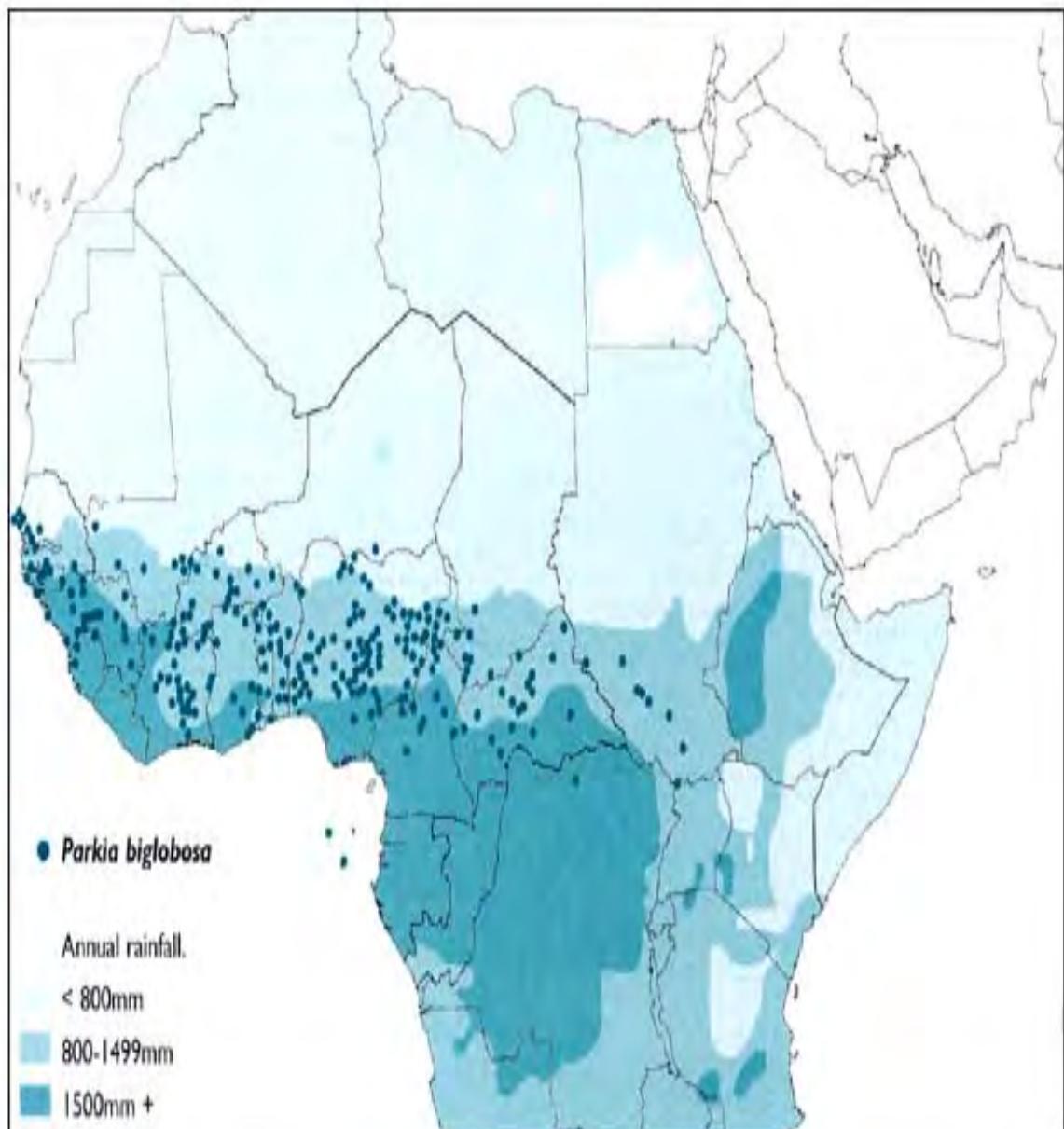
## **V. IMPORTANCE SOCIO-ECONOMIQUE**

L'importance socio-économique de *P. biglobosa* s'explique par ses multiples fonctions alimentaires, agroforestières, médicinales et culturelles. Considérée dans plusieurs sociétés comme un symbole de paix, de l'harmonie de la vie sociale et du bien être des communautés, c'est une espèce dont les produits interviennent dans tous les rituels marquant les différentes étapes de la vie, c'est à dire naissance, baptême, excision, mariage, funérailles, etc. (39). Les graines fermentées (*sumbala*, *netetu* ou *dawa dawa*) riches en protéines et acides aminés essentiels (34 ; 39) et la pulpe de *P. biglobosa* riche en carbohydrates, sont en effet largement consommées par les populations rurales et urbaines et leur vente génère des revenus substantiels, pour de nombreuses femmes en particulier (11). L'analyse de la composition chimique et biochimique des produits du *P. biglobosa* indique que l'espèce possède de multiples propriétés ichtyotoxiques, anti-diarrhéiques, antiseptiques, vasodilatrices, anticoagulantes, hypotensives, anti-venimeuses, analgésiques, anti-inflammatoires, etc (32 ; 4). Ainsi, en Afrique de l'Ouest, les différents organes de l'arbre sont largement et diversément utilisés en médecine et pharmacopée traditionnelle soit en usage interne et/ou externe, soit en association avec d'autres plantes pour le traitement de plusieurs affections telles que les affections parasitaires, les affections de l'appareil circulatoire, celles de l'appareil respiratoire, de la peau et de la plupart des affections de l'appareil digestif.

Répartis à travers les champs et les jachères en zone soudanienne, les peuplements de *P. biglobosa* jouent un rôle important dans l'amélioration de la fertilité des sols et dans leur protection contre l'érosion éolienne et pluviale (46). L'amélioration de la technologie de préparation du soumbala, la mise sur le marché de produits de qualité standard répondant aux normes de sécurité sanitaire d'un produit alimentaire et surtout aux besoins des consommateurs, l'organisation et le développement des marchés locaux et nationaux (45), de même que la vulgarisation des techniques de

multiplication végétative de l'espèce constituent des moyens destinés à mieux valoriser et à susciter une meilleure protection de l'espèce.

*Parkia biglobosa* (Jacq.) G. Don est probablement l'une des espèces des parcs arborés la plus répandue dans les zones soudano-sahélienne et soudanienne d'Afrique (Figure 8). Son aire de distribution se situe dans une bande entre 5°N et 15°N, et s'étend en longitude depuis la côte Atlantique en Afrique de l'Ouest jusqu'en Ouganda en Afrique de l'Est, soit approximativement entre le 18ème degré de longitude Ouest et le 30ème degré de longitude Est (**14**). En dépit de leur importance et à l'instar des autres espèces de savane, les parcs à néré sont caractérisés par une forte présence d'arbres relativement vieux, révélant une faible régénération des peuplements et une régression de l'aire de répartition dans les zones semi-arides (**38**). En outre, le caractère extrêmement aléatoire du climat soudano-sahélien, marqué par des sécheresses récurrentes, rend vulnérables les espèces de la zone général et expose les parcs agroforestiers en particulier à une dégradation continue.



**Figure 8.** Distribution géographique de *Parkia biglobosa*. Une vingtaine de pays d'Afrique de l'Ouest (Bénin, Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Gambie, Ghana, Guinée, Guinée Bissau, Mali, Niger, Nigeria, Sénégal, Sierra Léone, Togo), du Centre (Cameroun, Centrafrique, Tchad, République Démocratique du Congo) et de l'Est (Soudan, Ouganda) abritent l'espèce. D'après Shao (2000).

## **DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE**

# **CHAPITRE I : METHODOLOGIE**

## **I. CADRE D'ETUDE**

Notre étude a été réalisée dans le laboratoire de physiologie pharmaceutique situé au deuxième étage du pavillon pharmacie de la faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar et au sein du laboratoire d'analyses biomédicales du centre hospitalier Youssou Mbargane Diop de Rufisque.

## **II. OBJECTIFS DE L'ETUDE**

Cette étude a pour objectif de mettre en évidence l'activité antioxydante *ex vivo* d'un extrait méthanolique d'écorce de *Parkia biglobosa* ainsi que ses propriétés anti drépanocytaires.

## **III. MATERIEL ET REACTIFS**

Le matériel est constitué par l'ensemble des outils, réactifs et substrats utilisés pour mener notre étude.

### **1) Drogue**

Le matériel végétal est constitué par l'écorce de *Parkia biglobosa* récoltée sur un spécimen de l'arbre situé en face de la bibliothèque universitaire. L'authentification a été réalisée par nos collaborateurs du laboratoire de Botanique et Pharmacognosie.

La poudre de la drogue obtenue après pulvérisation est conservée à la température ambiante (25° à 30°) dans une salle aérée.

### **2) Echantillons sanguins**

Les différents échantillons sanguins AA et AS ont été obtenus par ponction veineuse chez des sujets sains et drépanocytaires connus avec leur consentement éclairé.

Les profils ont été confirmés par électrophorèse sur gel d'agarose

### 3) Appareils et petit matériel

#### ➤ Le broyeur à mortier RM 100

Le **RM 100** se prête au broyage à sec et à l'état humide de matériaux mous, semi durs, durs et fibreux. Il permet de broyer et d'homogénéiser sans effort manuel des quantités d'environ 10 à 150 ml de matière chargée.

On peut atteindre une finesse finale jusqu'à 10 µm, voire même inférieure dans certains cas. Le principe est le suivant:

On ferme le **RM 100** et l'enclenche, ensuite on répartit l'échantillon lentement sur le plateau du mortier tournant d'une manière constante. A cet effet, on ouvre le couvercle droit en plexiglas. Le pilon qui est disposé en déport par rapport au centre du mortier agit par une pré-tension de ressort et par son propre poids sur le fond du mortier et la matière à broyer. Grâce à ce contact intensif, le pilon est entraîné par rotation sans adhérence et broie la matière par friction et par pression réglable au moyen de la douille. Un racloir veille à ce que l'échantillon soit raclé, remué et ramené à la fente de broyage. Ce guidage forcé garantit que toute la matière chargée soit bien mélangée et que chaque particule soit sans cesse ramenée au processus de concassage et broyage.



**Figure 9 : Broyeur à mortier RM 100**

## ➤ LE BROYEUR MOULINEX

Il permet d'effectuer un broyage mécanique et nous donne des particules semi fines qui peuvent être améliorées selon le besoin.



**Figure 10 : Broyeur moulinex**

## ➤ LE MATERIEL DE FILTRATION

- entonnoir
- coton hydrophile (filtre)
- pompe à vide

## ➤ L'EVAPORATEUR ROTATIF (ROTAVAPOR R 210)

Le Rota vapeur permet de réaliser la distillation en une étape, rapidement et d'une façon qui ménage le produit. Cette procédure se base sur l'évaporation et la condensation de solvant au moyen d'un ballon d'évaporation par rotation sous vide. La distillation sous vide améliore le résultat du traitement et aide à protéger les produits.

### Le mode de fonctionnement

Cet appareil comprend:

- **Zone d'évaporation:** le solvant est porté à une température préréglée à l'aide d'un bain de chauffage. Une couche fine de solvant se forme à l'intérieur du ballon d'évaporation en rotation, ce qui augmente le taux d'évaporation. La rotation produit un mélange homogène de l'échantillon en empêchant ainsi une surchauffe stationnaire dans le ballon.

- **Entraînement par rotation avec conduit de vapeur:** l'unité d'entraînement garantit une rotation régulière du ballon d'évaporation. Le conduit de vapeur intégré transporte la vapeur de la zone d'évaporation jusqu'à la zone de refroidissement.
- **Zone de refroidissement:** le solvant pénètre dans le réfrigérant où l'énergie contenue dans la vapeur du solvant est transférée au produit réfrigérant de façon à entraîner la condensation du solvant.
- **Ballon récepteur:** il permet de recueillir le solvant

Le Rotavapor fonctionne en configuration avec d'autres éléments qui sont :

- **La pompe à vide:** c'est une **pompe à membrane PTFE** qui s'utilise principalement pour évacuer l'air contenu dans les instruments de distillation, en particulier des évaporateurs rotatifs ; pour filtrer le vide etc.
- **Condensateur nommé le minichiller w :** c'est un refroidisseur à recirculation avec une machine frigorigène refroidie par eau. Le **minichiller w** est équipé d'une unité régulatrice commandée par microcontrôleur et sa plage de températures de travail va de -20 à 40°C.



**Figure11 : Evaporateur rotatif**

- SPECTROPHOTOMETRE UV
- MICROSCOPE OPTIQUE
- LA VERRERIE ET LE PETIT MATERIEL

- |                               |                          |
|-------------------------------|--------------------------|
| - Erlenmeyers                 | - Gants                  |
| - Fioles de Kitassato (500ml) | - Coton hydrophile       |
| - Eprouvettes                 | - Pipettes               |
| - Béchers                     | - Papier aluminium       |
| - Pissette                    | - Ampoules à décanter    |
| - Ballons en verre            | - Fiole jaugée           |
| - Tubes à essais              | - Eppendorfs (plastique) |
| - Embouts (plastique)         | - Micropipettes          |

## **REACTIFS**

- Méthanol pur (**Scharlau**)
- Acide ascorbique (vitamine C) (**Panreac**)
- Méta bisulfite de Sodium (**Panreac**)
- Solution de DPPH : 2,2'-diphényle-1-picryl-hydrazyl (**sigma-Aldrich**)

## **ADDITIFS**

- Eau distillée

## **IV. METHODES**

### **1. Extraction**

L'objectif de cette étape est d'extraire une grande majorité des composés actifs de notre plante. L'extraction est généralement dictée par les informations bibliographiques concernant la chimie des constituants de la plante. Comme solvant, nous avons utilisé du méthanol pur. L'extraction s'effectue en 3 étapes :

- **La macération** : cette méthode de préparation a été choisie car elle permet de limiter la dégradation des composés thermolabiles ;

- **La filtration** : elle est réalisée sous vide, à l'aide d'une fiole de kitassato, un entonnoir et du papier filtre ;
- **L'évaporation** : elle est réalisée à l'aide de l'évaporateur rotatif et permet d'éliminer le méthanol et d'obtenir un extrait sec.

### **Mode opératoire**

- Introduire 40 grammes de poudre d'écorce de *Parkia biglobosa* dans un Erlenmeyer.
- Mesurer 200 ml de solution de méthanol pur que l'on ajoute dans l'rlenmeyer. Ce dernier est vigoureusement agité puis laissé au repos pendant deux (2) heures au cours desquelles, il sera remué toutes les 15 minutes.

Il est à noter que l'rlenmeyer est recouvert d'un papier aluminium, afin de protéger les molécules photosensibles.

Après la macération, la phase organique ou macérât est récupérée et conservée à +4°C afin de bloquer d'éventuelles réactions biochimiques. Après cette étape, le macérât est filtré avec du coton hydrophile placé dans un entonnoir relié à une pompe aspirante qui accélère la filtration. Après quelques minutes, on a une solution exclusivement liquide.

Le filtrat obtenu est évaporé à sec à l'aide de l'évaporateur rotatif dans les conditions suivantes : température du bain-marie 40°C, température de refroidissement 21°C et le nombre de rotations 4000 tr/mn.

Ainsi l'évaporation aboutit à l'obtention d'un extrait brut sec de la poudre d'écorce de *Parkia biglobosa*, à partir duquel le pouvoir antioxydant est testé. L'extrait brut sec est conservé à une température de -20°C au réfrigérateur avant l'étape finale d'analyse.

## **2. Etude de l'activité antioxydante**

### **➤ Protocole expérimentale du test au DPPH**

Dans chaque tube à essai contenant 100 µl d'extrait d'écorce *Parkia biglobosa* à différentes concentrations (0,125 mg/ml ; 0,312 mg/ml ; 0,625 mg/ml ; 1,25 mg/ml et 2,5 mg/ml), on ajoute 3,9 ml de la solution de DPPH. L'acide ascorbique (vitamine C) utilisé comme antioxydant de référence est testé à des concentrations égales à celles utilisées pour tester l'extrait. L'incubation se fait à l'abri de la lumière. La lecture de la densité optique se fait au bout de 30 min au spectrophotomètre à 517 nm en utilisant la solution méthanolique de DPPH comme solution de contrôle (blanc).

### **➤ Expressions des résultats et analyse statistique**

Trois mesures ont été effectuées pour chaque concentration testée (n=3).

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition (PI) selon la formule :

$$\text{PI} = \{( \text{Abs. blanc} - \text{Abs. Ech} ) / \text{Abs. blanc} \} \times 100$$

PI= Pourcentage d'inhibition

Abs. Blanc= Absorbance (100 µl méthanol + 3,9 ml solution DPPH)

Abs. Ech= Absorbance Echantillon (Absorbance après ajout de l'extrait à une concentration donnée : 100 µl extrait + 3,9 ml solution DPPH).

L'analyse statistique a été effectuée avec le test de fisher. La différence est considérée comme significative si  $p < 0,05$  par rapport au blanc.

## **3. Etude de l'activité antifalcémante**

Pour la caractérisation de l'activité antifalcémante de l'extrait, un test d'emmel est réalisé. Nous avons d'abord préparé extemporanément la solution de méta-bisulfite de sodium ( $\text{S}_2\text{O}_5\text{Na}_2$ ) à 2% (2 g de méta-bisulfite de sodium dans 100 ml d'eau distillée).

Ce test consiste à déposer une goutte de sang (prélevé sur EDTA) au centre de la lame, y ajouter une goutte de méta-bisulfite de Na qui permet d'asphyxier les hématies puis mélanger soigneusement avec un côté de la lamelle et recouvrir avec cette dernière en s'assurant qu'il ne se forme aucune bulle d'air.

Pour éviter que l'oxygène ne pénètre entre lame et lamelle, il faut luter les bords de la lamelle avec du vernis à ongle.

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

### ✓ Préparation des solutions d'extrait

1 mg d'extrait brut méthanolique est dissout dans 1 ml d'une solution d'eau physiologique (9 pour 1000 de NaCl) puis homogénéisé à l'aide d'un vortex ; ce qui nous a permis d'avoir une solution mère à 1 mg/ml.

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

- Première dilution :

100 µl de la solution à 1mg/ml sont additionnés à 900 µl de la solution physiologique pour obtenir une solution à  $10^{-1}$  mg/ml.

- Deuxième dilution :

100 µl de la solution à  $10^{-1}$  mg/ml sont additionnés à 900 µl de la solution physiologique pour obtenir une solution à  $10^{-2}$  mg/ml.

### ✓ Recherche de l'activité anti falcémiante

Pour la recherche de l'activité anti falcémiante, des tests d'Emmel sont réalisés avec la solution de méta bisulfite de sodium préparée extemporanément et des échantillons de sang AA et AS incubés ou non avec l'extrait à tester ; le pourcentage de drépanocytes est ensuite déterminé par comptage au microscope optique à un grossissement 100X.

La diminution de la proportion de drépanocytes en fonction de l'incubation préalable ou non avec l'extrait permet d'apprécier les propriétés anti falcémiantes de cette dernière.

**Etat basal :** 100 µl de sang total de phénotype AA et AS sont respectivement mélangés avec 100 µl d'une solution tampon (solution physiologique) puis incubés pendant 45 mn. Après incubation, des tests d'Emmel sont réalisés suivi d'un comptage au grossissement 100.

**Activité anti falcémiant de l'extrait :** 100µl de sang total de phénotype AA et AS sont incubés respectivement avec 100µl d'une solution à 1 mg/ml, à  $10^{-1}$  mg/ml et  $10^{-2}$  mg/ml pendant 45 mn. Nous avons ensuite réalisé des tests d'Emmel suivis d'un comptage des drépanocytes au microscope optique (100X)

**Technique de comptage des drépanocytes :** Un nombre de 500 cellules sanguines (drépanocytes et cellules normales) est obtenu après comptage aléatoire de plusieurs champs microscopiques à l'objectif 100X.

Le rapport nombre de drépanocytes/500 cellules nous a permis d'obtenir le pourcentage des drépanocytes à l'état basal, à 1 mg/ml, à  $10^{-1}$  mg/ml et  $10^{-2}$  mg/ml.

Trois déterminations ont été effectués ( $n=3$ ) et la moyenne  $\pm$  écart-type est calculée

Les résultats sont exprimés en taux de drépanocytes (%)

# **RESULTATS**

**❖ PROPRIETES ANTIOXYDANTES DE L'EXTRAIT METHANOLIQUE  
DE POUDRE D'ECORCE DE *P. biglobosa***

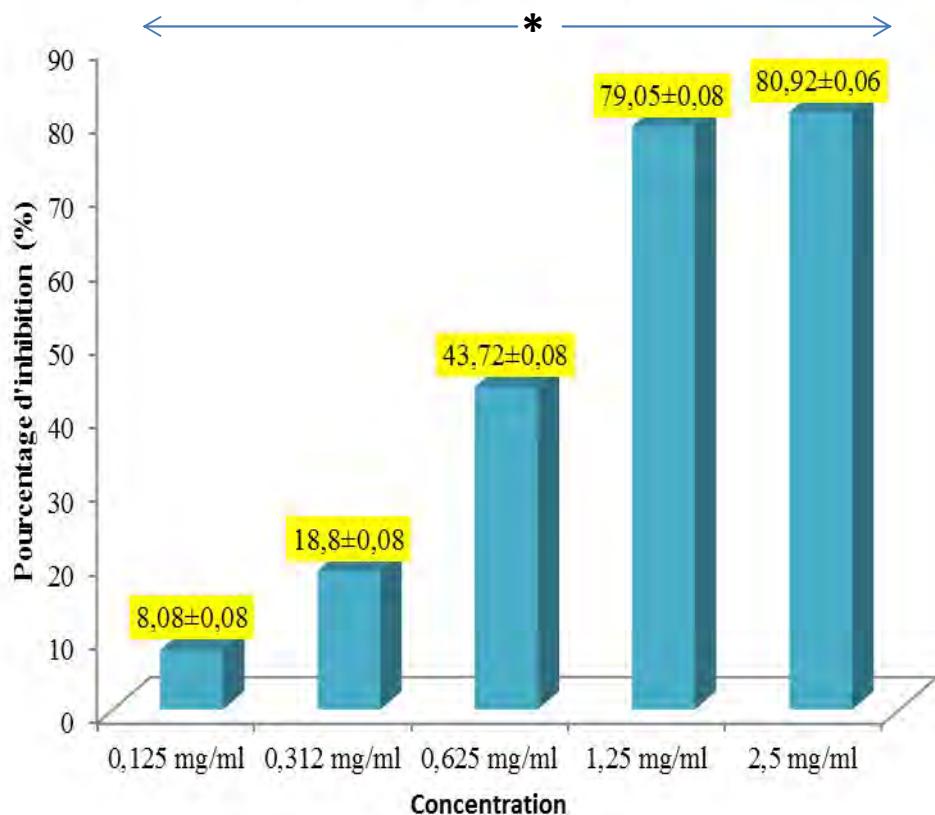
 **Activité antioxydante de l'acide ascorbique**

La solution méthanolique d'acide ascorbique inhibe significativement le DPPH à toutes les concentrations testées et de manière dose dépendante comme on peut le constater sur la figure 12. En effet, à 0,125 mg/ml on a un pourcentage d'inhibition de  $8,08 \pm 0,08\%$ ; à 0,312 mg/ml, on est à  $18,8 \pm 0,08\%$ . A la plus forte concentration (2,5 mg/ml), on a la meilleure activité avec  $80,92 \pm 0,06\%$ .

**Tableau II:** Effet piégeur de l'acide ascorbique sur le radical DPPH.

<b>Concentration</b>	<b>Abs. Ech.</b>	<b>Blanc</b>	<b>Blanc-Ech./Blanc</b>	<b>% Inhibition</b>
<b>0,125 mg/ml</b>	1,6	1,751	0,08	$8,08 \pm 0,08$
<b>0,312 mg/ml</b>	1,42	1,751	0,188	$18,8 \pm 0,08$
<b>0,625 mg/ml</b>	0,98	1,751	0,4372	$43,72 \pm 0,08$
<b>1,25 mg/ml</b>	0,36	1,751	0,7905	$79,05 \pm 0,08$
<b>2,5 mg/ml</b>	0,33	1,751	0,8092	$80,92 \pm 0,06$

## Acide ascorbique



**Figure 12: Action de la solution méthanolique d'acide ascorbique sur le DPPH.** \*  
P < 0,05 : différence significative versus témoin négatif (solution de DPPH) ; n=3 pour chaque mesure.

### ■ Activité antioxydante de la poudre d'écorce de *Parkia biglobosa*.

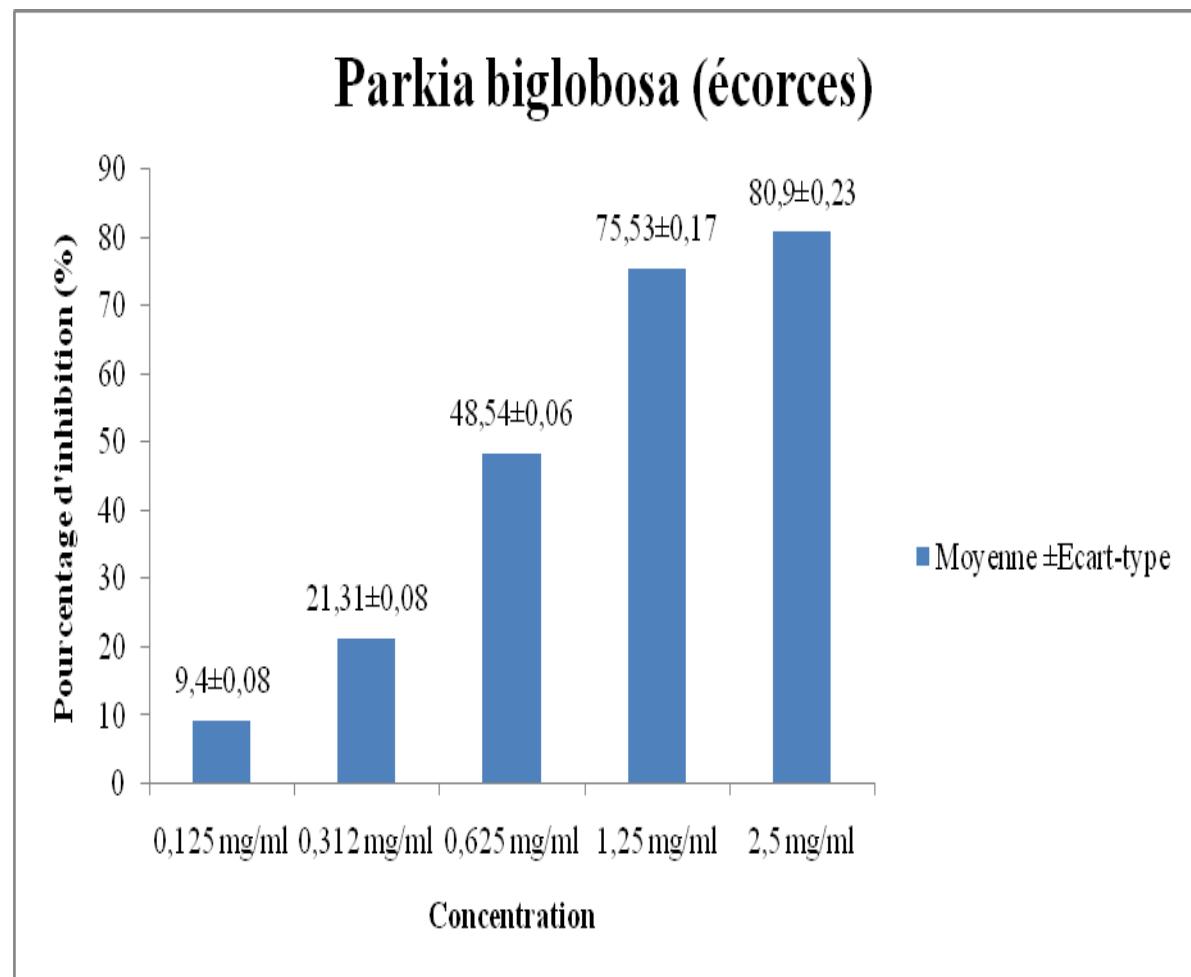
L'action de l'extrait méthanolique de la poudre d'écorce de *Parkia biglobosa* illustrée par la figure 13 montre une inhibition significative de la solution de DPPH et ceci à toutes les concentrations.

Aux différentes concentrations testées (0,125 mg/ml; 0,312 mg/ml; 0,625 mg/ml; 1,25 mg/ml; 2,5 mg /ml), on obtient respectivement des pourcentages d'inhibition de 9,4±0,08%; 21,31±0,08% ; 48,54±0,06%; 75,53±0,17 %; 80,9±0,23 %.

Cette activité s'est révélée dose dépendante. Plus la solution est concentrée plus l'activité est importante.

**Tableau III:** Effet piégeur de l'extrait méthanolique de l'écorce de *Parkia biglobosa* sur le radical DPPH.

Concentration	Abs. Ech.	Blanc	Blanc-Ech./Blanc	% Inhibition
<b>0,125 mg/ml</b>	1,61	1,751	0,0759	9,4±0,08
<b>0,312 mg/ml</b>	1,48	1,751	0,1541	21,31±0,08
<b>0,625 mg/ml</b>	1,39	1,751	0,2054	48,54±0,06
<b>1,25 mg/ml</b>	0,89	1,751	0,4896	75,53±0,17
<b>2,5 mg/ml</b>	0,34	1,751	0,8014	80,9±0,23

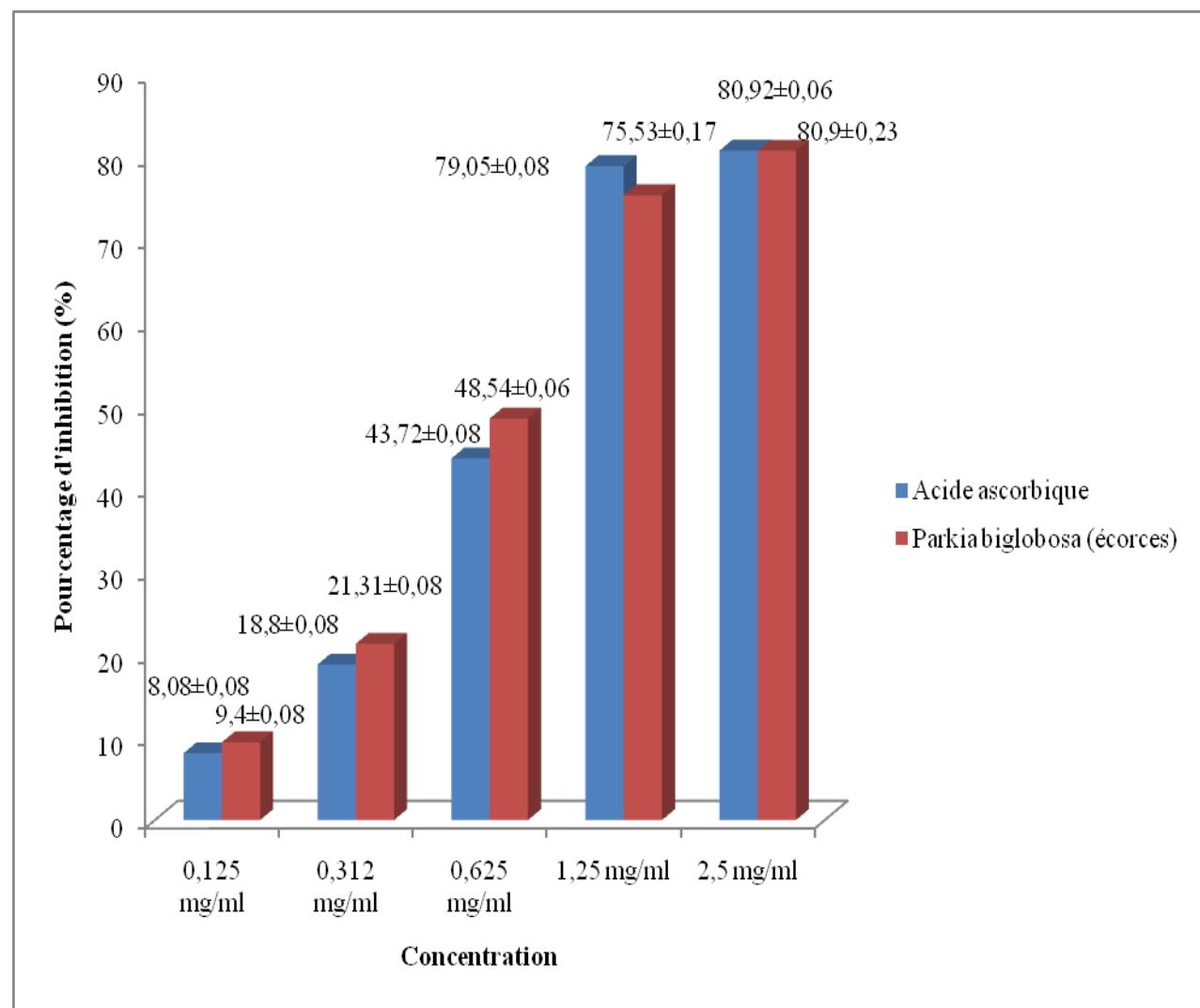


**Figure 13 : Action de l'extrait méthanolique d'écorce de *Parkia biglobosa* sur le DPPH**

**Tableau IV** : Pourcentage d'inhibition du DPPH (moyenne  $\pm$  Ecarts type) par l'acide ascorbique et l'extrait méthanolique d'écorce de *Parkia biglobosa*

	0,125 mg/ml	0,312 mg/ml	0,625 mg/ml	1,25 mg/ml	2,5 mg/ml
<b>Ac. Ascorbique</b>	8,08 $\pm$ 0,08%*	18,8 $\pm$ 0,08%*	43,72 $\pm$ 0,08%*	79,05 $\pm$ 0,08%*	80,92 $\pm$ 0,06%*
<b><i>P. biglobosa</i></b>	9,4 $\pm$ 0,08%	21,31 $\pm$ 0,08%	48,54 $\pm$ 0,06%	75,53 $\pm$ 0,17%	80,9 $\pm$ 0,23%

\* p < 0,05 par rapport à la solution DPPH.



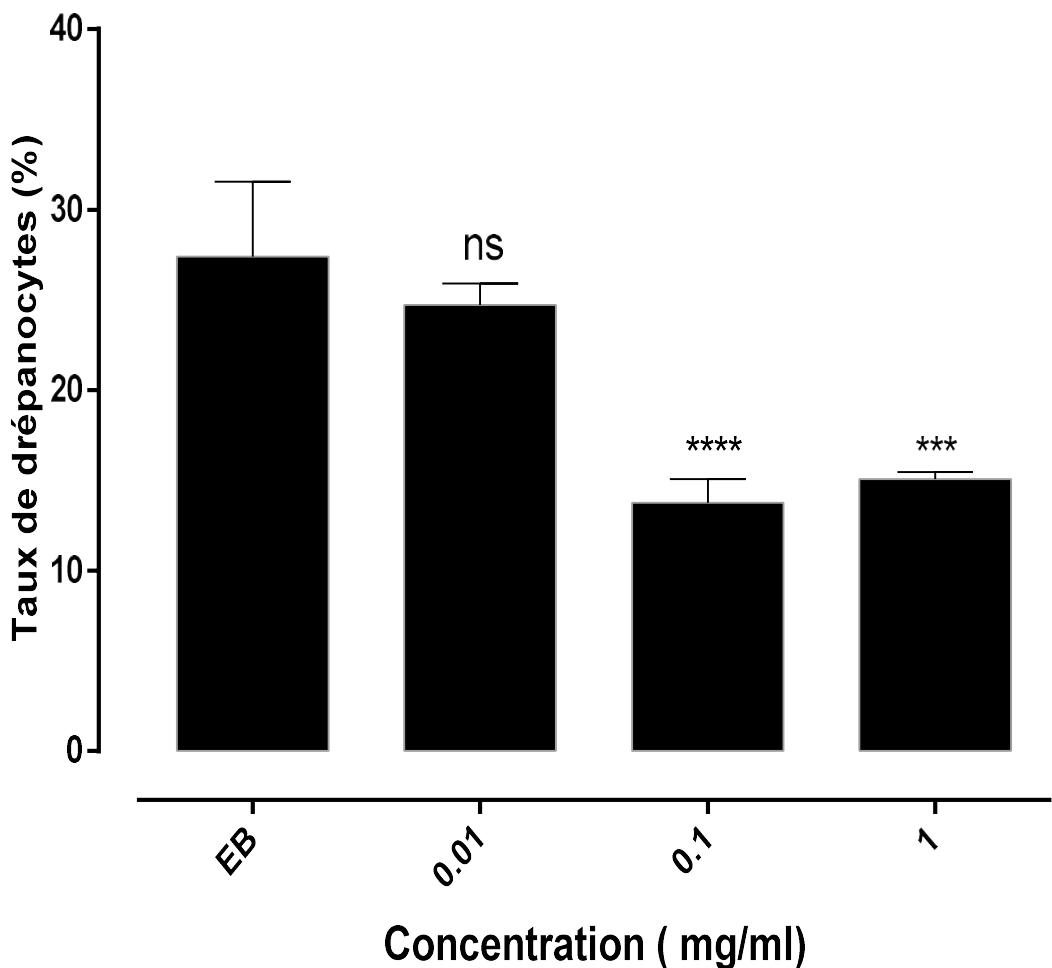
**Figure 14:**Résultats comparatifs des effets de l'acide ascorbique et de l'extrait d'écorce de *P. biglobosa* sur le radical DPPH.\* P < 0,05 : différence significative versus témoin négatif (solution de DPPH) ; n=3 pour chaque mesure.

Les résultats comparatifs des pourcentages d'inhibition de l'acide ascorbique et de l'extrait d'écorce *P. biglobosa* sur le radical DPPH illustrés dans le tableau IV et la figure 14 montrent qu'à toutes les concentrations testées, l'extrait méthanolique de la poudre d'écorce de *P. biglobosa* et celui de l'acide ascorbique (témoin positif) présentent une activité antioxydante significative,  $P < 0,05$  par rapport au blanc (témoin négatif). Il est à noter qu'aux différentes concentrations (0,125 mg/ml; 0,312 mg/ml; 0,625 mg/ml), l'extrait d'écorce de *P. biglobosa* présente la meilleure activité. Cependant, à la plus forte concentration (2,5mg /ml), on a les pourcentages d'inhibition des deux produits qui se rapprochent avec respectivement pour l'acide ascorbique ( $80,92 \pm 0,06\%$ ) et l'extrait méthanolique de poudre d'écorce *P. biglobosa* ( $80,9 \pm 0,23\%$ ).

**❖ PROPRIETES ANTI DREPANOCYTAIRE DE L'EXTRAIT  
METHANOLIQUE DE POUDRE D'ECORCE DE *P. biglobosa***

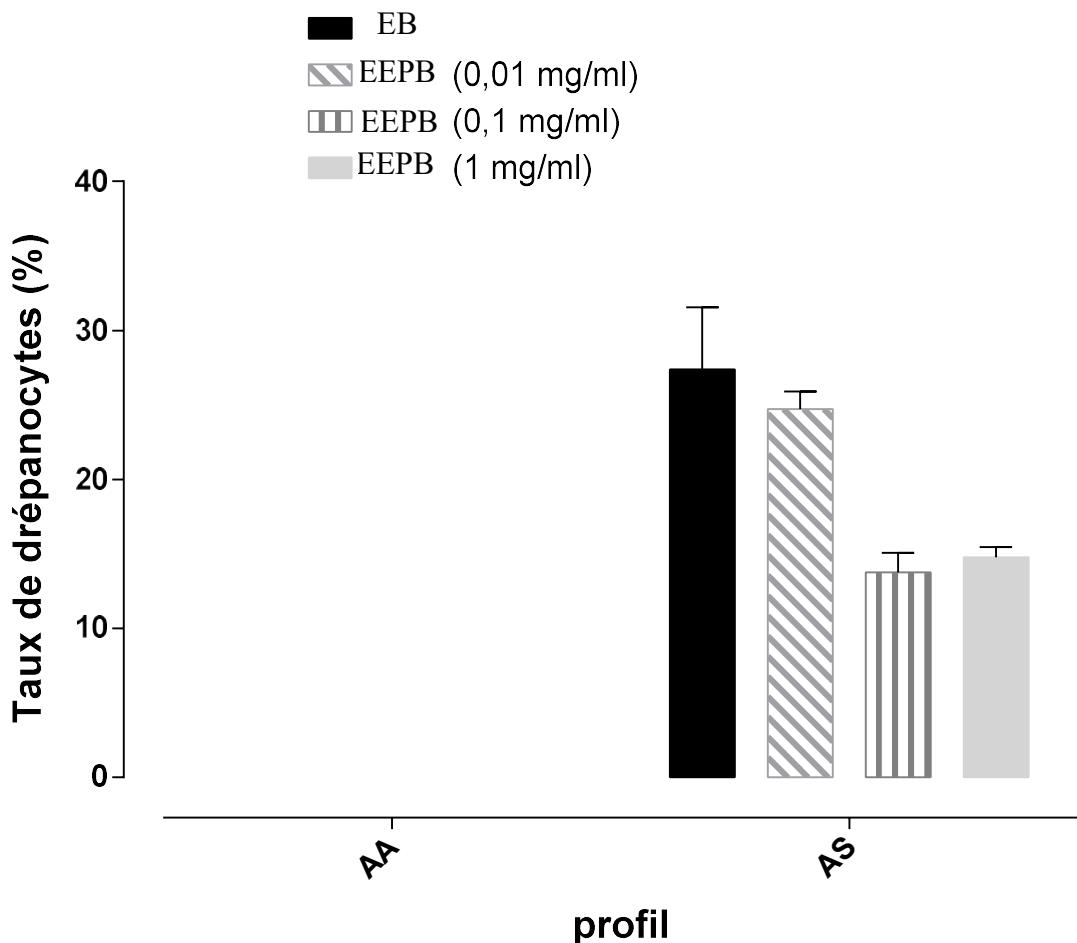
**Tableau V** : pourcentage de drépanocytes en fonction de la concentration en extrait méthanolique d'écorces de *Parkia biglobosa*

	% de drépanocytes			% moyen
	N=1	N=2	N=3	
ETATBASAL	35,2%	21%	26%	27,40%
$10^{-2}$ mg/ml	26,6%	25%	22,6%	24,73%
$10^{-1}$ mg/ml	16,2%	11,7%	13,4%	13,77%
1 mg/ml	15,5%	15,4%	14,3%	15,07%



**Figure 15 :** Effets de l'extrait d'écorce de *Parkia biglobosa* ( $10^{-2}$  mg/ml,  $10^{-1}$  mg/ml, 1 mg/ml) sur la falciformation des hématies chez les porteurs du trait drépanocytaire AS. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM et la différence est considérée comme significative si \*  $p < 0,05$  ; \*\*\* $p < 0,001$  par rapport à l'état basal ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  par rapport à l'état basal.  $n = 3$  pour chaque mesure

✚ L'extrait de *Parkia biglobosa* aux doses de  $10^{-1}$  mg/ml et 1mg/ml induit une diminution significative du taux de drépanocytes chez les sujets drépanocytaires AS. Cette diminution est dose dépendante comme le montre le tableau V et la figure 14



**Figure 15 :** Effets cumulés de l'extrait d'écorce de *Parkia biglobosa* ( $1 \text{ mg/ml}$ ,  $10^{-1} \text{ mg/ml}$ ,  $10^{-2} \text{ mg/ml}$ ) sur la falcification des hématies chez les porteurs du trait drépanocytaire AS et chez les témoins normaux AA. n = 3 pour chaque mesure

✚ L'extrait de *Parkia biglobosa* a induit une baisse significative du taux de drépanocytes chez les drépanocytaires AS. Le même extrait n'a eu aucune activité après incubation avec des hématies de sujet AA utilisées comme témoin, ceci est dû à l'absence de falcification chez ces dernières (figure15).

# **DISCUSSION**

L'objectif de notre étude était d'évaluer les propriétés antioxydantes et anti falcémiantes d'un extrait méthanolique d'écorce de *Parkia biglobosa*.

Nous avons procédé à l'extraction par macération en utilisant du méthanol pur comme solvant d'extraction. Le méthanol a été choisi pour sa capacité à extraire des composés polaires tels que les polyphénols, la vitamine C.

Pour évaluer l'activité antioxydante de l'extrait, nous avons utilisé le test au DPPH (1,1 diphényl-2-picrylhydrazine) selon le protocole décrit par Scherer et al. en 2009 (41).

Le DPPH, un radical libre de couleur violette est réduit en un composé de couleur jaune en présence de composés anti radicalaires. L'intensité de la coloration mesurée au spectrophotomètre est inversement proportionnelle à l'activité anti radicalaire des composés dont on cherche à déterminer l'activité. Cette méthode permet en absence de tout artéfact significatif de dire dès lors que la tendance est établie, que la drogue testée, renferme une ou des substances douées d'activité antioxydante. Cependant, elle ne permet en aucun cas d'affirmer en l'absence de tendance que la drogue testée ne renferme pas de substances ayant des propriétés antioxydantes. En effet, les substances contenues dans l'extrait bien qu'étant douées de propriétés antioxydantes peuvent avoir un mécanisme d'action différent de celui mis en jeu dans le piégeage du DPPH.

L'activité antifalcémante a été déterminée en incubant l'extrait d'écorce de *P. biglobosa* avec des hématies de sujets drépanocytaires de phénotype AS en situation d'hypoxie. Les pourcentages d'hématies falciformes ont été déterminés par comptage au microscope optique, et comparés aux témoins (hématies de sujet drépanocytaire AS non incubées avec l'extrait d'écorce de *P. biglobosa*)

➤ Les résultats obtenus montrent une activité antioxydante significative de l'extrait d'écorce de *P. biglobosa*  $P<0,05$  par rapport au blanc (solution DPPH).

A toutes les concentrations testées (0,125 mg/ml; 0,312 mg /ml; 0,625 mg/ml ; 1,25 mg/ml; 2,5 mg /ml), nous avons respectivement des pourcentages d'inhibitions de  $9,4\pm0,08\%$ ;  $21,31\pm0,08\%$  ;  $48,54\pm0,06\%$ ;  $75,53\pm0,17\%$ ;  $80,9\pm0,23\%$ .

Dès lors on peut dire que l'activité est dose dépendante sur le radical synthétique DPPH.

Les pourcentages d'inhibition de notre extrait sont supérieurs à ceux de l'acide ascorbique sauf pour les doses les plus élevées où cette dernière est légèrement supérieure (voir **tableau IV**).

- Les résultats indiquent également que l'extrait méthanolique d'écorce *de Parkia biglobosa* inhibe la falcification des hématies en conditions d'hypoxie créée par l'addition du métabisulfite de sodium 2%.

En effet, aux différentes concentrations testées, exceptée pour la concentration la plus faible, les résultats montrent une diminution significative de la proportion de cellules drépanocytaires (**tableau V**) ; cette diminution est dose dépendante.

Le screening chimique réalisé sur l'écorce *de Parkia biglobosa* démontre qu'elle contient des polyphénols dont notamment les anthocyanes. La présence de ces anthocyanes pourrait justifier en partie l'activité anti falcémiant observée (35).

L'inhibition de la falcification des erythrocytes est généralement attribuée à l'inhibition de la polymérisation de l'hémoglobine S. Il est, en effet, connu que la formation des tactoïdes intra-érythrocytaires est à la base de la modification phénotypique des globules rouges du sang SS (8).

L'interaction de certains métabolites extraits des plantes avec l'hémoglobine S permettrait d'inhiber sa polymérisation empêchant ainsi la falcification des erythrocytes. Il a été récemment démontré que les anthocyanes réduiraient non seulement la polymérisation de l'hémoglobine S mais aussi elles agiraient également en stabilisant la membrane des erythrocytes (29; 30; 35).

En plus de la falcification, il est aussi bien établi que les erythrocytes des sujets SS contiennent une proportion relativement plus élevée en méthémoglobin que ceux des sujets de phénotype AA. Or, on sait que l'augmentation de la proportion de la méthémoglobin diminue l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène, le fer à l'état oxydé n'étant pas en mesure de fixer cette molécule indispensable à la vie.

L’oxydation de l’hémoglobine ( $\text{Fe}^{2+}$ ) en méthémoglobine ( $\text{Fe}^{3+}$ ) est due au stress oxydatif important dans les drépanocytes (30; 35).

Ainsi, la forte teneur en composés réducteurs et en dérivés anthocyaniques de l’extrait méthanolique d’écorce de *Parkia biglobosa* pourrait expliquer ses propriétés anti-drépanocytaires par une double activité :

- Antioxydante : Par la diminution du stress oxydatif (diminution de la méthémoglobine)
- Anti falcémiant : inhibition de la polymérisation de l’Hémoglobine S et stabilisation de la membrane érythrocytaire.

Il serait intéressant par ailleurs de faire une séparation chromatographique de l’extrait méthanolique d’écorce de *Parkia biglobosa* et déterminer avec précision les fractions possèdant les meilleures activités antioxydantes et anti falcémiantes.

En outre l’exploration des mécanismes mis en jeu et l’étude de la toxicité seraient des pistes de recherche intéressantes pour compléter notre étude.

# **CONCLUSION**

Chaque année, quelque 300 000 enfants naissent avec une anomalie majeure de l'hémoglobine et l'on recense plus de 200 000 cas de drépanocytose en Afrique. (OMS, 2006).

Au Sénégal, nous avons 10 % de porteurs du gène de la drépanocytose et 0,5 % des naissances (1700 par an) sont porteurs de SDM. La drépanocytose constitue dès lors un réel problème de santé publique.

La prise en charge de cette affection est relativement couteuse comparée au niveau de vie moyen de la population sénégalaise. La greffe de moelle reste à ce jour le meilleur traitement pour les formes les plus sévères de drépanocytose mais reste inaccessible pour la plupart des malades.

La phytothérapie devient donc une alternative pour la prise en charge de cette affection, d'autant que la pharmacopée africaine en générale et sénégalaise en particulier est largement riche de plantes présentant des propriétés anti drépanocytaires intéressantes.

Au terme de cette étude, les résultats ont montré que l'extrait méthanolique d'écorce de *Parkia biglobosa* possède des propriétés anti falcémiantes et antioxydantes importantes ex vivo.

L'exploration de l'activité in vivo des extraits d'écorce de *Parkia biglobosa* pourrait être menée en complément à ce travail et permettrait de démontrer tout l'intérêt de l'espèce dans le traitement de la drépanocytose.

De même la séparation chromatographique de l'extrait permettrait de préciser les composés les plus actifs.

## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- 1. Atkin MA, Gasper A, Ullegaddi R, (2005).** Oxydative susceptibility of unfractioned serum or plasma : response to antioxidants *in vitro* and to antioxidants supplementation. *Clin Chem*, 2005, 51, 2138-2144.
- 2. Backer HG & Harris BJ (1957).** The pollination of *Parkia* by bats and its attendant evolutionary problems. *Evolution* 11: 449-460.
- 3. Balla J, Jacob HS, Nath, K, Eaton JW, Vercelotti GM. (1993).** Endothelial-cell heme uptake from heme proteins : induction of sensitisation and desensitization to oxidant damage. *Proc Natl Acad Sci* 90 (20) : 9285-9289.
- 4. Bonnah B, Akikokou KA, Akpagana K, Gbeassor M (1998).** Contribution à l'étude des propriétés pharmacologiques des extraits hydro-alcooliques des graines de *Parkia biglobosa*, Sciences & Médecine, Revue CAMES, n° 00 pp 12-15
- 5. Bonkoungou EG (1987).** Monographie du néré, *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth.: espèce à usages multiples. IRBET/CNRST, Ouagadougou 69p.
- 6. Burkill HM (1995).** The useful plants of West Tropical Africa, 2nd Edition, Hare J.—Nitroso-redox balance in the cardiovascular system. *N Engl J Med*, 2004, 351, 2112-2114.
- 7. Delattre J, Beaudeux J-L, Bonnefont-Rousselot D.** *Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques*. Première édition. Ed. Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 2005, 547 pages.
- 8. Elion J, Labie D. (1996).** Bases physiopathologiques moléculaires et cellulaires du traitement de la drépanocytose. *Hématologie*, 2: 499-510.
- 9. Feur S, Niezgoda CJ & Nevling LI (1985).** Ultrastructure of *Parkia* polyads (Mimosoideae: Leguminosae). *American Journal of Botany* 72: 1871-1890
- 10. Glasscock, RJ, Massry SG (1995).** Hematuria and pigmenturia. In (eds) Textbook of Nephrology, vol 1, 2nd edn. Baltimore: Williams and Wilkins, 1995; 557-566.
- 11. Guinko S, Pasgo LJ (1992).** Récolte et commercialisation des produits non ligneux des essences forestières locales dans le département de Zitenga, au Burkina Faso. *Unasylva* 43: 16-19.
- 12. Gutteridge JMC. (1995).** Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *ClinChem* 41 (12) : 1819-1828
- 13. Haber F, Weiss J (1934).** the catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc A* 147 : 332

- 14. Hall JB, Thomlinson HF, Oni PI, Buchy M, Aebsicher DP (1997).** A monograph of *Parkia biglobosa*. School of Agricultural and Forest Sciences Publication No9, Bangor, University of Wales, 107p.
- 15. Hopkins HC, Hopkins MJG (1982).** Predation by snake of a flower-visiting bat at *Parkia nitida* (Leguminosae: Mimosoideae). *Brittany* 34: 225-227.
- 16. Hopkins HC (1983).** The taxonomy, reproductive biology and economic potential of Parkia (Leguminosae: Mimosoideae) in Africa and Madagascar. *Botanical Journal of the Linnean Society* 87: 135-167.
- 17. Hopkins HC (1986).** Parkia (Leguminosae: Mimosoideae). *Flora Neotropica Monograph*, 43: 1-124.
- 18. Hozawa A, Jacobs D, Steffes M, et al (2007).** Relationships of circulating carotenoid concentrations with several markers of inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction: the Coronary Artery Risk Developpement in Young Adults (CARDIA)/ Young Adult Longitudinal Trends in Antioxidants (YALTA) Study. *Clin Chem*, 2007, 53, 1-9.
- 19. Imaga NOA, Gbenle GO, Okochi VI, Akanbi SO, Edeoghon SO, Oigbochie V, Kehinde MO, Bamiro SB(2009).** Antisickling property of *Carica papaya* leaf extract. *African Journal of Biochemistry Research*, 3(4): 102-106.
- 20. Langsjoen PH, Langsjoen AM (2003).** The clinical use of HMG CoA – reductase inhibitors and the associated depletion of coenzyme Q10 - A review of animal and human publications. *Biofactors*, 2003, 18, 101-111.
- 21. Lim SK, Kim H, Ali A, Lim YK, Wang Y, Chong SM, Costantini F, Baumann H (1998).** Increased susceptibility in Hp knockout mice during acute hemolysis. *Blood*.92 (6) : 1870-1877
- 22. Lim YK, Jenner A, Ali AB, Wang Y, Hsu SI, Chong SM, Baumann H, Halliwell B, Lim SK (2000).** Haptoglobin reduces renal oxidative DNA and tissue damage during phenylhydrazine-induced hemolysis. *Kidney Int.* 58 (3) : 1033-1044.
- 23. Lim SK, Ferraro B, Moore K, Halliwell B (2001).** Role of haptoglobin in free hemoglobin metabolism. *Redox Report* 6 (4) : 219-227.
- 24. Luckow M, Lewis G, Schrire B, Mackinder B, Lock M (2005).** (eds) Mimoseae. In Legumes of the world. RBG Kew, pp 163-183.
- 25. Luckow M & Hopkins HCF (1995).** A cladistic analysis of Parkia (Leguminosae: Mimosoideae). *American Journal of Botany* 82: 1300-1320

- 26. Mangenot S &Mangenot G (1957).** Nombres chromosomiques nouveaux chez diverses dicotylédones et monocotylédones d'Afrique occidentale. Bulletin du Jardin Botanique de l'Etat, Bruxelles, 27: 639-654.
- 27. Melamed-Frank M, Lache O, Enav BI, Szafranek T, Levy NS, Ricklis RM (2001).** Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin Blood 98 (13) : 3693-3698.
- 28. Moison RM, Palinckx JJ, Roest M, Houdkamp E, Berger HM. (1993).** Induction of lipid peroxidation of pulmonary surfactant by plasma of preterm babies. Lancet 341 (8837) :79-82.
- 29. Mpiana PT, Mudogo V, Tshibangu DS, Kitwa EK, Kanangila AB, Lumbu JB, Ngoboua KN, Atibu EK, Kakule MK(2008).** Antisickling activity of anthocyanins from *Bombax pentadrum*, *Ficus capensis* and *Ziziphus mucronata*: photo degradation effect. *J Ethnopharmacol.*,120: 413-418.
- 30. Mpiana PT, Ngoboua KN, Bokota MT, Kasonga TK, Atibu EK, Tshibangu DS, Mudogo V(2010).** *In vitro* effects of anthocyanin extract from *Justicia secunda* Vahl on the solubility of haemoglobin S and membrane stability of sickle erythrocytes. *Blood Transfus.*,8:248-254
- 31. Muhammad S &Amusa NA (2003).** Distribution and socio-economics of two leguminous tree species. Global Journal of Agriculture Sciences 2: 122-126
- 32. Nacoulma-Ouédraogo O (1996).** Plantes médicinales et Pratiques médicales traditionnelles au Burkina Faso: cas du plateau central. Tome I. Thèse de Doctorat d'Etat es Sciences Naturelles. Université de Ouagadougou, 320 pp.
- 33. Nakajima K, Nakano T, Tanaka A.** The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis : The comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. *Clin Chim Acta*, 2006, 367, 36-47.
- 34. Ndir B, Lognay G, Wathelet B, Cornelius MM &Thonart P (2000).** Chemical composition of netetu, a food condiment from fermented *Parkia biglobosa* seeds. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 4: 101-105.
- 35. Ngoboua KN(2012).** Evaluation de l'activité antidiépanocytaire et antipaludique de quelques taxons végétaux de la RD Congo et de Madagascar. Thèse de Doctorat, Université de Kinshasa, Kinshasa, 300p. Gutteridge, 1995 Volume3. Royal Botanical Gardens, Kew. 857p.
- 36. Nikiéma A (1993).** Regeneration of *Parkia biglobosa* (Jacq.) R. Br; ex G. Don in an agroforestry system. A pilot study in Burkina Faso. Thesis for MSc. degree in Tropical Forestry. Wageningen Agricultural University. 42p.

- 37. Omafuvbe BO, Falade OS, Osuntogun BA & Adewusi SRA (2004).** Chemical and biochemical changes in African locust bean (*Parkia biglobosa*) and Melon (*Citrus vulgaris*) seeds during fermentation to condiments. *Pakistan Journal of Nutrition* 3: 140-145.
- 38. Ouédraogo AS (1995).** *Parkia biglobosa* (Leguminosae) en Afrique de l'Ouest: Biosystématique et Amélioration. These doctorat Wageningen University, Institute for Forestry and Nature Research, IBN-DLO.205p.320 pp.
- 39. Ouoba LII, Rechinger KB, Barkholt V, Diawara B, Traoré AS & Jakobsen M (2003).** Degradation of proteins during the fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) by strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* for production of soumbala. *Journal of Applied Microbiology* 94: 396-402.
- 40. Saad A, Virella G, Chassereau Ch, et al (2006).** Ox LDL immune complexes activate complement and induce cytokine production by MonoMac 6 cells and human macrophages. *J Lipid Res*, 2006, 47, 1975-1983.
- 41. Sadrzadeh SMH, Graf E, Panter SS, Hallaway PE, Eaton JW (1984).** Hemoglobin, a biologic Fenton reagent. *J Biol Chem* 259 (23) : 14354-14356.
- 41. SCHERER R. & GODOY H.T(2009).** Antioxidant activity index (AAI) by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, v.112, p.654-658, 2009.
- 42. Sanou H, Kambou S, Teklehaimanot Z, Dembélé D, Yossi H, Sina S, Djingdia L & Bouvet JM (2004).** Vegetative propagation of *Vitellaria paradoxa* by grafting. *Agroforestry Systems* 60: 93-99.
- 43. Tam SC, Wong JT (1988).** Impairment of renal function by stroma-free hemoglobin in rats. *J Lab Clin Med* 111 (2) : 189-93.
- 44. Teklehaimanot Z, Tomlinson H, Lemma T & Reeves K (1996).** Vegetative propagation of *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth., an undomesticated fruit tree from West Africa. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 71: 205-215.
- 45. Teklehaimanot Z (2004a).** Exploiting the potential of indigenous agroforestry trees: *Parkia biglobosa* and *Vitellaria paradoxa* in sub-Saharan Africa: new visitas in agroforestry. *Agroforestry systems* 61: 207-220.
- 46. Timmer LA, Kessler JJ & Singerland M (1996).** Pruning of néré trees (*Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth.) on the farmlands of Burkina Faso, West Africa. *Agroforestry Systems* 33: 87-98
- 47. YAKETCHA N (1988).** Les utilisations traditionnelles du Néré ou *Parkia biglobosa* (Jacq) Benth. (*Mimosaceae*) Thèse: Pharmacie: Dakar; 31

**48. YomalanKassiKadjo J, Aka Kouakou J-C, Abo Arsène Méa, Sémi A, Néné Bi & Ehouan E, Ehilé (2008).**Effet antihypertensif d'un extrait aqueux d'écorce de tronc de *Parkia biglobosa* (mimosaceae) sur la pression artérielle de lapin. *Sciences & Nature Vol. 5 N°2 : 133 - 143*

## **Résumé**

La drépanocytose constitue la principale anomalie de l'hémoglobine en Afrique et au Sénégal, causant ainsi une grande morbidité chez les sujets concernés.

En effet, 300 mille naissances avec des anomalies majeures de l'hémoglobine sont dénombrées chaque année à travers le monde dont 200 mille cas de drépanocytose en Afrique ; au Sénégal ce sont 0,5 % des naissances qui sont concernées soit plus de 10% de la population qui sont porteurs du trait drépanocytaire.

Les traitements mis à la disposition des malades sont cependant assez coûteux et relativement inaccessibles pour une bonne partie des drépanocytaires étant donné le caractère chronique de la maladie et la nécessité d'une prise en charge continue.

Il apparaît donc nécessaire de trouver des solutions palliatives accessibles économiquement et efficaces cliniquement.

En ce sens, la phytothérapie pourrait être une alternative intéressante ; en effet de nombreuses plantes de la pharmacopée traditionnelle africaine semblent posséder des propriétés anti drépanocytaires, parmi celles-ci figurent *Parkia biglobosa* utilisée par certains tradipraticiens pour le traitement de la drépanocytose mais donc le mécanisme d'action reste à élucider.

C'est ainsi que nous nous sommes fixé comme objectifs :

- Dans un premier temps d'évaluer les propriétés antioxydantes de l'extrait d'écorce de *P. biglobosa*
- Dans un second temps d'évaluer ses propriétés anti drépanocytaires.

Notre étude c'est déroulée au niveau des laboratoires de physiologie pharmaceutique de la faculté de Médecine de Pharmacie et d'odontologie de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar et d'analyse biomédicales du centre hospitalier Youssou Mbargane Diop de Rufisque.

Nos résultats ont montré que l'extrait méthanolique d'écorce de *P. biglobosa* possède des propriétés anti oxydantes significatives et dose-dépendantes ex vivo supérieures à celles d'une solution de référence d'acide ascorbique aux mêmes concentrations.

D'autre part, nos résultats ont montré des propriétés anti falcémiantes significatives et dose-dépendantes ex vivo de l'extrait méthanolique d'écorce de *P. biglobosa* à toutes les concentrations testées excepté celle la plus faible.

La corrélation entre le stress oxydatif et la drépanocytose étant bien documentée dans la littérature, *Parkia biglobosa* présente des potentialités intéressantes dans la prise en charge de cette pathologie du fait notamment de ses propriétés antioxydantes. Cependant, au vu de nos résultats, des études supplémentaires seraient intéressantes pour compléter ce travail dans les données in vivo, mais aussi une séparation chromatographique de l'extrait pour isoler les composants ayant les meilleures activités antioxydantes et anti drépanocytaires.