

# Profil phytochimique, pharmaco-biologique et cytotoxique des feuilles de *Uvariadendron molundense* (Annonaceae)

R.D. DJOLU<sup>1</sup>, K.N. NGBOLUA<sup>2</sup>, J.B. ITEKU<sup>2</sup>, C.A. MASENGO<sup>1</sup>, D.D. TSHILANDA<sup>3</sup>, P.T. MPIANA<sup>3</sup>

(Reçu le 06/02/2023; Accepté le 27/04/2023)

## Résumé

La présente étude a pour but l'étude phytochimique et évaluation des activités antidrépanocytaire, anti-inflammatoire, antiradicalaire et cytotoxique des feuilles de *Uvariadendron molundense*, un produit forestier non ligneux (PFNL). Il ressort de cette étude que la poudre des feuilles de ce PFNL contient les éléments histologiques caractéristiques tels que les fragments de parenchyme, les cristaux d'oxalates de calcium, les fibres, les vaisseaux annelés, les grains d'amidon et les fragments de vaisseaux ponctués. Il contient également les tanins, les saponosides, les flavonoïdes, les acides phénols, les iridoïdes, les anthocyanes, les anthrones, les anthraquinones et les terpènes. La teneur en polyphénols totaux est de  $442 \pm 1,1$  mg EAG/g d'extrait et tandis que celle des flavonoïdes totaux est de  $7,0 \pm 0,18$  mg EQ/g d'extrait. L'activité antiradicalaire du percolât est supérieure à celle du décocté et les feuilles de *U. molundense* ne sont pas cytotoxique (%Hémolyse  $<50$  à  $1000 \mu\text{g/mL}$ ). Ces feuilles ont des propriétés anti-inflammatoires qui est cependant faible pour le décocté (%I =  $35,8 \pm 4,9$ ) et moyenne pour le percolât (%I =  $50 \pm 3,3$ ). Le décocté et le percolât des feuilles de *U. molundense* ont des propriétés antifalcémiantes *in vitro*. Il est donc souhaitable qu'une étude phytochimique plus approfondie soit réalisée sur les feuilles de *U. molundense* afin d'identifier ses molécules actives.

**Mots clés:** *Uvariadendron molundense*, Produit forestier non ligneux, alicament, drépanocytose, Médecine Traditionnelle

## Phytochemical, pharmaco-biological and cytotoxic profile of the leaves of *Uvariadendron molundense*

### Abstract

The aim of present study was to investigate and evaluate the phytochemical of the anti-sickle cell, anti-inflammatory, anti-free radical and cytotoxic activities of the leaves of *Uvariadendron molundense*, a Non-timber forest product (NTFP). The study found that the leaf powder of this NTFP contains the characteristic histological elements such as parenchyma fragments, calcium oxalate crystals, fibres, ringed vessels, starch grains and punctate vessel fragments. It also contains tannins, saponosides, flavonoids, phenolic acids, iridoids, anthocyanins, anthrones, anthraquinones and terpenes. The content of total polyphenols is  $442 \pm 1.1$  mg GAE/g extract and that of total flavonoids is  $7.0 \pm 0.18$  mg QE/g extract. The antiradical activity of the percolate is higher than that of the decoctate and *U. molundense* leaves are not cytotoxic (%Hemolysis  $<50$  to  $1000 \mu\text{g/mL}$ ). These leaves have anti-inflammatory properties that are low for the decoction (%I =  $35.8 \pm 4.9$ ) and medium for the percolate (%I =  $50 \pm 3.3$ ). Both the decoctate and the percolate of *U. molundense* leaves have *in vitro* antisickling properties. It is therefore desirable that further phytochemical studies be carried out on the leaves of *U. molundense* to identify the active molecules.

**Keywords:** *Uvariadendron molundense*, Non-timber forest product, medicinal product, sickle cell disease, traditional medicine

## INTRODUCTION

La drépanocytose est une maladie génétique qui se caractérise par la présence de l'hémoglobine anormale S (Hb S) dans le sang. Il s'agit d'une maladie autosomique récessive, d'expression variable (Ngbolua, 2019; Cheikhouna, 2021; Masengo *et al.*, 2021a). La présence de Hb S est la conséquence d'une mutation ponctuelle sur le sixième codon du gène  $\beta$  globine porté par le chromosome 11 chez l'homme. Il s'agit de la substitution d'une adénine par la thymine (GAG  $\rightarrow$  GTG) aboutissant au remplacement, au niveau de la chaîne  $\beta$  globine, de l'acide glutamique en position 6 par la valine hydrophobe (Giroto *et al.*, 2003; Cheikhouna, 2021). La drépanocytose est un problème de santé publique étant donné que le taux de prévalence est très élevé dans le monde et en particulier en Afrique. En Afrique centrale et de l'Ouest, 20 à 40% des sujets sont porteurs du trait drépanocytaire. En République Démocratique du Congo (RDC), plus de 2% de la population est touchée par cette maladie, soit près d'un million et demi d'individus (Mpiana *et al.*, 2007; Tshilanda *et al.*, 2015). Plusieurs options thérapeutiques ont été mises au point pour lutter contre la drépanocytose, cependant, celles-ci n'apportent pas le succès souhaité et sont soit onéreuses, soit toxiques, et ne sont pas accessibles aux populations à faibles revenus (Mpiana

*et al.*, 2007). Pour contourner les limites des options thérapeutiques mises au point par la médecine moderne, la phytothérapie est une alternative crédible pour laquelle la majorité des malades y recourent (Mpiana *et al.*, 2010a, b, c; Mpiana *et al.*, 2011; Masengo *et al.*, 2021b). Les plantes médicinales fournissent non seulement un ingrédient actif, mais aussi une multitude de composés aux effets thérapeutiques complémentaires, formant un complexe biochimique équilibré. Cependant, il faut faire preuve de prudence dans leur utilisation, car souvent l'utilisation abusive et incontrôlée de ces plantes pourrait exposer les individus à des effets secondaires malgré la présence des composés actifs (Gueyraud *et al.*, 2019). En effet, les doses utilisées pour les différents traitements traditionnels sont imprécises, c'est pourquoi l'évaluation de l'efficacité et de la toxicité des biomolécules responsables des propriétés médicinales de *Uvariadendron molundense* s'avère nécessaire pour éviter les risques réels d'accidents thérapeutiques.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), plus de 80% de la population en Afrique, d'une manière générale et en République Démocratique du Congo (RDC) en particulier, recourent à la médecine traditionnelle pour résoudre le problème de santé primaire. Le recours aux plantes médicinales pour divers problèmes de santé est

<sup>1</sup> Département de l'Environnement, Faculté des Sciences, Université de Gbado-Lite, RD Congo

<sup>2</sup> Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Kinshasa, RD Congo

<sup>3</sup> Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université de Kinshasa, RD Congo

non seulement un choix, mais serait aussi lié à la pauvreté et aux coûts élevés des médicaments modernes (Ngbolua *et al.*, 2011a, b). La RDC est un véritable réservoir de plantes médicinales alimentaires. Celles-ci jouent un rôle majeur dans le traitement de certaines maladies tropicales courantes dont la drépanocytose (Mpiana *et al.*, 2016; Ngbolua *et al.*, 2019; Djolu *et al.*, 2021). Cette hémoglobinopathie se caractérise par l'asplénie fonctionnelle et le dysfonctionnement du shunt des pentoses phosphates, cet état favorise la septicémie et la production des radicaux libres; d'où l'existence d'un état inflammatoire permanent chez les drépanocytaires homozygotes (Dembele, 2020). A cet effet, la prise en charge de la drépanocytose doit prendre en compte, en plus des causes intrinsèques, les aspects infectieux, inflammatoires et le stress oxydatif.

La présente étude a pour objectifs d'identifier les composés chimiques et d'évaluer l'activité anti-drépanocytaire, anti-inflammatoire, anti-radicalaire et cytotoxique des feuilles de *Uvariadendron molundense*. L'intérêt de cette étude est évident car en cas de validation des propriétés pharmacobiologiques des feuilles de cette plante, elle conduirait ainsi à la mise au point d'un phyto-médicament à large spectre d'action dont la commercialisation peut favoriser la mise en place effective du protocole de Nagoya sur le projet APA (Accès et partage des avantages issus de l'exploitation des ressources phytogénétiques) en République Démocratique du Congo.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Matériel

Le matériel végétal utilisé dans la présente étude est constitué de feuilles de *Uvariadendron molundense*. Les échantillons de sang ont prélevés chez les sujets drépanocytaires venus en consultation au Centre de Médecine Mixte et d'Anémie SS «CMMASS» de Kinshasa/Kalamu. L'échantillon de sang utilisé pour l'essai de cytotoxicité qualitatif et quantitatif a été prélevé auprès d'un volontaire sain. Les œufs de poule (*Gallus gallus*) ont été utilisés comme source de l'ovalbumine dans le test anti-inflammatoire.

### Méthodes

#### Récolte, traitement et conditionnement des échantillons

Les feuilles de *Uvariadendron molundense* utilisées dans la présente étude ont été récoltées au village Mbui (Latitude: 4°16'16" N; Longitude: 21°7'23" E; Altitude: 400 m au-dessus de la mer), dans le Territoire de Mobayi-Mbongo, Province du Nord-Ubangi. La figure 1 montre la localisation géographique du village Mbui dans la province du Nord Ubangi en RDC.

Après la récolte du matériel végétal, les échantillons ont été séchés pendant environ un mois à l'abri du soleil puis réduits en poudre à l'aide d'un broyeur électrique de marque HSMFM.

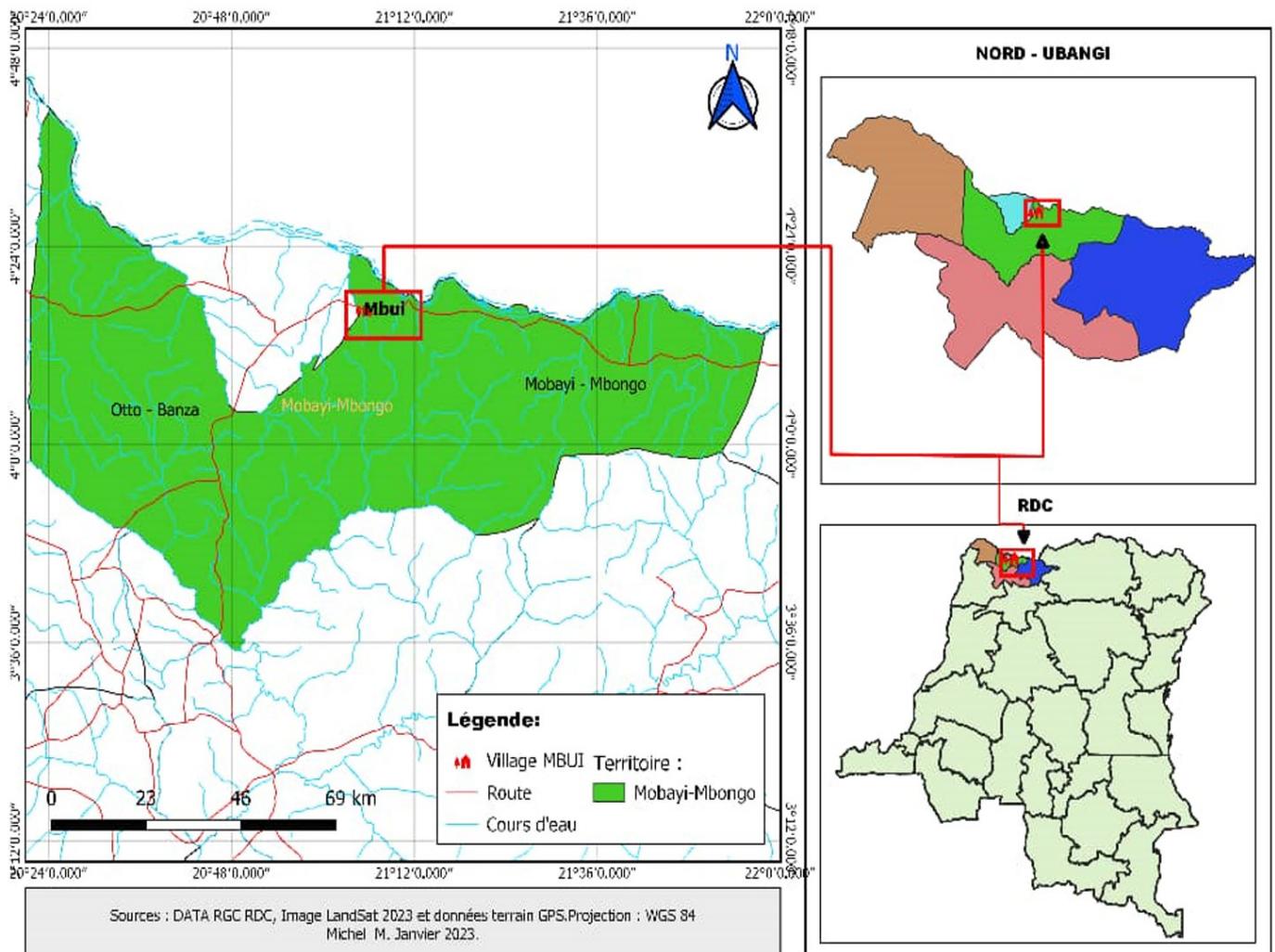


Figure 1: Localisation géographique du village Mbui et ses environs (Province du Nord-Ubangi, RD Congo)

### Micrographie des poudres

La micrographie optique des poudres a été réalisée selon le mode opératoire ci-après:

- Déposer sur une lame porte-objet 2 à 3 gouttes du réactif de Steinmetz;
- Laisser tomber avec précaution dans ce réactif, une petite quantité de poudre prélevée avec soin au moyen d'une fine spatule;
- Couvrir à l'aide d'une lamelle et appuyer légèrement pour homogénéiser la préparation;
- Absorber les bavures et essuyer le dessous de la lame porte-objet à l'aide d'un papier essuie-tout.
- Dès lors, on peut pratiquer l'examen micrographique (agrandissements, etc.).

La surface externe de la lamelle doit au préalable être débarrassée de toute trace de réactif ou de poudre à examiner. Il faut également veiller à effectuer des préparations très légères, de façon à bien répartir les tissus et à éviter des superpositions (Inkoto et al., 2021; Ngbolua et al., 2021b).

### Analyse phyto-chimique qualitative

#### Préparation des extraits de *U. molundense*

Les extraits ont été préparés par dissolution des poudres de la plante dans un solvant approprié selon le rapport 1:10 (p/v).

#### Réactions en solution

Les réactions de caractérisation ont été effectuées en tubes (tests en solution). Il s'agit en effet d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation.

#### Recherche de tanins totaux

A 2 mL de la solution obtenue au test général des flavonoïdes, on ajoute quelques gouttes d'une solution de chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) à 1%. L'obtention d'une coloration bleue foncée, noire ou verte indique la présence des tanins (Mpiana et al., 2007).

#### Recherche d'Alcaloïdes

1 g de drogue sont introduits dans un erlenmeyer à large col et additionnés de quelques gouttes de HCl 5% dans 5 mL d'eau distillée. On bouche et on laisse macérer 24 H, en agitant de temps en temps. On filtre sur un coton d'ouate. Sur 1 mL de filtrat, on ajoute 5 gouttes de réactif de Mayer (1,36 g de  $\text{HgCl}_2$  et 5 g de KI mis dans 100 mL d'eau). Pour le test de Mayer, prendre 100  $\mu\text{L}$  de filtrat et ajouter 1 goutte de réactif de Mayer. La présence d'alcaloïdes se manifeste par la formation d'un précipité blanc (Mpiana et al., 2007).

#### Recherche de Saponosides

Les saponines sont mises en évidence par l'indice de mousse qui est fourni par le degré de dilution d'un décocté aqueux de la drogue qui, dans des conditions déterminées donne une mousse persistante. Ainsi, dans une fiole conique de 500 mL, renfermant 100 mL d'eau bouillante, introduire 2 g de poudre de drogue. Maintenir une ébullition modérée pendant 30 minutes. Filtrer, ajuster le volume à 100 mL après refroidissement. Dans une série de 10 tubes à essai de 16 cm de haut et 16 mm de diamètre, mesurer successivement 1, 2, 3, 4..., 10 mL de décocté et ajuster le volume de chaque tube à 10 mL avec l'eau distillée.

Agiter chaque tube dans le sens de la longueur pendant 15 secondes: deux agitations par seconde, après avoir bouché avec le pouce. Laisser reposer pendant 15 minutes et mesurer la hauteur de la mousse. Si elle est inférieure à 1 cm dans tous les tubes, l'indice est inférieur à 100 (négligeable). Si elle est de 1 cm dans l'un des tubes, la dilution de la drogue dans ce tube est l'indice de mousse (Mpiana et al., 2007).

#### Screening phytochimique par Chromatographie sur Couche Mince (Ngbolua et al., 2021b)

##### Recherche des flavonoïdes et acides phénoliques

##### Préparation des échantillons

1 g de drogue pulvérisé est extrait sous agitation par 5 mL de méthanol durant 10 minutes, 10 mL de filtrat sont utilisés pour l'analyse CCM.

##### Conditions chromatographiques

- Phase stationnaire: Silicagel F<sub>254</sub>
- Phase mobile 1: acétate d'éthyle-acide formique-méthanol-eau (40:1:5:4)

Témoin: Acide chlorogénique et Rutine 1 mg/mL (méthanol) dépôt: 10  $\mu\text{L}$

- Phase mobile 2: dichlorométhane -acide formique-acétone (40:5:10)

Témoin: Acide gallique, Quercétine, Kampferol et acide rosmarinique: 1 mg/mL (méthanol) dépôt: 10  $\mu\text{L}$

- Détection: le chromatogramme, une fois développé, est observé sous UV à 254 et 366 nm puis est pulvérisé à l'aide du réactif de Neu (DPBAE/PEG) et observé sous UV à 366 nm. La présence de flavonoïdes se marque par la présence de spots fluorescents de couleurs diverses (jaune-orange-vert) variant en fonction de la structure des composés mis en évidence. Les fluorescences bleues sont souvent dues à des acides phénoliques.

##### Recherche des Iridoïdes

##### Préparation des échantillons

On utilise la solution préparée au test des flavonoïdes: Dépôts de 10  $\mu\text{L}$ .

##### Conditions chromatographiques

- Phase stationnaire: Silicagel F<sub>254</sub>
- Phase mobile: acétate d'éthyle-méthanol-eau (50:6,75:5)
- Révélation: acide sulfurique à 5% dans l'éthanol
- Chauffage 10 minutes à 100 °C.

Les iridoïdes vrais donnent des colorations et les autres terpènes se colorent en noir.

##### Recherche des Anthocyanes

##### Préparation des échantillons

On utilise la solution préparée au test des flavonoïdes: Dépôts de 10  $\mu\text{L}$ .

##### Conditions chromatographiques

- Phase stationnaire: Silicagel F<sub>254</sub>
- Phase mobile: acétate d'éthyle-acide formique -eau (50:5:20)

• Après mélange dans une ampoule à décanter, la phase inférieure qui se forme est éliminée, la phase supérieure est utilisée comme phase mobile.

- Témoin: D-catéchine

- Révélation: Vanilline phosphorique.

- Chauffage 10 minutes à 100 °C.

Les anthocyanes donnent des colorations roses.

*Anthraquinones (hétérosides anthracéniques)*

*Préparation d'échantillon*

On utilise la solution préparée lors du test des flavonoïdes.

*Conditions chromatographiques*

- Phase mobile: acétate d'éthyle-méthanol-eau (50: 6,75: 5)

- Révélation: Observation sous UV à 254 et 366 nm.

- Pulvérisation de KOH éthanolique à 10%.

Les anthraquinones sont colorées en rouge et donnent une fluorescence rouge à 366 nm et les anthrones (aloïne) donnent une couleur jaune.

*Terpènes*

*Préparation d'échantillons*

1 g de drogue pulvérisée est extrait sous agitation par 6 mL d'acétate d'éthyle durant 15 minutes (Dépôt de 10 µL).

*Conditions chromatographiques*

- Phase stationnaire: Silicagel F<sub>254</sub>

- Phase mobile: toluène-acétate d'éthyle (27:3)

- Témoin: Thymol, menthol, acide oléanique: 1 mg/mL (méthanol) dépôt: 10 µL

- Révélation: Vanilline sulfurique.

- Chauffage 10 minutes à 100 °C.

Les terpènes donnent diverses couleurs avec ce réactif.

*Coumarines*

*Préparation d'échantillon*

On utilise la solution préparée au test des terpènes: dépôt de 10 µL.

*Conditions chromatographiques*

- Phase mobile: toluène-éther (1:1, saturé avec l'acide acétique 10%).

- Mélanger 10 mL de toluène, 10 mL d'éther et 10 mL d'acide acétique à 10% dans une ampoule à décanter. La phase inférieure est éliminée, la phase supérieure est utilisée comme phase mobile.

- Révélation: Observation sous UV à 254 et 366 nm.

- Pulvérisation de KOH éthanolique à 10%.

Les coumarines donnent une fluorescence bleue.

Dosage de quelques métabolites secondaires (Ngbolua *et al.*, 2021b)

*Dosage des polyphénols totaux*

La teneur en polyphénols totaux de nos extraits a été déterminée en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu. Brièvement, 10 mg/mL de chaque extrait ont été dilués dans le méthanol 80% de façon à obtenir une solution de 1 mg/mL pour chaque extrait. Ensuite nous avons préparé pour chaque extrait un mélange réactionnel composé de 0,5 mL d'extrait; 5,0 mL d'eau distillée et 0,5 mL du réactif de Folin-Ciocalteu. Après trois minutes, nous avons ajouté 1,0 mL d'une solution saturée de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20%. Les mélanges ainsi préparés sont agités et incubés à la température du laboratoire à l'abri de la lumière pendant une heure. Les absorbances sont lues au spectrophotomètre à 725 nm. Chaque dosage a été répété trois fois. La quantité des polyphénols totaux est exprimée en mg équivalents d'acide gallique (GAE)/g d'extrait sec en utilisant l'équation suivante:  $y = 0,0037x + 0,0218$ ;  $R^2 = 0,9899$ ; Où x est l'absorbance et y l'équivalent d'acide gallique (mg/g).

La droite d'étalonnage pour le dosage de polyphénols totaux est reprise dans la figure 2.

*Dosage des flavonoïdes totaux*

Nous avons estimé la teneur en flavonoïdes totaux de nos extraits en suivant une méthode spectrophotométrique. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes qui absorbe à 415 nm. Le mélange réactionnel contient 1 ml de la solution méthanolique (80%) de chacun

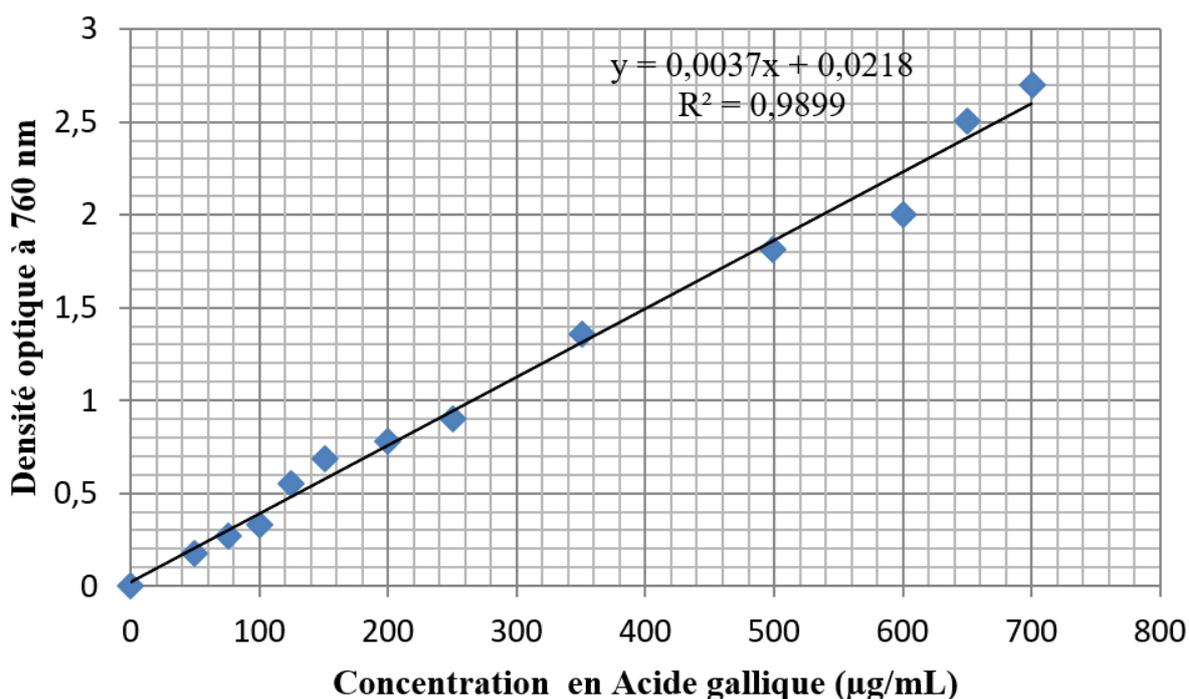


Figure 2: Droite d'étalonnage pour le dosage de polyphénols totaux

des extraits de concentration 25 mg/mL et 1 mL d' $\text{AlCl}_3$  2% (dissout dans le méthanol) et le tout a été bien agité. Après une heure d'incubation à la température du laboratoire et à l'abri de la lumière, nous avons mesuré les absorbances au spectrophotomètre à 415 nm. Les mélanges ont été préparés en triplicata pour chaque analyse et la valeur moyenne était retenue. Pour la préparation du blanc, nous avons mis 1 mL de méthanol (80%) et 1 mL d' $\text{AlCl}_3$  (2%). La teneur en flavonoïdes des extraits est exprimée en mg équivalent de quercétine (QE)/g d'extrait sec correspondant en utilisant l'équation issue de la droite d'étalonnage:  $y = 0,0542x - 0,0367$ ;  $R^2 = 0,9874$ : Où x est l'absorbance et y l'équivalent de quercétine (mg/g).

La droite d'étalonnage pour le dosage de flavonoïdes totaux est reprise dans la figure 3.

### Évaluation de l'activité anti-radicalaire

#### Préparation d'extraits

Les extraits utilisés dans l'évaluation des propriétés pharmaco-biologiques sont de deux types: le décocté et le percolât. Ces extraits ont été préparés selon les modes opératoires ci-dessous:

#### Décoction

- Peser 10 g de poudre végétale
- Ajouter 100 mL d'eau
- Porter à ébullition le mélange (eau + poudre) durant 3 à 5 minutes
- Filtrer puis évaporer à sec à l'évaporateur rotatif
- Placer l'extrait à l'étuve pendant 24 heures
- Peser et conserver entre 4 et 8 °C l'extrait obtenu.

#### Percolation

- Mouiller 10 g de poudre avec le mélange Méthanol/Dichlorométhane (1:1) (solvant d'extraction) pendant 15 minutes
- Placer la poudre mouillée dans le percolateur (capacité: 100 mL)
- Ajouter 10 à 20 mL du solvant et laisser macérer pendant 48 heures
- Laisser couler goutte à goutte le percolât à une vitesse lente
- Renouveler le solvant jusqu'à épuisement total (volume final au moins 200 mL de percolât)

- Concentrer le percolât à sec à l'évaporateur rotatif
- Peser et conserver entre 4 °C et 8 °C l'extrait sec obtenu.

#### Préparation des échantillons pour analyse

- Dissoudre 10 mg d'extrait sec de chaque échantillon dans 1 mL de méthanol pour les extraits organiques et dans 1 mL du mélange DMSO-Eau (1:1) pour les extraits aqueux (solution A: 10 mg/mL).
- Réaliser des dilutions pour avoir les niveaux de concentrations suivantes: 0,5 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,2 mg/mL et 0,1 mg/mL.

#### Test à l'ABTS

Le principe de ce test est basé sur la réaction de l'ABTS (Acide 2,2'-azino-bis-3éthylBenz-Thiazoline-6-Sulfonique) avec le persulfate de potassium ou de sodium ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  ou  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ), qui forme le radical cationique  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  de couleur bleue à verte. L'ajout d'antioxydant réduit ce radical et provoque la décoloration du mélange. La décoloration du radical mesurée par spectrophotométrie à 734 nm est proportionnelle à la concentration en antioxydants.

#### Préparation du radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$

- Dissoudre dans 500  $\mu\text{L}$  d'eau distillée une quantité du radical ABTS correspondant à 20 millimoles: solution A
- Dissoudre dans 500  $\mu\text{L}$  d'eau distillée une quantité persulfate de potassium ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) correspondant à 10 millimoles: solution B
- Mélanger à volume égal la solution A et B et garder le mélange à l'abri de la lumière pendant 12 à 16 heures: solution mère du radical  $\text{ABTS}^{+\cdot}$
- Diluer autant de fois la solution mère du radical avec le méthanol pour avoir une solution d'analyse dont l'absorbance varie entre 0,6 et 0,8.

#### Mise en contact de l'échantillon avec le radical

- Dans un tube à essais, placer 20  $\mu\text{L}$  de méthanol avec 1980  $\mu\text{L}$  de la solution du radical  $\text{ABTS}^{+\cdot}$ : solution control (à 3 répétitions).
- Dans un tube à essais, placer 20  $\mu\text{L}$  de la solution de l'échantillon pour chaque niveau de concentration (3 répétitions), ajouter à la solution 1980  $\mu\text{L}$  de la solution d'analyse du radical  $\text{ABTS}^{+\cdot}$
- Laisser incuber à l'abri de la lumière pendant 30 minutes.

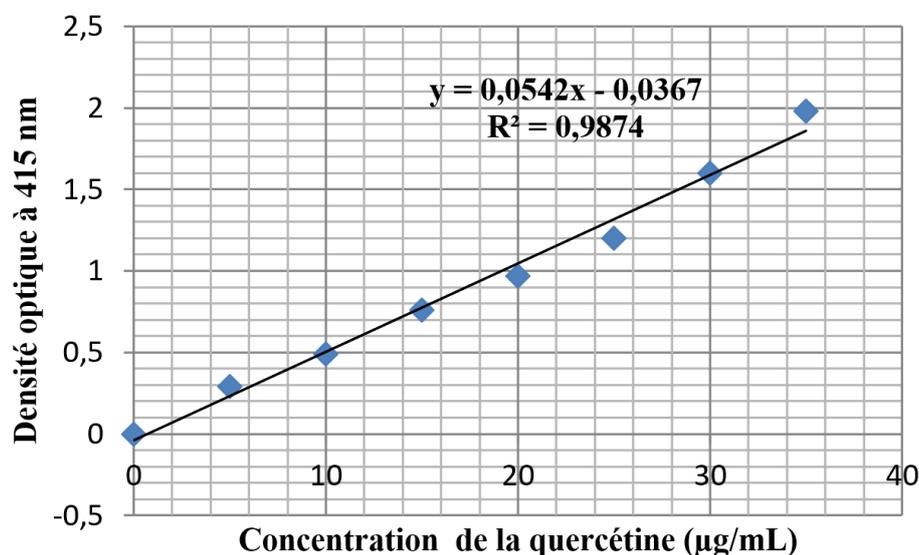


Figure 3: Droite d'étalonnage pour le dosage de flavonoïdes totaux

### Lecture de l'absorbance à 734 nm

Faire la lecture successive des solutions (3 répétitions) au spectrophotomètre à 734 nm: le contrôle négatif (méthanol) et les solutions des échantillons.

### Détermination du pouvoir d'inhibition du radical

Le pourcentage d'inhibition du radical ABTS<sup>+</sup> par la drogue est déterminé à l'aide de la formule suivante:

$$\% \text{ d'inhibition} = [1 - (A_x/A_c)] \times 100$$

A<sub>x</sub>: l'absorbance du radical ABTS<sup>+</sup> en présence de l'extrait

A<sub>c</sub>: l'absorbance du radical ABTS<sup>+</sup> (solution contrôle)

### Test au radical DPPH

Cette méthode est basée sur la dégradation du radical DPPH (2,2 DiPhenyl-1- PicrylHydrazyle). Le radical DPPH est un radical de couleur violette, l'ajout d'antioxydant réduit ce radical et provoque la décoloration du mélange; cette décoloration du radical mesurée par spectrophotomètre à 517 nm est proportionnelle à la concentration en antioxydants.

### Préparation du radical DPPH

- Dissoudre 0,25 mg de DPPH dans 200 mL de méthanol
- Garder la solution à l'abri de la lumière pendant au moins une heure

### Mise en contact de l'échantillon avec le radical

- Dans un tube à essai, placer 20 µL de méthanol avec 1980 µL de la solution du radical DPPH: solution contrôle (3 répétitions).
- Dans un tube à essai, placer 20 µL de la solution de l'échantillon pour chaque concentration (3 répétitions), ajouter à la solution 1980 µL de la solution d'analyse du radical DPPH
- Laisser incuber à l'abri de la lumière pendant 30 minutes.

### Lecture de l'absorbance à 517 nm

Faire la lecture successive des solutions pour chaque concentration (3 répétitions) au spectrophotomètre à 517 nm: le contrôle négatif (méthanol) et les solutions des échantillons.

### Détermination du pouvoir d'inhibition du radical

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH par la drogue a été déterminé à l'aide de la formule suivante:

$$\% \text{ d'inhibition} = [1 - (A_x/A_c)] \times 100$$

A<sub>x</sub>: l'absorbance du radical DPPH en présence de l'extrait

A<sub>c</sub>: l'absorbance du radical DPPH (solution contrôle)

### Test de cytotoxicité

#### Test de cytotoxicité qualitative

Le principe de ce test est basé sur l'évaluation des dommages membranaires à l'aide de globules rouges. La capacité d'induction de l'apoptose de l'extrait de la plante sur les érythrocytes humains a été évaluée en traitant les échantillons de sang avec 0,1% d'extrait pendant 1 h à température ambiante, et en utilisant le NaCl 0,9% comme témoin. Les frottis sanguins ont ensuite été préparés, séchés, fixés et colorés par la méthode May-Grunwald-Giemsa. Après cela, les frottis sanguins ont été observés au microscope optique (OPTIKA) et les images des globules rouges ont été prises en utilisant un smartphone (Prajitha et Thoppil, 2017).

#### Test de cytotoxicité quantitative

Le test est réalisé en mélangeant 1 mL de sang dilué à 2,5% (avec du NaCl 0,9%: 2,5 mL de sang total plus 100 mL de

la solution physiologique) avec 1 mL d'extrait (1 mg/mL). Le contrôle positif est constitué du mélange l'eau distillée (1 mL) avec du sang dilué (2,5% dans NaCl 0,9%) tandis que le contrôle négatif est constitué de la solution physiologique (NaCl 0,9%: 1 mL) avec du sang dilué (2,5% dans NaCl 0,9%: 1 mL). Les différents mélanges sont incubés à la température ambiante pendant 30 minutes puis centrifugés à 380 g pendant 5 minutes. La Densité optique (DO) du surnageant est lue à 540 nm au spectrophotomètre UV-visible. Pour l'extrait organique, le contrôle négatif: 1 mL NaCl 0,9% plus 1e goutte de DMSO. Le taux d'hémolyse est évalué à l'aide de la formule suivante:

$$\%H = \frac{\text{Extrait} - \text{Contrôle négatif (NaCl 0,9\%)}}{\text{Contrôle positif} - \text{Contrôle négatif}} \times 100$$

L'extrait est considéré comme cytotoxique lorsqu'à 10 µg/mL, le taux d'hémolyse est ≥ 50% (Ngbolua *et al.*, 2011a, b; Gbolo *et al.*, 2021).

### Test anti-inflammatoire (Dénaturation thermique de l'ovalbumine)

Le test est réalisé selon la méthode décrite par Kumari *et al.* (2015) avec légère modification. Le mélange réactionnel est constitué de 200 µL d'albumine d'œuf, de 1600 µL de tampon phosphate salin [PBS: 137 mM NaCl (8,0 g/L), 2,7 mM KCl (0,2 g/L), 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,44 g/L), 1.76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,24 g/L); pH 6.8] et de 1000 µL d'eau distillée ou de l'extrait (250 µg/mL). Ensuite, le mélange est incubé à 37 °C pendant 15 minutes puis chauffé à 70 °C pendant 5 minutes. Après refroidissement, l'absorbance est mesurée aux longueurs d'ondes d'absorption au spectrophotomètre à 650 et 690 nm. Le Diclofénac sodique (250 µg/mL) est utilisé comme contrôle positif tandis que l'eau distillée est utilisée comme témoin négatif. L'expérience est réalisée en triple. Le taux d'inhibition de la dénaturation thermique de l'ovalbumine est calculé à partir de la relation:

$$\% \text{Inhibition de la dénaturation} = \frac{\text{DO témoin négatif} - \text{DO échantillon}}{\text{DO témoin négatif}} \times 100$$

### Évaluation de l'activité anti-drépanocytaire

Les solutions mères d'extraits de plantes sont préparées par simple dilution à raison de 1 mg/mL. Des dilutions sérielles successives sont réalisées pour obtenir des solutions qui peuvent aller jusqu'à 0,31 mg/mL. Le sang drépanocytaire (0.5 mL) est préalablement dilué avec 2 mL du mélange d'extraits - Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 2% (v/v). Les préparations microscopiques sont réalisées en plaçant sur la lame porte-objet une goutte de sang dilué et une goutte de la drogue. La solution est recouverte par une lamelle et les bords des lamelles sont recouverts avec la paraffine (bougie) en surfusion en vue de créer l'hypoxie. Ces différentes préparations sont observées au microscope optique 24 heures après (Ngbolua *et al.*, 2013).

### Considérations éthiques

Le protocole de recherche de cette étude a été approuvé par le Comité d'éthique du département de Biologie de l'Université de Kinshasa. L'étude a respecté les principes de la déclaration d'Helsinki (consentement libre des enquêtés, etc.). Toutes les règles de confidentialité et d'éthique ainsi que les règles d'accès et partage des avantages (APA) liés à l'utilisation des ressources phylogénétiques en vigueur en République démocratique du Congo ont été respectées dans cette étude.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### Micrographie

Les résultats des analyses microscopiques de la poudre des feuilles de *Uvariadendron molundense* sont données dans la figure 4.

L'analyse microscopique de la poudre des feuilles de *Uvariadendron molundense* a permis de mettre en évidence la présence des fragments de parenchyme (A), cristaux d'oxalates de calcium (B), fibres (C), vaisseaux annelé (D), grains d'amidon groupés et isolés (E) et fragments de vaisseaux ponctués (F) (Figure 4).

### Analyse phytochimique qualitative

Les résultats du criblage phytochimique en solution effectué sur les feuilles de *Uvariadendron molundense* ont indiqué la présence des tanins totaux et des saponosides. Cependant, elles ne contiennent pas d'alcaloïdes. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Ngbolua *et al.* (2017) et confirme la présence des tanins et saponosides. Cependant, il est rapporté dans la littérature que cette espèce contiendrait des alcaloïdes. La différence dans la composition chimique de cette bio-ressource pourrait s'expliquer en fonction de plusieurs facteurs qui peuvent l'influencer. Des études ont montré que les facteurs extrinsèques (tels que les facteurs géographiques et climatiques), les facteurs génétiques, mais également le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en métabolites secondaires (Ngbolua *et al.*, 2011a, b).

La figure 5 donne le profil chromatographique des extraits méthanolique et à l'acétate d'éthyle de *Uvariadendron molundense*.

L'analyse chromatographique a révélé la présence des flavonoïdes (A), des acides phénols (B des iridoïdes (C), des anthocyanes (D) et des anthrones (E), des anthraquinones (F) et des terpènes (G). Il faut cependant noter l'absence des

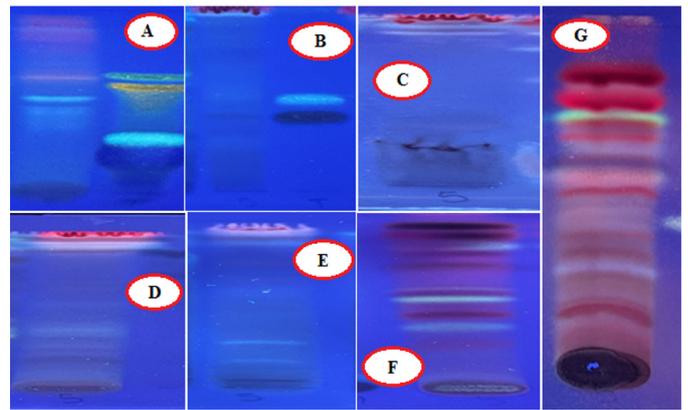


Figure 5: Profil chromatographique des extraits des feuilles de *Uvariadendron Molundense*

coumarines dans nos échantillons. Tous les composés phytochimiques identifiés ont des propriétés pharmacologiques intéressantes, c'est notamment le cas des anthocyanes, des flavonoïdes et des acides phénoliques dont l'activité anti-drépanocytaire *in vitro* est bien établie (Mpiana *et al.*, 2008; Mpiana *et al.*, 2010; Ngbolua *et al.*, 2015; Tshilanda *et al.*, 2016; Gbolo *et al.*, 2022). En effet, l'action thérapeutique des plantes résulte de ces éléments phytochimiques ou métabolites secondaires (Lagnika *et al.*, 2016).

### Analyse quantitative

Les résultats du dosage des métabolites secondaires sont donnés dans le tableau 1.

Il ressort du tableau 1 que les extraits de feuilles de *Uvariadendron molundense* présentent une teneur en polyphénols totaux de  $441,7 \pm 1,10$  mg EAG/g d'extrait et en flavonoïdes de  $6,987 \pm 0,185$  mg EQ/g d'extrait.

Il a été rapporté par les travaux de Ngbolua *et al.* (2017) des valeurs faibles comparativement à notre étude, soit  $93,4 \pm 0,10$  pour les polyphénols totaux et  $2,55 \pm 0,77$  pour les flavonoïdes (pour les extraits méthanoliques). Soit 146,4

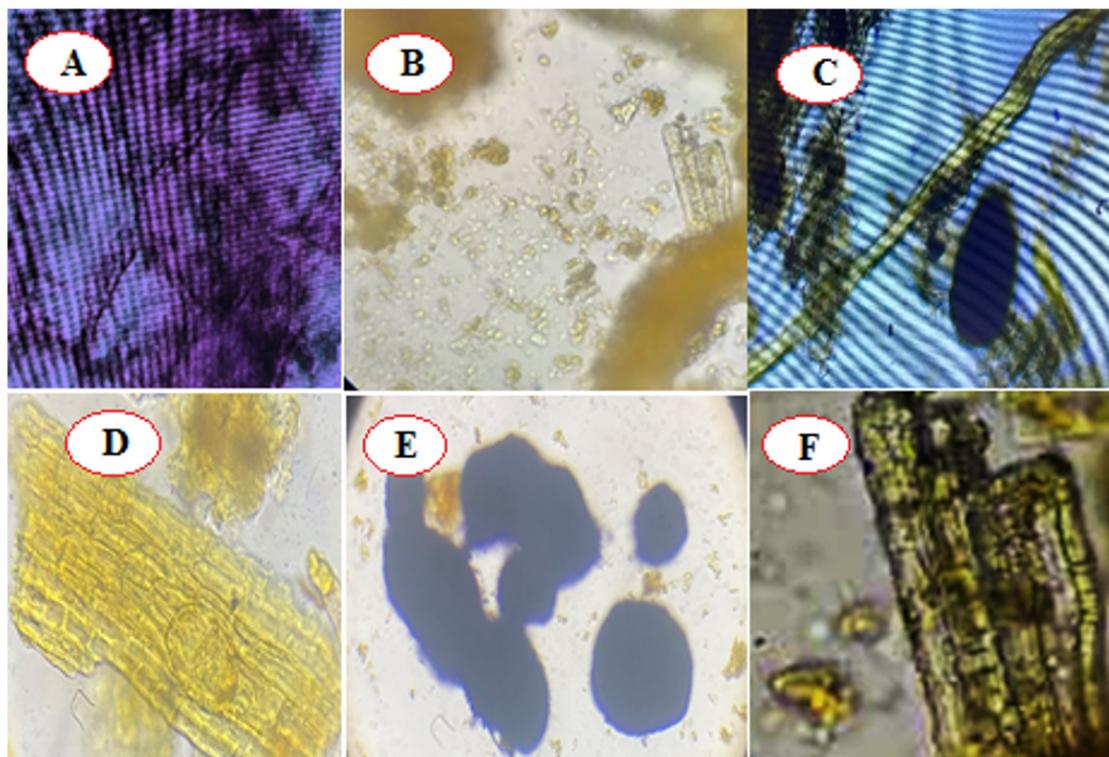


Figure 4: Micrographie de la poudre des feuilles de *Uvariadendron molundense* (A, B, C, D, E et F) observée au microscope optique (binoculaire)

± 0,20 pour les polyphénols totaux et 2,66 ± 0,48 pour les flavonoïdes (pour les extraits d'Acétate d'éthyle). Soit 116,6 ± 0,19 pour les polyphénols totaux et 1,96 ± 0,17 pour les flavonoïdes (pour les extraits de n-hexane).

La présence de ces métabolites secondaires justifie l'utilisation de cette plante en médecine traditionnelle. En effet, les composés phénoliques tels que les anthocyanes et les flavonoïdes sont doués des propriétés antidrépanocytaires (Mpiana *et al.*, 2008; Gbolo *et al.*, 2022).

**Évaluation de l'activité anti-oxydante**

L'évolution du taux d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration de la drogue est reprise dans la figure 6.

Il ressort de cette figure que le taux d'inhibition du radical DPPH est dose-dépendant. La concentration de la drogue qui inhibe 50% de radical DPPH en solution est de 42,3 µg/mL. Il faut cependant noter que cette activité antiradicalaire peut être affectée par la chaleur. En effet, la décoction réduit de plus de 50% l'activité antioxydante des feuilles de *Uvariadendron molundense*, comme on peut le constater dans le tableau 2.

Il est ainsi conseillé aux utilisateurs de cette plante alimentaire de l'utiliser sous forme d'infusion en lieu et place de la décoction afin de prévenir la dénaturation thermique des principes actifs et ainsi garantir ses effets biologiques.

En comparant les deux drogues à base des feuilles de *Uvariadendron molundense* (percolât et décocté) (Figure 12), on peut clairement voir cette différence d'activité. En effet, la figure 16 indique que le percolât est plus actif que le décocté. A 100 µg/mL, l'inhibition du radical DPPH par le percolât est 5 fois supérieure à celui du décocté (Figure 7).

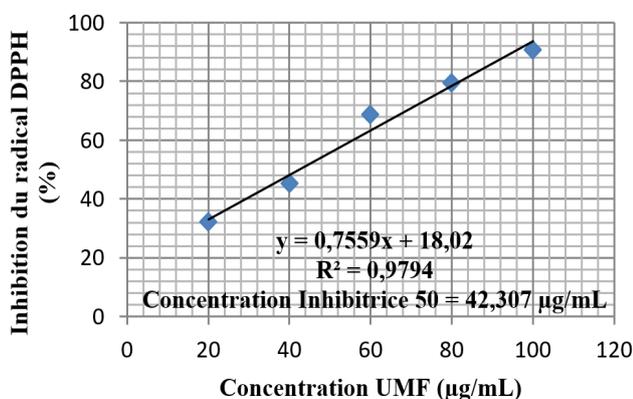


Figure 6: Taux d'inhibition du radical DPPH

Les résultats de la présente étude montrent que *U. molundense* constitue une source d'antioxydants naturels pour lutter contre le stress oxydatif généré par les maladies chroniques telles que la drépanocytose.

L'une des principales caractéristiques de la drépanocytose est la production d'une grande quantité de radicaux libres, conduisant à un stress oxydatif grave et à la consommation du monoxyde d'azote par des radicaux libres de l'oxygène. Le stress oxydatif affecte également le rapport Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup>, assez élevé dans les cellules falciformes, et est impliqué dans l'hémolyse des drépanocytes. Les propriétés antioxydantes d'une plante indiqueraient donc également son action sur la drépanocytose (Mpiana *et al.*, 2016).

Les résultats de l'inhibition du radical ABTS sont donnés dans la figure 8.

Il ressort de cette figure que l'inhibition du radical ABTS par les extraits de *Uvariadendron molundense* est directement proportionnelle à leur concentration; et ces extraits ont montré une meilleure activité. Le radical ABTS est un modèle qui réagit aussi bien avec les composés polaires qu'apolaires alors que le radical DPPH ne réagit qu'avec les composés polaires (Heroual *et al.*, 2020). Les résultats de ce travail montrent que nos extraits possèdent un effet réducteur, qui pourrait être dû à sa richesse en composés polyphénoliques (Melakhessou, 2019).

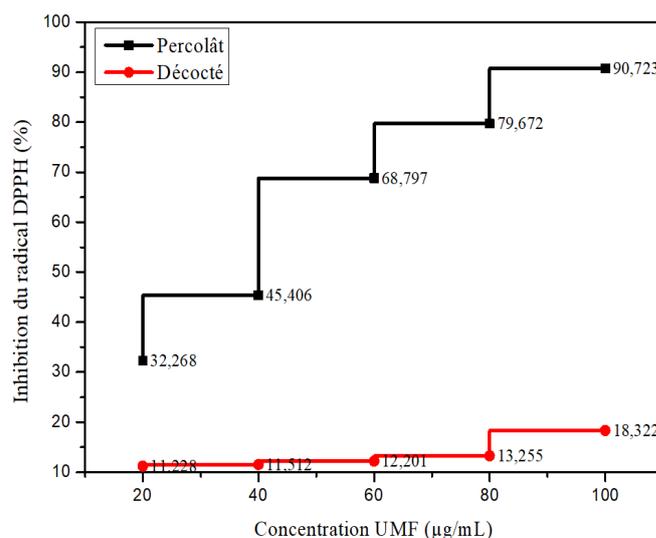


Figure 7: Inhibition du radical DPPH par les extraits de *Uvariadendron molundense*

**Tableau 1: Teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes des feuilles de *Uvariadendron molundense***

Polyphénols totaux			Flavonoïdes totaux		
Absorbance	Concentration	Moyenne ± Écart-type	Absorbance	Concentration	Moyenne ± Écart-type
1,656	441,7	441,7 ± 1,10 mg EAG/g d'extrait	0,333	6,821	6,987 ± 0,185 mg EQ/g d'extrait
1,661	443,0		0,337	6,895	
1,651	440,3		0,356	7,245	

Légende: EGA/g: Équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec; EQ/g: Équivalent de quercétine par gramme d'extrait sec

**Tableau 2: Résultats de l'inhibition du radical DPPH**

Ci (mg/mL)	Cf (µg/mL)	%I Percolât	%I Décocté	Réduction activité (%Δ)
2	20	32,3	10,0	69,0
4	40	45,4	10,7	76,5
6	60	68,8	13,2	80,7
8	80	79,7	16,3	79,5
10	100	90,7	19,7	78,2

Légende: Ci: Concentration initiale; Cf: Concentration finale et %I: Pourcentage d'Inhibition

### Test de cytotoxicité

Les résultats du test de cytotoxicité qualitative réalisé avec la drogue à base de *Uvariadendron molundense* sont repris dans la figure 9.

L'évaluation de la cytotoxicité a montré que les feuilles de *Uvariadendron molundense* n'a aucun effet sur les érythrocytes attestant que la plante n'est pas toxique vis-à-vis de ces cellules. En effet, les bords des globules rouges sont lisses.

Les résultats du test de cytotoxicité quantitative de *Uvariadendron molundense* sont représentés dans la figure 10.

Il ressort de la figure 10 que le décocté est plus hémolytique que le percolât (%H 25,3 ± 4,40 vs 17,6 ± 6,03). Cependant, à 1000 µg/mL, le taux d'hémolyse est <50% et que cette différence n'est pas significative ( $p > 0,05$ ). Ceci montre le caractère moins toxique de cette plante garantissant ainsi son innocuité en médecine traditionnelle. Il n'existe donc pas de différence significative entre le décocté et le percolât de *Uvariadendron molundense* quant à leur pouvoir hémolytique, celui-ci étant inférieur à 50%.

### Test anti-inflammatoire

Les résultats de l'effet de drogues sur la dénaturation thermique de l'ovalbumine *in vitro* sont donnés dans la figure 11.

L'activité anti-inflammatoire d'une drogue peut être évaluée à partir de son taux d'inhibition de la dénaturation thermique de l'ovalbumine *in vitro* (%I). Ainsi, lorsque %I < 0 (Effet hyperchrome), le produit est dit inactif; Lorsque  $0 < \%I < 46,7 \pm 19,1$  (Diclofenac sodique: contrôle positif), le produit est faiblement actif; Lorsque  $46,7 \pm 19,1 < \%I < 75$ , le produit est actif et si  $75 < \%I < 100$ , il est très actif. Il ressort de cette étude que le décocté des feuilles de *Uvariadendron molundense* (UMFD:  $35,8 \pm 4,95$  %) est faiblement actif tandis que le percolât (UMFP:  $50,3 \pm 3,63$  %) est actif (Figure 11).

La drépanocytose est associée à une inflammation chronique qui peut à terme provoquer des insuffisances au niveau des organes vitaux tels que le foie, les reins, le cœur, etc. Cette inflammation peut être due à une activation anormale des monocytes. En effet, l'hémoglobine malade (Hb S) libérée lors de l'hémolyse de l'érythrocyte peut se lier aux récepteurs TLR4 localisés à la surface des monocytes et déclencher l'inflammation (Dembele, 2020). Cette dernière est une composante clé que l'on doit prendre en compte lors de la définition des stratégies thérapeutiques pour la prise en charge symptomatologique de la drépanocytose. Il faut en outre noter que l'inflammation est entretenue chez les sujets drépanocytaires par la falciformation des érythrocytes, les infections microbiennes et les radicaux libres. Elle se caractérise sur le plan clinique par une élévation du taux sérique de la protéine C-réactive, de l'alpha 1 glycoprotéine acide et une diminution du taux de la transferrine (Dembele, 2020).

Dans le cas particulier du stress oxydatif, l'organisme considère les radicaux libres excessifs comme des agents pathogènes (responsables de l'hyperplasie intinale des vaisseaux sanguins) et déclenche une réponse inflammatoire pour tenter de les éliminer (Masengo *et al.*, 2021b). Il a été ainsi démontré que l'inflammation chez les drépanocytaires peut être modulée par le facteur de transcription NF-κB via les voies de transduction des signaux impliquant les protéines p38 MAPK et JNK ainsi que les éicosanoïdes (Masengo *et al.*, 2021b).

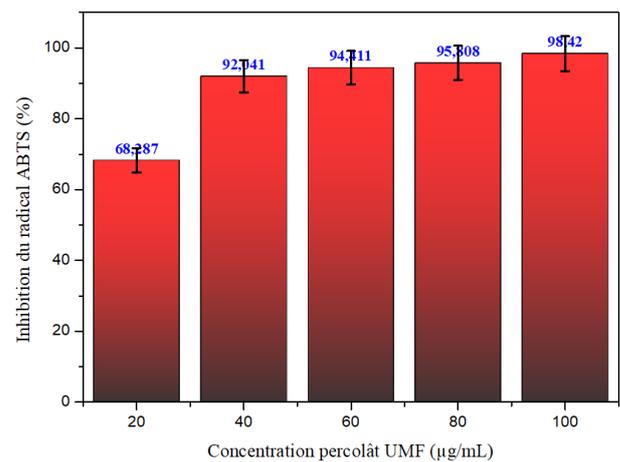


Figure 8: Inhibition du radical ABTS par les extraits des feuilles de *U. molundense* (UMF)

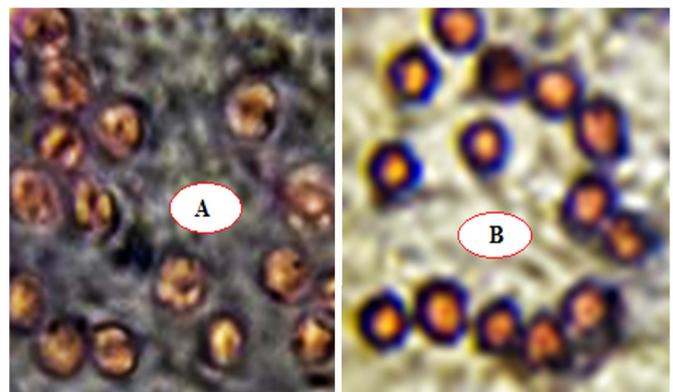


Figure 9: Effet de la drogue (1000 µg/mL) sur les érythrocytes (cytotoxicité) (500x): percolât (A) et décocté (B)

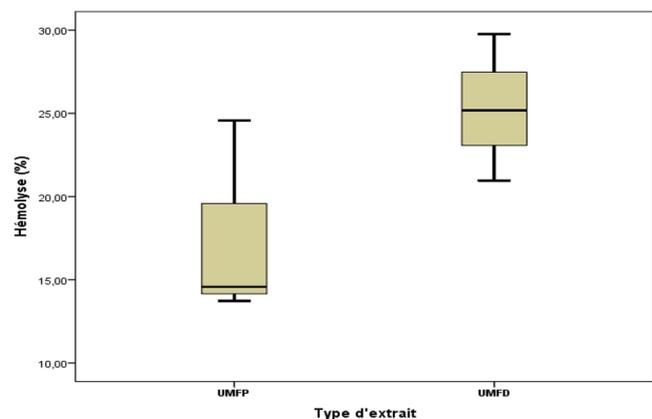


Figure 10: Taux d'hémolyse érythrocytaire de *Uvariadendron molundense*

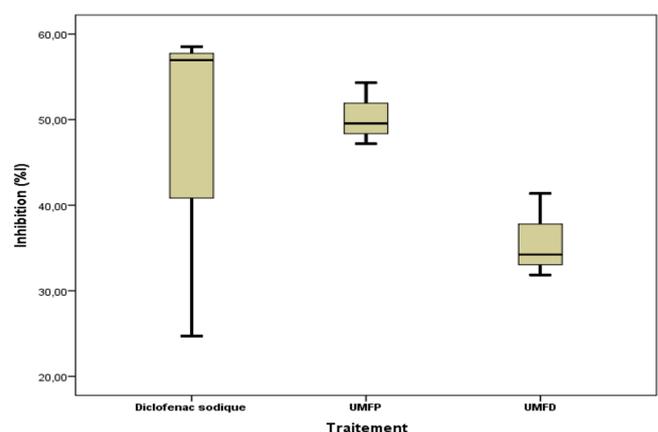


Figure 11: Effet de drogues sur la dénaturation thermique de l'ovalbumine *in vitro*

A cet effet, la protéine C-réactive, l'alpha 1 glycoprotéine acide, le facteur de transcription NF-kB, la xanthine oxydase et la cyclo-oxygénase constituent des cibles moléculaires de choix pour le développement des médicaments anti-drépanocytaires en sus de l'hémoglobine S, la 2,3-DPG mutase et le canal potassique de Gardos. La présence de flavonoïdes dans *Uvarioidendron molundense* lui confère cette activité anti-inflammatoire. En effet, les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables de l'inflammation. Ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation athérosclérotique en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires et certains sont capables d'inhiber l'histamine (Melakhessou, 2019).

### Évaluation de l'activité anti-drépanocytaire

La figure 12 donne la morphologie d'érythrocytes drépanocytaires non traités et traités avec des extraits de *Uvarioidendron molundense*.

L'analyse de la figure 12 montre que toutes les cellules du témoin sont en forme de faucille, ce qui confirme que le sang provient d'un sujet drépanocytaire. Cependant, en présence d'extrait (décocté/percolât) les drépanocytes reprennent la forme circulaire biconcave en conditions d'hypoxie. Ces résultats indiquent que nos principes actifs réduisent l'ellipsoïdité des drépanocytes en conditions hypoxiques. Ainsi nos drogues pourraient prévenir toutes les complications liées à la falciformation. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par Ngbolua *et al.* (2017).

La bio-activité observée pourrait être due aux métabolites secondaires tels que les anthocyanes qui agit en empêchant la polymérisation des molécules de désoxyhémoglobine S en tactoïdes (polymère responsable de la falciformation des drépanocytes) comme précédemment rapporté dans les travaux de Gbolo (2010); Mpiana *et al.* (2016); Ngbolua *et al.* (2017).

La République démocratique du Congo (RDC) est un réservoir de la biodiversité (Asimonyio *et al.*, 2015 a,b; Kambale *et al.*, 2016 a,b,c; Omatoko *et al.*, 2015). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, plus de 80% de la population en Afrique d'une manière générale et en RDC en particulier, recourent aux PFNLs à propriétés médicinales pour résoudre le problème de santé primaire (WHO, 2002). Le regain d'intérêt pour les plantes médicinales dans la prise en charge des maladies est non seulement un choix, mais aussi une conséquence de la pauvreté et des coûts élevés des médicaments modernes (Ngbolua *et al.*, 2011 a,b). C'est pourquoi, il est urgent d'évaluer l'activité bio-thérapeutique de ces ressources phytogénétiques à haut potentiel biopharmaceutique en vue de leur valorisation à travers la création des usines pour la production et la commercialisation des médicaments issus des connaissances traditionnelles (Ngbolua, 2014). La valorisation des plantes à valeur ajoutée permet aux chercheurs d'aider les détenteurs du savoir traditionnel à améliorer leurs conditions de vie conformément au protocole de Nagoya sur l'accès et le partage juste et équitable des avantages découlant de l'exploitation des ressources génétiques (Ngbolua *et al.*, 2016). Ainsi, *Uvarioidendron molundense* est un PFNL à valeur économique potentielle énorme dont la transformation en revenu réel et son exploitation durable peut contribuer au bien-être humain.

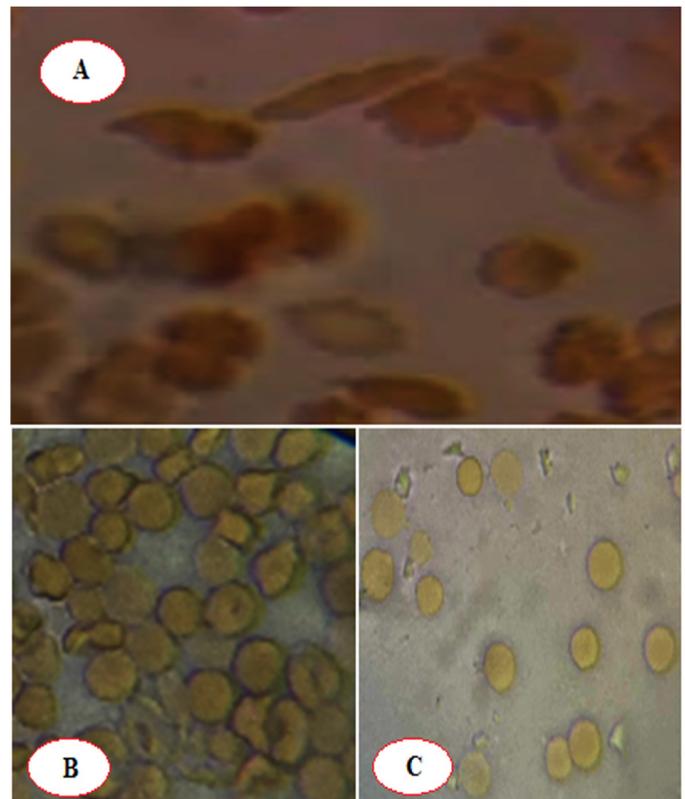
### CONCLUSION

La présente étude avait pour but l'étude phytochimique et évaluation des activités antirépanocytaire, anti-inflammatoire, antiradicalaire et cytotoxique *in vitro* des feuilles de *Uvarioidendron molundense* de la famille d'Annonaceae.

Il ressort de cette étude que:

- La poudre des feuilles de *U. molundense* contient les fragments de parenchyme, les cristaux d'oxalates de calcium, les fibres, les vaisseaux annelés, les grains d'amidon et les fragments de vaisseaux ponctués;
- Ces feuilles contiennent les tanins, les saponosides, les flavonoïdes, les acides phénols, les iridoïdes, les anthocyanes, les anthrones, les anthraquinones et les terpènes;
- La teneur en polyphénols totaux est de  $441,7 \pm 1,10$  mg EAG/g d'extrait et tandis que celle des flavonoïdes totaux est de  $6,99 \pm 0,185$  mg EQ/g d'extrait;
- L'activité antiradicalaire du percolât est supérieure à celle du décocté;
- Les feuilles de *U. molundense* ne sont pas cytotoxique (%Hemolyse <50 à 1000 µg/mL);
- Les feuilles de *U. molundense* sont douées des propriétés anti-inflammatoires. Cette activité est cependant faible pour le décocté (%I =  $35,8 \pm 4,95$ ) et moyenne pour le percolât (%I =  $50,3 \pm 3,31$ );
- Le décocté et percolât des feuilles de *U. molundense* sont douées des propriétés antifalcémiantes *in vitro*.

Il est donc souhaitable qu'une étude phytochimique plus approfondie soit réalisée sur les feuilles de *Uvarioidendron molundense* afin d'identifier les molécules actives.



**Figure 12:** Microphotographie optique du sang drépanocytaire témoin (A) et traité avec les extraits de *Uvarioidendron molundense* à la concentration de 100 µg/mL, NaCl 0,9 %, Na<sub>2</sub> S O<sub>5</sub> 2 %, 500x: Décocté (B) et Percolât (C)

## RÉFÉRENCES

- Asimonyio J.A., Kambale K., Shutsha E., Bongo G.N., Tshibangu D.S.T., Mpiana P.T., Ngbolua K.N. (2015a). Phytoecological Study of Uma Forest (Kisangani City, Democratic Republic Of The Congo). *J. of Advanced Botany and Zoology*, V3I2.
- Asimonyio J.A., Ngabu J.C., Lomba C.B., Falanga C.M., Mpiana P.T., Ngbolua K.N. (2015b). Structure et diversité d'un peuplement forestier hétérogène dans le bloc sud de la réserve forestière de Yoko (Ubundu, RD Congo). *International Journal of Innovation and Scientific Research*, 18: 241-251.
- Cheikhouna K. (2021). Étude des propriétés anti-drépanocytaires d'un extrait hydro-alcoolique de feuilles de *Oxytenanthera abyssinica* munro (Poaceae). Thèse, Université El Hadji Ibrahima Niassé. 119 p.
- Dembele A. (2020). Vasculopathie et inflammation dans la drépanocytose: i) étude des déterminants de la vasculopathie chronique en Afrique sub-saharienne: ii) dynamique inflammatoire des polynucléaires neutrophiles sous thérapeutiques transfusionnelles au sein d'une cohorte française. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris Cité. p. 172.
- Djolu R. D., Ashande C. M., Ngbolua K.N., Monizi M., Bekomo J. I., Tshibangu D. S.-T., Tshilanda D. D., Mpiana P. T., Virima M. (2021). Ethnobotanical Study and Vulnerability of *Uvariadendron molundense* (Annonaceae) in Gbado-Lite City (Ubangi Eco-region), Democratic Republic of the Congo. *Journal of Botanical Research*, 3: 41-48.
- Gbolo Z., Ciala N., Ngbolua K., Tshibangu D., Tshilanda D., Memvanga B., Mpiana P. (2022). Profilage phytochimique par chromatographie sur couche mince haute performance d'extraits de flavonoïdes totaux du Drepanoalpa® et évaluation de leur activité antidrépanocytaire *in vitro*. *Annales Africaines de Médecine*, 16:e4882-e4898.
- Giroit R., Begué P., Galacteros F. (2003). La drépanocytose. Éditions John LIBBEY Eurotext, Paris: France.
- Gueyraud K., Hriday P., Pankaj S., Allico D. (2019). Technique d'étude de la toxicité des extraits de plante par la méthode du MTT. *Am. J. Innov. Res. Appl. Sci.*, 9: 30-32.
- Heroual K. (2020). Les polyphénols: Structure, pouvoir antioxydant et méthodes *in vitro* de l'évaluation de l'activité antioxydante. DEA, Université des Frères Mentouri Constantine I. 93 p.
- Inkoto C.L., Ngbolua K.N., Masunda A.T., Kabengele C.N., Itoku J.B., Tshilanda D.D., Tshibangu D.S.T., Mpiana P.T. (2021). Microscopic features and phytochemistry of two Congolese medicinal plants: *Aframomum albobolaleum* (Ridley) K. Schum. and *Aframomum angustifolium* (Sonn.) K. Schum. (Zingiberaceae). *International Journal of Life Science Research Archive*, 1: 043-052.
- Kambale J.K., Feza F.M., Tsongo J.M., Asimonyio J.A., Mapeta S., Nshimba H., Gbolo B.Z., Mpiana P.T., Ngbolua K.N. (2016a). La filière bois-énergie et dégradation des écosystèmes forestiers en milieu périurbain: Enjeux et incidence sur les riverains de l'île Mbiye à Kisangani (République Démocratique du Congo). *International Journal of Innovation and Scientific Research*, 21: 51-60.
- Kambale J.-L.K., Asimonyio J.A., Shutsha R.E., Katembo E.W., Tsongo J.M., Kavira P.K., Yokana E.I., Bukasa K.K., Nshimba H.S., Mpiana P.T., Ngbolua K.N. (2016b). Études floristique et structurale des forêts dans le domaine de chasse de Rubi-Télé (Province de Bas-Uélé, République Démocratique du Congo). *International Journal of Innovation and Scientific Research*, 24: 309-321.
- Kambale J.-L.K., Shutsha R.E., Katembo E.W., Omatoko J.M., Kirongozi F.B., Basa O.D., Bugentho E.P., Yokana E.I., Bukasa K.K., Nshimba H.S., Ngbolua K.N. (2016c). Étude floristique et structurale de deux groupements végétaux mixtes sur terre hydromorphe et ferme de la forêt de Kponyo (Province du Bas-Uélé, R.D. Congo). *International Journal of Innovation and Scientific Research*, 24: 300-308.
- Kumari S., Yasmine N., Hussain M.R., Babuselvam M. (2015). *In vitro* anti-inflammatory and anti-arthritis property of *Rhizopora mucronata* leaves. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6: 482-485.
- Lagnika L., Amoussa A., Adjilèyè R., Lalèye A., Sanni A. (2016). Antimicrobial, antioxidant, toxicity and phytochemical assessment of extracts from *Acmella uliginosa*, a leafy-vegetable consumed in Bénin, West Africa. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16: 34.
- Masengo, A.C., Ngbolua, K.N., Gbolo, B.Z., Inkoto, L.C., Baholy, R., Itoku, B.J., Ilumbe, B.G., Mpiana, P.T. (2021a). Drépanocytose: Approche Bioclinique, Cibles Biologiques d'Intérêt Thérapeutique et Perspectives. *International Journal of Progressive Sciences and Technologies*, 28: 539-545.
- Masengo C., Bongo G., Robijaona B., Ilumbe G., Ngbolua K., Mpiana P. (2021b). Étude ethnobotanique quantitative et valeur socioculturelle de *Lippia multiflora* Moldenke (Verbenaceae) à Kinshasa, République Démocratique du Congo. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 9:93-101.
- Melakhessou A. (2019). Évaluation des activités biologiques des extraits de la plante: *Atractylis flava* Desf. Thèse Doctorat, Université de Batna 2. 149 p.
- Mpiana P.T., Tshibangu D.S.T., Shetonde O.M., Ngbolua K.N. (2007). *In vitro* antidrepanocytary activity (anti-sickle cell anaemia) of some Congolese plants. *Phytomedicine*, 14: 192-195.
- Mpiana P., Mudogo V., Tshibangu D., Kitwa E., Kanangila A., Lumbu J., Ngbolua K., Atibu E., Kakule M. (2008). Antisickling activity of anthocyanins from *Bombax pentadrum*, *Ficus capensis* and *Zizphus mucronata*: photodegradation effect. *Journal of Ethnopharmacology*, 12: 413-418.
- Mpiana P.T., Bokota M.T., Ndjele M.B.L., Mudogo V., Tshibangu D.S.T., Ngbolua K.N., Atibu E.K., Kwembe J.T.K., Makelele L.K. (2010a). Antisickling activity of three species of *Justicia* from Kisangani (DR Congo): *Justicia tenella*, *J. gendarusa* and *J. insularis*. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 4: 1953-1961.
- Mpiana P.T., Makelele L.K., Oleko R.W., Bokota M.T., Tshibangu D.S.T., Ngbolua K.N., Mbala M.B., Atibu E.K., Nshimba S.M. (2010b). Antisickling activity of medicinal plants used in the management of Sickle cell Disease in Tshopo district, D.R.Congo. *Australian Journal of Medical Herbalism*, 22: 132-137.
- Mpiana P.T., Ngbolua K.N., Bokota M.T., Kasonga T.K., Atibu E.K., Mudogo V. (2010c). *In vitro* Effects of Anthocyanins Extracts From *Justicia secunda* VAHL on the Solubility of Hemoglobin S and Membrane Stability of Sickle Erythrocytes. *Blood Transfusion*, 8: 248-254.
- Mpiana P.T., Ngbolua K.N., Mudogo V., Tshibangu D.S.T., Atibu E.K., Tshilanda D.D., Misengabu N.M. (2011). Antisickle erythrocytes haemolysis properties and inhibitory effect of anthocyanins extracts of *Trema orientalis* (ULMACEAE) on the aggregation of human deoxyhemoglobin S *in vitro*. *Journal of Medical Sciences*, 11: 129-137.
- Mpiana P., Ngbolua K., Tshibangu D. (2016). Les alicaments et la drépanocytose: une mini-revue. *C. R. Chimie*, 19: 884-889.
- Ngbolua K.N., Rakotoarimanana H., Rafatro H., Urverg R.S., Mudogo V., Mpiana P.T., Tshibangu D.S.T. (2011a). Comparative antimalarial and cytotoxic activities of two *Vernonia* species: *V. amygdalina* from the Democratic Republic of Congo and *V. cinerea* subsp vialis endemic to Madagascar. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 5: 345-353.
- Ngbolua K.N., Rafatro H., Rakotoarimanana H., Urverg R.S., Mudogo V., Mpiana P.T., Tshibangu D.S.T. (2011b). Pharmacological screening of some traditionally-used antimalarial plants from the Democratic Republic of Congo compared to its ecological taxonomic equivalence in Madagascar. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 5: 1797-1804.
- Ngbolua K.N., Kambale J., Mpiana P., Mudogo V., Tshibangu D., Wumba D., Mvumbi L., Kalala L., Mesia K., Ekutsu E. (2013). Evaluation *in vitro* de l'activité anti falcémiant et effet antioxydant des extraits d'*Uapaca heudelotii* Baill. (Euphorbiaceae). *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, 7: 523-534.
- Ngbolua K.N. (2014). Activité antifalcémiant (antisickling activity) des plantes utilisées contre la drépanocytose en Médecine Traditionnelle Congolaise. Rapport de Recherche. International Foundation For Science (F/4921-1 & 2), Stohkolm, Sweden, 25 p.

- Ngbolua K.N., R. Herintsoa, R. Hajatiana, V. Mudogo, P.T. Mpiana, D.S.T. Tshibangu, Tshilanda D.D. (2015). *In vitro* anti-erythrocyte sickling effect of lunularic acid of natural origin. *International Blood Research & Reviews*, 4:1-6.
- Ngbolua K.N., Shetonde O.M., Mpiana P.T., Inkoto L.C., Masengo C.A., Tshibangu D.S.T., Gbolo Z.B., Baholy R., Fatiany P.R. (2016). Ethno-pharmacological survey and Ecological studies of some plants used in traditional medicine in Kinshasa city (Democratic Republic of the Congo). *Tropical Plant Research*, 3: 413-427.
- Ngbolua K.N., Tshilanda D., Djoza D., Falanga C., Ashande M., Tshibangu D., Iteku J., Mudogo V., Mpiana P. (2017). Anti-Sickle Cell Anemia and Bacterial Inhibitory Effects of *Uvariadendron molundense* (Diels) R.E.Fr. (Annonaceae) from Ubangi River Basin, DR Congo. *Journal of Biosciences and Medicines*, 5: 71-84.
- Ngbolua K.N. (2019). Évaluation de l'activité anti-drépanocytaire et antipaludique de quelques taxons végétaux de la République démocratique du Congo et de Madagascar. Éditions Universitaires Européennes, Riga: Latvia.
- Ngbolua K., Inkoto C., Mongo N., Masengo C., Masens Y., Mpiana P. (2019). Étude ethnobotanique et floristique de quelques plantes médicinales commercialisées à Kinshasa, République Démocratique du Congo. *Rev. Mar. Sci. Agron. Vét.*, 7:118-128.
- Ngbolua K.N., Molongo M.M., Libwa M.T.B., Amogu J.J.D., Kutshi N.N., Masengo, C.A. (2021a). Enquête ethnobotanique sur les plantes sauvages alimentaires dans le Territoire de Mobayi-Mbongo (Nord-Ubangi) en République Démocratique du Congo. *Rev. Mar. Sci. Agron. Vét.*, 9: 261-267.
- Ngbolua K.N., Behundo, M., Mbembo B., Inkoto C., Masengo A.C., Kilembe J., Amogu, J., Falanga C., Asimonyio J., Mutwale P., Ngombe, N., Mpiana, P. (2021b). Micrographic Profiling and Phytochemical Analysis of Some Plants Consumed by *Okapia johnstoni* (Giraffidae: Mammalia) in Democratic Republic of the Congo. *Journal of Biomedical and Life Sciences*, 1(1).
- Omatoko J., Nshimba H., Bogaert J., Lejoly J., Shutsha R., Shaumba J.P., Asimonyio J., Ngbolua K.N. (2015). Études floristique et structurale des peuplements sur sols argileux à *Pericopsis elata* et sableux à *Julbernardia seretii* dans la forêt de plaine de UMA en République Démocratique du Congo. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 13: 452-463.
- Prajitha V., Thoppil J.E. (2017). Cytotoxic and apoptotic activities of extract of *Amaranthus spinosus* L. in *Allium cepa* and human erythrocytes. *Cytotechnology*, 69:123-133.
- Tshilanda D.D., Onyamboko D.N.V., Babady P.V., Ngbolua K.N., Tshibangu D.S.T., Dibwe E.F., Mpiana P.T. (2015). Anti-sickling Activity of Ursolic Acid Isolated from the Leaves of *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae). *Nat. Prod. Bioprospect*, 5: 215-221.
- Tshilanda D.D., Onyamboko D.V.N., Babady P.B., Mutwale P.K., Tsalu P.V., Tshibangu D.S.T., Ngombe K.N., Ngbolua K.N., Pius T., Mpiana P.T. (2016). Chemical fingerprint and anti-sickling activity of Rosmarinic acid and Methanolic extracts from three Species of *Ocimum* from DR Congo. *Journal of Biosciences and Medicines*, 4: 59-68.
- World Health Organization (2002). Traditional medicine strategy 2002-2005.