

Étude phytochimique et évaluation de l'activité anti-radicalaire, anti-inflammatoire, anti-drépanocytaire et cytotoxique des feuilles de *Lippia multiflora* Moldenke (Verbenaceae)

C. A. MASENGO¹, K.N. NGBOLUA², S.L. OMEONGA², N.P. NZUZI³, G.B. ILUMBE², P. T. MPIANA²

(Reçu le 04/05/2023; Accepté le 15/08/2023)

Résumé

Lippia multiflora est une plante aromatique utilisée en médecine traditionnelle pour traiter un certain nombre de maladies dont la drépanocytose. Le but de la présente étude est d'évaluer son efficacité et son innocuité in vitro. L'analyse micrographique de la poudre de *L. multiflora* par le réactif de Steimetz a permis d'identifier les cellules épidermiques, les stomates, les fragments de vaisseaux spiralés et les trichomes unicellulaires non glanduleux. Du point de vue phytochimique, cette plante contient les acides phénoliques, les flavonoïdes, les anthocyanes, les leuco-anthocyanes, les quinones liées, les coumarines, les anthraquinones, les iridoïdes, les saponines, les stéroïdes et les tri-terpènes. La teneur en polyphénols totaux est de 336 mg EAG/g d'extrait et tandis que celle des flavonoïdes totaux, des anthocyanes, des tanins condensés et hydrolysables sont respectivement de 6,61 mg EQ/g; 0,111 %; 0,425 %; 0,093 %. L'activité anti-oxydante du percolât (radical DPPH: $CI_{50}=73,6 \mu\text{g/mL}$; radical ABTS: %I > 50 à 20 $\mu\text{g/mL}$) est supérieure à celle du décocté (radical DPPH: %I < 50 à 100 $\mu\text{g/mL}$; radical ABTS: $CI_{50}=78,9 \mu\text{g/mL}$) et qu'en outre les feuilles de *L. multiflora* ne sont pas cytotoxiques (%Hémolyse <50 à 1000 $\mu\text{g/mL}$). Ces feuilles sont douées en outre des propriétés anti-inflammatoires (décocté: 36,3 % versus percolât: 62,0 %). Ces deux types d'extraits sont doués des propriétés anti-drépanocytaires in vitro. Cette plante bioactive étant probablement non cytotoxique, elle peut être développée et proposée comme candidat aliment fonctionnel pour le traitement symptomatique des crises drépanocytaires.

Mots clés: *Lippia multiflora*, acides phénoliques, polyphénols, in vitro, anti-inflammatoire, anti-drépanocytose

Phytochemical study and evaluation of the anti-free radical, anti-inflammatory, anti-sickling and cytotoxic activity of *Lippia multiflora* Moldenke (Verbenaceae) leaves

Abstract

Lippia multiflora is an aromatic plant used in traditional medicine to treat a number of diseases including sickle cell disease. The aim of the present study is to evaluate its efficacy and safety in vitro. Micrographic analysis of *L. multiflora* powder by Steimetz reagent allowed the identification of epidermal cells, stomata, spiral vessel fragments and unicellular non-glandular trichomes. Phytochemically, this plant contains phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, leuco-anthocyanins, bound quinones, coumarins, anthraquinones, iridoids, saponins, steroids and tri-terpenes. The content of total polyphenols was 336.2 mg EAG/g extract and while that of total flavonoids, anthocyanins, condensed and hydrolyzable tannins were 6.61 mg EQ/g; 0.111 %; 0.425 %; 0.093 %, respectively. The antioxidant activity of the percolate (DPPH radical: $IC_{50}=73.6 \mu\text{g/mL}$; ABTS radical: %I > 50 to 20 $\mu\text{g/mL}$) is higher than that of the decoctate (DPPH radical: %I < 50 to 100 $\mu\text{g/mL}$; ABTS radical: $IC_{50}=78.9 \mu\text{g/mL}$) and that in addition *L. multiflora* leaves are not cytotoxic (%Hemolysis <50 to 1000 $\mu\text{g/mL}$). These leaves also have anti-inflammatory properties (decoctate: 36.3 % versus percolate: 62.0 %). Both types of extracts are endowed with anti-sickle cell properties in vitro. As this bioactive plant is probably non-cytotoxic, it can be developed and proposed as a functional food candidate for the symptomatic treatment of sickle cell crises.

Keywords: *Lippia multiflora*, phenolic acids, polyphenols, in vitro, anti-inflammatory, anti-sickle cell disease

INTRODUCTION

La drépanocytose est une hémoglobinopathie endémique dans certaines populations d'origine négroïde. Il s'agit d'une mutation ponctuelle «faux sens» affectant le gène βS situé sur le bras court du chromosome 11 et conduisant à la biosynthèse d'une hémoglobine anormale, appelée hémoglobine S (Hb S) (Giroit *et al.*, 2003; Mpiana *et al.*, 2016; Masengo *et al.*, 2021a). Sous sa forme oxygénée, l'hémoglobine normale et l'hémoglobine S (Hb S) présente la même solubilité en milieu physiologique, cependant sous la forme désoxygénée, la solubilité de l'hémoglobine normale diminue de moitié alors que celle de Hb S baisse 50 fois conduisant ainsi à sa précipitation et sa polymérisation intracellulaire en tactoïde. Ce polymère est à la base de falciformation des érythrocytes (Mpiana *et al.*, 2010). Sur le plan épidémiologique, environ 5% de la population mondiale naissent chaque année, atteints de la drépanocytose, une anomalie génétique caractérisée par un stress oxydatif (Lemogoum *et al.*, 2008). Bon nombre

de travaux scientifiques mettent en exergue la contribution des antioxydants dans la lutte contre les maladies associées au stress oxydatif. Ces antioxydants, essentiellement d'origine végétale, sont des composés phénoliques (Yousfi *et al.*, 2007; Lageurre *et al.*, 2007) ayant diverses propriétés pharmaco-biologiques telles que les activités antiallergique, anti-inflammatoire, antimicrobienne, anti-thrombotique, cardio-protective, anti-drépanocytaire, etc. (Middleton *et al.*, 2000; Ksouri *et al.*, 2007; Mpiana *et al.*, 2007). Ces actions sont attribuées à leurs effets antioxydants liés à leurs propriétés redox très important dans la séquestration et la neutralisation des radicaux libres et le piégeage de l'oxygène, ou la décomposition des peroxydes (Nijveldt *et al.*, 2001).

L'espérance de vie des drépanocytaires est inférieure à 20 ans et au moins 80% d'enfants drépanocytaires meurent avant l'âge de 5 ans en cas d'absence de prise en charge médicale et seulement moins de 18% arrivent à l'âge adulte. C'est la première maladie génétique en Afrique par le nombre des

¹ Faculté des Sciences, Université de Gbado-Lite, Gbado-Lite, République démocratique du Congo

² Faculté des Sciences, Université de Kinshasa, République démocratique du Congo

³ Faculté de Médecine, Université Protestante du Congo, Kinshasa, République démocratique du Congo

malades et constitue un problème majeur de santé publique (Griot *et al.*, 2003). La médecine alternative joue un rôle majeur dans la prise en charge de cette pathologie en milieu défavorisé. C'est ainsi que les plantes alimentaires sauvages sont de plus en plus explorées en vue de leur intégration dans l'alimentation quotidienne des malades. Dans l'objectif de valider scientifiquement la bio-activité de ces plantes, un choix a été porté sur *Lippia multiflora* dans l'hypothèse que cette plante peut soulager certains symptômes de la drépanocytose, comme la douleur chronique et l'inflammation. Ce travail a pour objectifs spécifiques de déterminer la composition qualitative et quantitative de *Lippia multiflora*; d'évaluer l'activité anti-radicalaire, anti-drépanocytaire, anti-inflammatoire et sa cytotoxicité vis-à-vis des érythrocytes *in vitro*. L'intérêt de cette étude est évident car en cas de validation de ces activités pharmaco-biologiques, cette étude conduirait à la valorisation d'une plante à la valeur ajoutée médicinale et alimentaire conformément au protocole de Nagoya sur l'accès aux ressources génétiques et le partage des avantages. Cette étude permettrait en outre de promouvoir l'utilisation de cette plante médicinale pour le traitement de cette maladie, en vue de réduire le taux de mortalité chez les drépanocytaires et ainsi atteindre l'ODD 3 (Bien-être et bonne santé).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel biologique

Les feuilles de *Lippia multiflora* Moldenke ont été achetées au marché de la Liberté de Kinshasa et authentifiées à l'herbarium de l'Institut National d'Études et de Recherches Agronomiques (INERA) logé à la Faculté des Sciences et Technologies de l'Université de Kinshasa par comparaison à l'exsiccatum d'herbier N° 148 (MUAMBI).

Le modèle animal utilisé dans cette étude sont le sang humain fourni par le Centre de Médecine Mixte et d'Anémie SS de Yolo-Sud (Mabanga) situé dans la commune de Kalamu à Kinshasa et les œufs de poules qui ont été achetés dans un marché de la place.

Micrographie des poudres

Deux à trois gouttes de réactif de Steinmetz ont été déposés sur une lame porte-objet et une petite quantité de poudre prélevée avec soin au moyen d'une fine spatule y a été ajoutée avec précaution. La préparation microscopique est alors couverte d'une lamelle et homogénéisée en appuyant légèrement. Les bavures ont été absorbées puis le dessous de la lame porte-objet a été essuyé à l'aide d'un papier essuie-tout. L'examen micrographique a été réalisé l'objectif 40x après la mise au point comme précédemment décrit par Masengo *et al.*, (2023).

Screening chimique en solution

Le screening chimique est effectué sur l'extrait aqueux ou méthanolique obtenu par macération de 10 g de poudre des feuilles de *Lippia multiflora* dans 100 mL de solvant pendant 24 heures à la température ambiante, ensuite filtré. Les polyphénols totaux ont été identifiés à l'aide du réactif de Burton; les flavonoïdes à l'aide du réactif de Shinoda en présence de quelques copeaux de Mg; les quinones liées au moyen du réactif de Borntrager; les anthocyanes à l'aide HCl (20%); leucoanthocyanes à l'aide du réactif de Shinoda en présence de quelques gouttes d'alcool isoamylique; les tanins à l'aide du mélange de FeCl₃ 2% et le réactif de Stiansny. La recherche des alcaloïdes a été faite sur l'extrait aqueux acidifié avec quelques gouttes de HCl 0,1N grâce au réactif de Dragendorff. Les stéroïdes et terpènes sont recherchés dans l'extrait organique au moyen du réactif de

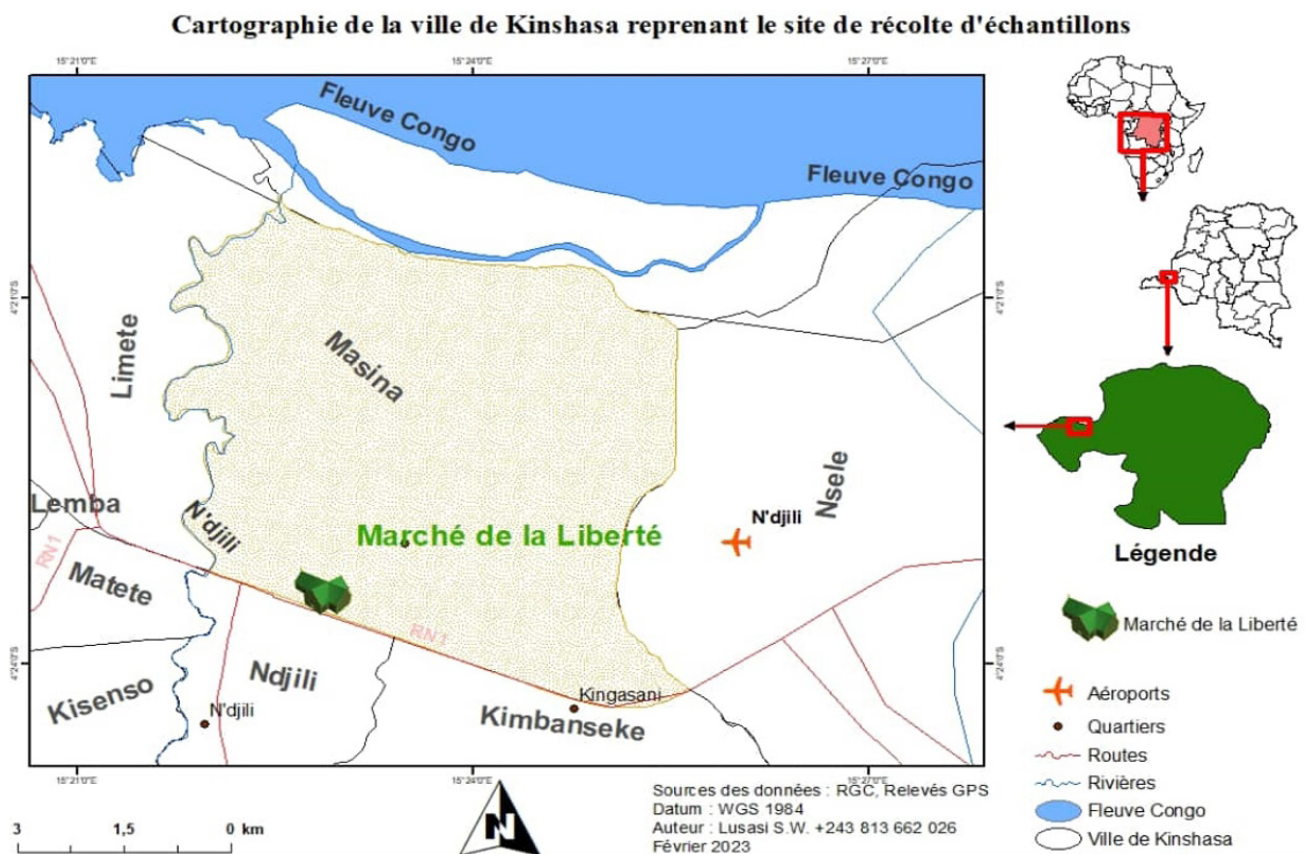


Figure 1: Localisation géographique du site d'achat des feuilles de *Lippia multiflora* Moldenke

Liebermann-Burchardat alors que les quinones libres sont identifiées à l'aide du réactif de Borntrager (Mpiana *et al.*, 2007; Mpiana *et al.*, 2008; Mpiana *et al.*, 2010).

Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux de nos extraits a été déterminée en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu (Tshibangu *et al.*, 2016). La quantité des polyphénols totaux est exprimée en mg équivalents d'acide gallique (GAE)/g d'extrait sec en utilisant l'équation suivante issue de la droite d'étalonnage: $y = 0,0037x + 0,0218$ ($R^2 = 0,9899$). Où x est la concentration et y l'absorbance de l'acide gallique (mg/g). La droite d'étalonnage pour le dosage de polyphénols totaux est reprise dans la figure 2.

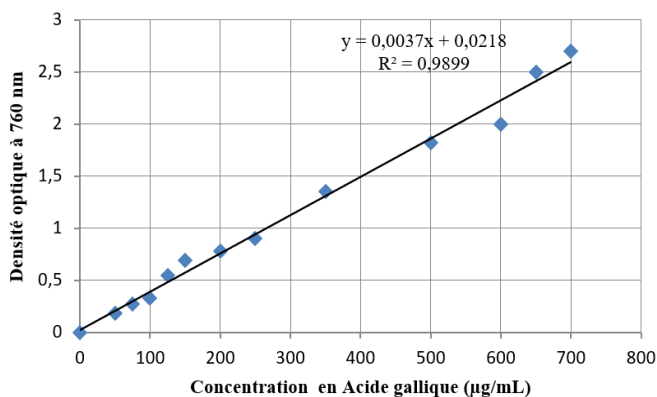


Figure 2: Droite d'étalonnage pour le dosage de polyphénols totaux

Dosage des flavonoïdes totaux

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux a été faite par spectrophotométrie UV-visible à 415 nm grâce au trichlorure d'aluminium qui forme un complexe jaune avec les flavonoïdes (Tshibangu *et al.*, 2016). La teneur en flavonoïdes est évaluée à partir de l'équation: $y = 0,0542x - 0,0367$ ($R^2 = 0,987$) (Figure 3). Où x est l'absorbance et y l'équivalent de quercétine (mg/g).

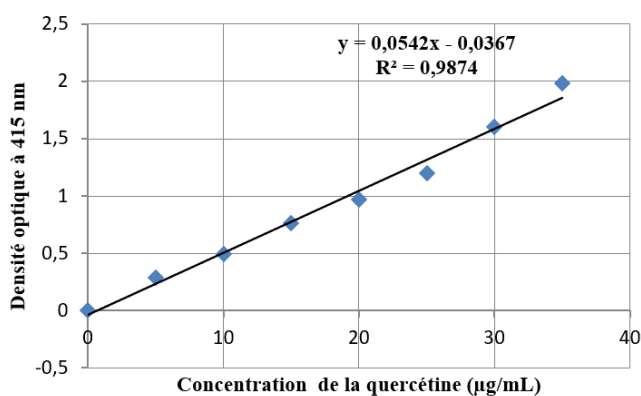


Figure 3: Droite d'étalonnage pour le dosage de flavonoïdes totaux

Dosage des anthocyanes

Le dosage des anthocyanes a été fait selon la méthodologie de Lebreton *et al.*, (1967). La longueur d'onde de travail (maximum) a été identifiée à partir du spectre d'absorption de l'extrait n-butanolique de 480 à 600 nm. Le taux (%) d'anthocyanes est calculé par la formule:

$$\text{Tanthocyanes} = (\gamma A / \epsilon) \times M \times V \times d/p$$

Avec γ : facteur de correction = 6; A: absorbance de l'extrait à la longueur d'onde maximale; ϵ : coefficient d'absorption molaire du cyanidol (=34700); M: masse molaire du leucocyanidol (=306) (g/mol); V: volume de la solution n-butanolique (mL); d: dilution; p: masse de matière sèche du matériel végétal (g).

Dosage des tanins condensés

Ce dosage est effectué au moyen de la vanilline 1% en milieu acide sulfurique 70% (Price *et al.*, 1978). Le pourcentage en tanins condensés est calculé à partir de la formule:

$$T (\%) = 5,2 \cdot 10^{-2} \times A \times V/P$$

Avec: T(%): pourcentage de tanins condensés; $5,2 \cdot 10^{-2}$: constante exprimée en équivalents de cyanidines; A: Absorbance; V: Volume de l'extrait phénolique utilisé; P: poids de l'échantillon.

Dosage des tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont dosés par la méthode de Mole et Waterman (1987) basée sur une réaction avec le chlorure de fer (III): FeCl_3 0,01 M dans du HCl 0,001M). L'absorbance est mesurée à 660 nm et le pourcentage en tanins hydrolysables est calculé suivant la formule:

$$T(\%) = A \times M \times V / \epsilon \text{ mole} \times P$$

Où T(%): pourcentage des tanins hydrolysables; A: Absorbance; ϵ Mole: 2169 (l'acide gallique); M: 300; V: volume de l'extrait utilisé; P: poids de l'échantillon.

Profilage par chromatographie sur couche mince

La détermination de différents métabolites secondaires par CCM (chromatographie sur couche mince) a été réalisée comme précédemment réalisée (Ngbolua *et al.*, 2021a).

Recherche des flavonoïdes et acides phénoliques

La poudre des feuilles de *Lippia multiflora* (1 g) est d'abord extraite sous agitation par du méthanol pendant 10 minutes et le filtrat est utilisé pour la CCM en utilisant le Silicagel F 254 comme phase stationnaire: Deux phases mobiles sont utilisées: Phase mobile 1 (acétate d'éthyle-acide formique-méthanol-eau, 40:1:5:4 v/v) avec comme témoin, l'acide chlorogénique et la rutine (1 mg/mL dans le méthanol). La phase mobile 2 est constituée des solvants dichlorométhane-acide formique-acétone (40:5:10 v/v) avec pour témoin l'acide gallique, la quercétine, le kampfèrol et l'acide rosmarinique (1 mg/mL dans le méthanol). Les composés recherchés sont identifiés par la présence de spots fluorescents de couleurs diverses en fonction de leurs structures moléculaires. En présence du réactif de Neu (DPBAE/PEG), les acides phénoliques donnent une fluorescence bleue tandis que flavonoïdes donne la fluorescence jaune, orange ou verte.

Recherche des Iridoïdes

Dans la recherche des iridoïdes, la phase stationnaire est le Silicagel F 254 tandis que la phase mobile est constituée par le mélange des solvants suivants: acétate d'éthyle-méthanol-eau (50:6,75:5 v/v). L'acide sulfurique à 5% dans l'éthanol est utilisé comme révélateur après chauffage du chromatogramme à 100 °C pendant 10 minutes. Les iridoïdes vrais donnent des colorations et les autres terpènes se colorent en noir.

Recherche des Anthocyanes

La phase mobile est constituée du mélange des solvants acétate d'éthyle-acide formique-eau (50:5:20 v/v). La D-catéchine est utilisée comme témoin tandis que le révélateur est la vanilline phosphorique. Après chauffage du chromatogramme à 100 °C pendant 10 minutes, les anthocyanes donnent des colorations roses.

Anthraquinones (hétérosides anthracéniques)

La phase mobile le mélange acétate d'éthyle-méthanol-eau (50:6,75:5 v/v). Le révélateur est le KOH éthanolique à 10%. Les anthraquinones sont colorées en rouge et donnent une fluorescence rouge à 366 nm tandis que les anthrones (aloïnes) donnent une couleur jaune.

Terpènes

La matière végétale (1 g) est d'abord extraite sous agitation pendant 15 minutes par 6 mL d'acétate d'éthyle. La phase mobile est le mélange binaire toluène-acétate d'éthyle (27:3 v/v).

Le thymol, le menthol et l'acide oléanolique (1 mg/mL dans le méthanol) sont utilisés comme témoins tandis que la vanilline sulfurique est utilisée comme révélateur. Après chauffage du chromatogramme à 100 °C pendant 10 minutes, les terpènes sont diversement colorés.

Coumarines

La solution préparée au test des terpènes est utilisée pour l'exécution de ce test. La phase mobile est le mélange toluène-éther (1 : 1, saturé avec l'acide acétique 10%). Pour l'obtenir, on mélange 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 et la phase supérieure est utilisée comme phase mobile et le révélateur est le KOH éthanolique à 10%. Les coumarines donnent une fluorescence bleue.

Évaluation de l'activité anti-radicalaire

Décoction

10 g de poudre végétale sont mélangés avec 100 mL d'eau puis portés à l'ébullition pendant 3 à 5 minutes. Après filtration, l'extrait est concentré à l'évaporateur rotatif puis évaporé à sec à l'étuve pendant 24 heures et ensuite conserver à +4 °C.

Percolation

10 g de poudre sont d'abord mouillés avec le mélange méthanol/dichlorométhane (1:1) pendant 15 minutes puis la poudre mouillée est placés dans un percolateur et 20 mL du solvant ont été ajoutés et laisser macérer pendant 48 heures. Le mélange des solvants a été renouvelé jusqu'à épuisement total (volume final 200 mL de percolât). Le percolât a été évaporé à sec à l'évaporateur rotatif puis l'extrait sec obtenu est conservé à +4 °C.

Préparation des échantillons pour analyse

10 mg d'extrait sec (décocté ou percolât) sont dissouts 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). Des dilutions sont ensuite réalisées pour obtenir les concentrations suivantes: 0,5 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,2 mg/mL et 0,1 mg/mL.

Test au radical ABTS

Le radical ABTS est préparé en dissolvant dans 500 µL d'eau distillée une quantité du réactif ABTS correspondant à 20 millimoles (solution A). Ensuite, on dissout dans 500 µL d'eau distillée une quantité persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$) correspondant à 10 millimoles (solution B). Les solutions A et B sont ensuite mélangées à volume égal (solution mère du radical ABTS) et garder à l'abri de la lumière pendant 12 à 16 heures.

Pour réaliser le test, la solution mère du radical est diluée avec le méthanol (densité optique: 0, 6-0,8). Pour réaliser le test, on place dans un tube à essais, 20 µL de méthanol et 1980 µL du radical ABTS (contrôle négatif) ou 20 µL d'extrait et 1980 µL de la solution du radical ABTS (échantillon). Le mélange est incubé à l'abri de la lumière pendant 30 minutes et la densité optique est lue à 734 nm. Le taux d'inhibition du radical ABTS est déterminé à l'aide de la formule:

$$\%Inhibition = \frac{DO \text{ contrôle négatif} - DO \text{ échantillon}}{DO \text{ contrôle négatif}} \times 100$$

Les valeurs des CI50 de différents échantillons sont déterminées par régression linéaire à l'aide du logiciel Origin 8.5 Pro. L'expérience est réalisée en triple et les valeurs sont des moyennes ± écarts-types.

Test au DPPH

3,2 mg de radical DPPH sont dissous dans 100 mL de méthanol 80% puis la solution est gardée à l'abri de la lumière pendant au moins une heure. L'absorbance de cette solution est ensuite ajustée à $0,70 \pm 0,05$ à l'aide du méthanol 80%. Pour réaliser le test, 20 µL de méthanol ou d'extrait (à différentes concentrations) sont mélangés avec 1980 µL de la solution du radical DPPH puis incubés à l'abri de la lumière pendant 30 minutes. L'absorbance est lue à 517 nm et le taux d'inhibition du radical DPPH par l'échantillon est calculé comme dans la formule précédente. L'expérience est réalisée en triple et les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type (Ngbolua *et al.*, 2019).

Test anti-inflammatoire

Le test est réalisé selon la méthode décrite par Kumari *et al.*, (2015) avec légère modification et consiste en la dénaturation thermique de l'ovalbumine. 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_2HPO_4 (1,44 g/L), 1,76 mM KH_2PO_4 (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 UV-visible 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. Le taux d'inhibition de la dénaturation thermique de l'ovalbumine est calculé à partir de la relation:

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

L'expérience est réalisée en triple et les valeurs sont des moyennes ± écarts-types.

Test de cytotoxicité qualitative

Ce test évalue les dommages causés à la membrane des globules rouges par l'extrait ou la drogue. La capacité d'induction de l'apoptose de l'extrait de *Lippia multiflora* sur les érythrocytes humains a été évaluée en traitant les échantillons de sang avec 0,1% d'extrait pendant 1 heure à la 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. Les frottis sanguins sont observés au microscope optique (OPTIKA) et les images des globules rouges sont prises en utilisant un téléphone de marque iPhone X (Prajiha 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 une goutte de DMSO. Le taux d'hémolyse est évalué à l'aide de la formule suivante:

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

L'extrait est considéré comme cytotoxique lorsqu'à 10 µg/mL, le taux d'hémolyse est $\geq 50\%$ (Ngbolua *et al.*, 2011a, b; Gbolo *et al.*, 2022).

Test d'Emmel

La recherche d'activité anti-falcémiant est effectuée sur du sang drépanocytaire fraîchement prélevé après électrophorèse d'hémoglobine sur gel d'acétate de cellulose à pH alcalin (tampon Tris 100 mM, pH 9). Le métabisulfite de sodium à 2% (eau physiologique) est utilisé pour créer l'hypoxie. Les préparations microscopiques sont réalisées en plaçant sur la lame porte-objet une goutte de sang (dilué 3 fois avec le métabisulfite de sodium à 2% isotonique) et une goutte de la drogue. La solution est recouverte par une lamelle et les bords des lamelles sont recouverts avec la paraffine en surfusion en vue de créer l'hypoxie. Les différentes préparations sont observées au microscope optique après 24 heures d'incubation (Mpiana *et al.*, 2007; Mpiana *et al.*, 2008).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Micrographie

La figure 4 donne les caractéristiques micrographiques de *Lippia multiflora*.

L'analyse micrographique de la poudre de *Lippia multiflora* par le réactif de Steimetz a permis d'identifier les cellules épidermiques (a), les stomates (b), les fragments de vaisseaux spiralés (c) et les trichomes unicellulaires non glanduleux (d).

Screening chimique

Le tableau 1 donne les grands groupes chimiques contenus dans *Lippia multiflora*.

Le screening chimique en solution réalisé sur les feuilles de *Lippia multiflora* a permis de d'identifier les composés phénoliques (tels que les flavonoïdes, les anthocyanes, les leuco-anthocyanes, les tanins et les quinones liés), les saponines, les stéroïdes. Il faut cependant noter l'absence des alcaloïdes, triterpènes et quinones libres. Selon Allo *et al.*, (2020), *Lippia multiflora* cultivé en Côte d'Ivoire contient les alcaloïdes, les tanins, les coumarines et est dépourvu des saponines et des triterpènes. La variation dans la composition chimique de différents écotypes de *Lippia multiflora* peut s'expliquer par la différence des conditions bioclimatiques, de l'environnement géologique des sites de récolte des échantillons qui induisent les modifications épigénétiques chez la plante (Ngbolua *et al.*, 2011a,b).

Tableau 1: Résultat du screening phytochimique

Métabolites secondaires	Résultats
1. Polyphénols	+
○ Flavonoïdes	+
○ Anthocyanes	+
○ Leucoanthocyanes	+
○ Tanins	+
○ Quinones liées	+
2. Alcaloïdes	-
3. Saponines	+
4. Triterpénoïdes	-
5. Stéroïdes	+
6. Quinones libres	-

Légende: (+) présence ; (-) absence

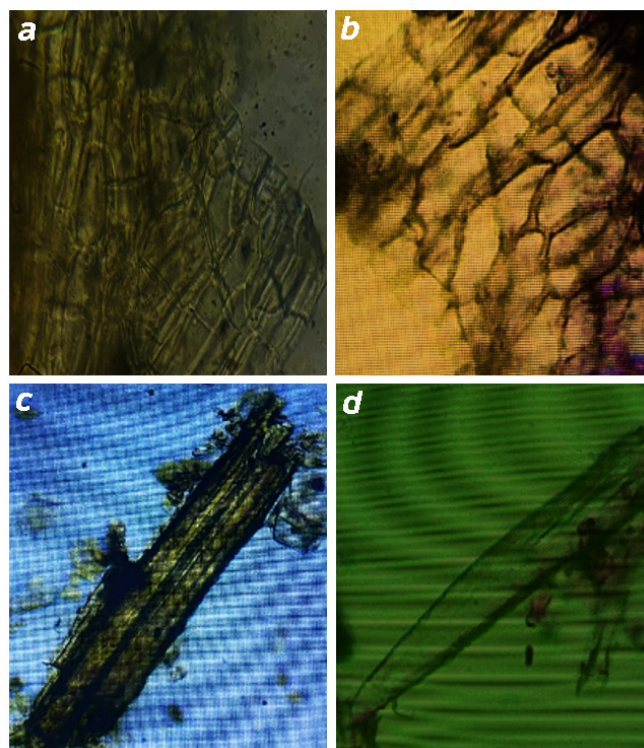


Figure 4: Micrographie optique de poudre des feuilles de *Lippia multiflora* Moldenke (Grossissement: 500X)

Profil chromatographique sur couche mince

Les figures 5 (a) à 5 (g) ci-dessous illustrent le chromatogramme des composés identifiés dans *Lippia multiflora* Moldenke.

Le chromatogramme de la figure 5 (a) illustre 1 spot vert citron et 1 spot rose pour les acides phénoliques et la figure 5 (b) donne l'image du chromatogramme des flavonoïdes qui illustre 1 spot bleu fluorescence. Les coumarines ont été identifiées sur le chromatogramme de la figure 5 (c) avec 3 spots roses à différents R_f, 2 spots bleus et 1 spot rouge-brun. La figure 5 (d) illustre 3 spots roses, 4 spots bleus fluorescents et un spot rouge-brun pour le chromatogramme de triterpénoïdes. Le chromatogramme de la figure 5 (e) donne l'image d'un seul spot bleu des anthocyanes et la figure 5 (f) des anthraquinones a été identifier et a présenté 2 spots rouge-brun tandis que le chromatogramme de figure 5 (g) donné qu'un seul spot bleu pour les iridoïdes.

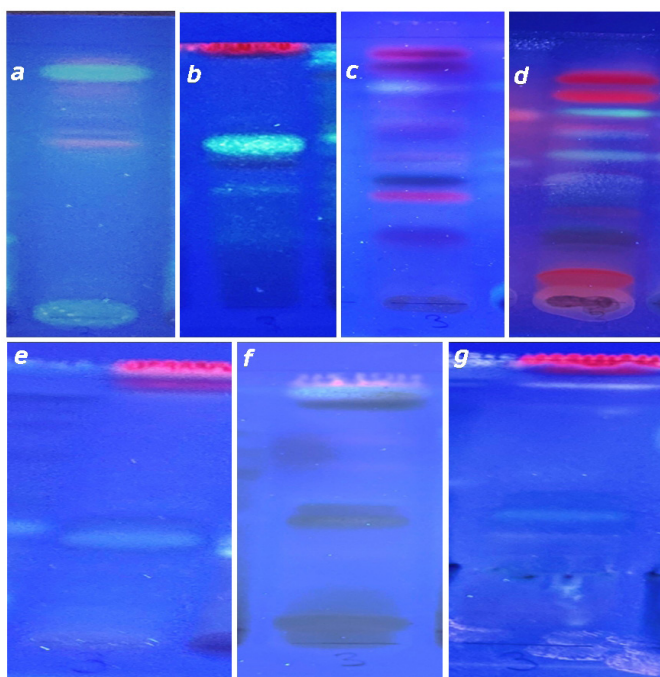


Figure 5: Chromatogramme CCM des composés identifiés dans *Lippia multiflora* Moldenke

Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux

Le tableau 2 ci-dessous donne les valeurs moyennes de concentrations en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux de l'espèce *Lippia multiflora*.

Il ressort de ce tableau que la teneur en polyphénols totaux est de $336,2 \pm 1,93$ mg EAG/g tandis que celle des flavonoïdes totaux est de $6,60 \pm 0,16$ mg EQ/g. La teneur en anthocyanes est de $0,111 \pm 0,014$ et les tanins (condensés et hydrolysables) sont respectivement de l'ordre de $0,425 \pm 0,052\%$ et $0,093 \pm 0,003\%$. Les études menées par Dabire et al., (2015) sur la même espèce cultivée au Burkina Faso ont relevé une concentration 13 fois inférieure ($26,0 \pm 0,10$ mg EAG/g d'extrait) que celle de la présente étude. Il a été

remarqué que la concentration en flavonoïdes a été proche ($7,55 \pm 0,10$ mg EQ/g) de celle de l'espèce sous étude. La différence des teneurs peut être expliquée par la variabilité du métabolisme phénolique dans les différentes parties de la plante qui peut changer pendant la période de croissance, ceci peut être lié aux conditions climatiques et environnementales (sécheresse, température chaude, forte exposition solaire, salinité), qui stimulent la biosynthèse de métabolites secondaires (Ngbolua et al., 2011a, b). Il s'en déduit donc que, *Lippia multiflora* récolté en RDC sont riches en polyphénols totaux et flavonoïdes, et cela justifierait leur utilisation en pharmacopée d'autant plus que ces deux métabolites possèdent plusieurs activités biologiques (Tshilanda et al., 2019; Middleton et al., 2000; Gbolo et al., 2022).

Propriétés anti-radicalaires de *Lippia multiflora*

La figure 6 donne l'évolution du taux d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration en extrait de *L. multiflora*.

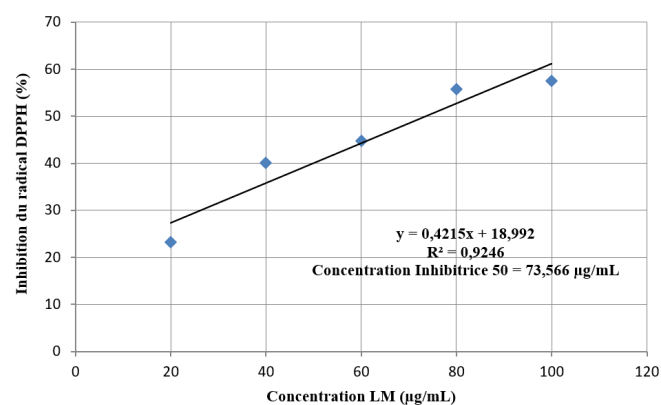


Figure 6: Taux d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration en extrait (percolât) de *L. multiflora*

La figure 7 donne le taux d'inhibition du radical DPPH par le percolât et le décocté (Figure 7a) et l'inhibition du radical ABTS par le percolât de *L. multiflora* (Figure 7b).

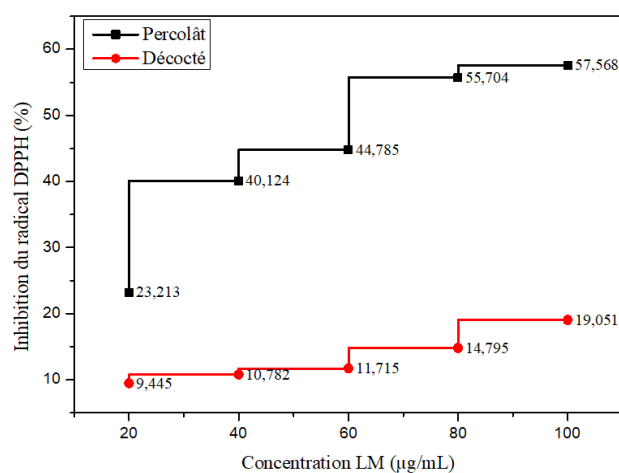


Figure 7a: Taux d'inhibition du radical DDPH par le percolât et le décocté

Tableau 2: Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux de *Lippia multiflora*

Polyphénols totaux (mg EAG/g d'extrait)	Flavonoïdes totaux (mg EQ/g d'extrait)	Anthocyanes (%)	Tanins condensés (%)	Tanins hydrolysables (%)
$336,2 \pm 1,93$	$6,61 \pm 0,161$	$0,111 \pm 0,014$	$0,425 \pm 0,052$	$0,093 \pm 0,003$

Il ressort de cette figure 7a que le taux d'inhibition du radical DDPH est dose-dépendant. La valeur de CI50 calculée par régression linéaire est de 73,6 µg/mL. Notons cependant que la décoction diminue l'activité anti-radicalaire de *L. multiflora*. En effet, il est bien établi que la chaleur détruit les composés bioactifs thermolabiles (Barkat et Kadri, 2011).

La figure 7b montre que la percolation est le meilleur moyen pour isoler les composés anti-radicalaire contenus dans cette plante. A 100 µg/mL, le taux d'inhibition du radical DDPH est de 57,6 % pour le percolât de *L. multiflora* contre 19,0% seulement pour le décocté. Alors qu'à cette même dose, le taux d'inhibition du radical ABTS est de 97,3 %.

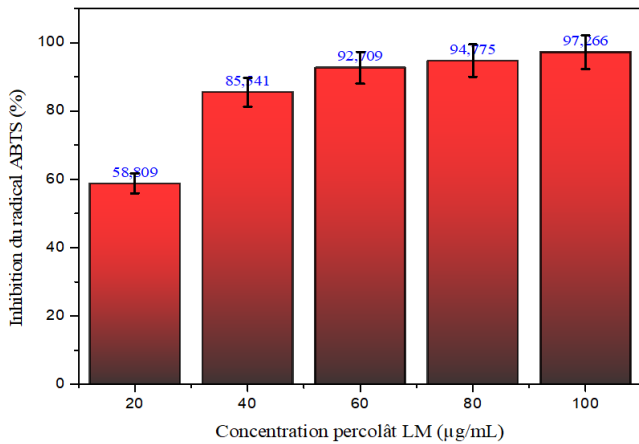


Figure 7b: Taux d'inhibition du radical ABTS par le percolât

La figure 7c donne l'évolution du taux d'inhibition du radical ABTS en fonction de la concentration de *L. multiflora* (décocté).

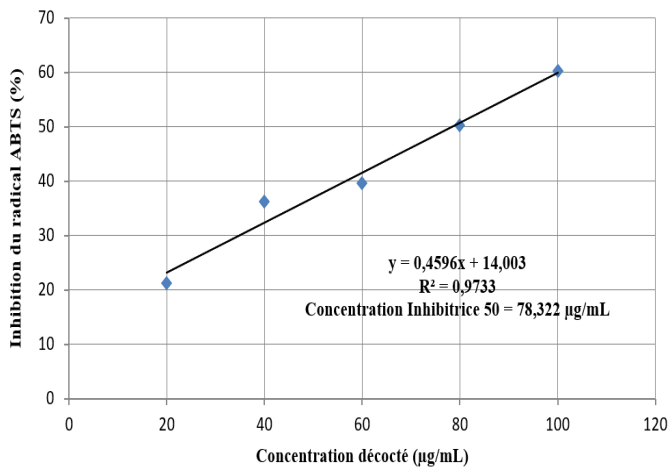


Figure 7c: Taux d'inhibition du radical ABTS en fonction de la concentration de *L. multiflora* (décocté)

Il ressort de cette figure que la valeur de CI50 du décocté est de 78,3 µg/mL. L'ensemble de ces résultats montre que *L. multiflora* est doué des propriétés anti-radicalaires, ce qui permet de justifier son utilisation en médecine traditionnelle pour soigner la drépanocytose. Ce pouvoir anti-radicalaire est dû à la présence des composés phénoliques contenus dans cette plante. Selon les études menées par Balaya (2014) sur les huiles essentielles de *Lippia multiflora*, celles-ci ont présenté un effet antioxydant important avec le radical DPPH ($42,2 \pm 2,73$ µg/mL) et ($10,2 \pm 0,02$ µg/mL) pour le radical ABTS par rapport aux feuilles de *Lippia multiflora* utilisées dans la présente étude.

Propriétés anti-inflammatoires de *Lippia multiflora*

La figure 8 ci-dessous donne le taux d'inhibition de la dénaturation thermique de l'ovalbumine *in vitro* (%I) par *Lippia multiflora*.

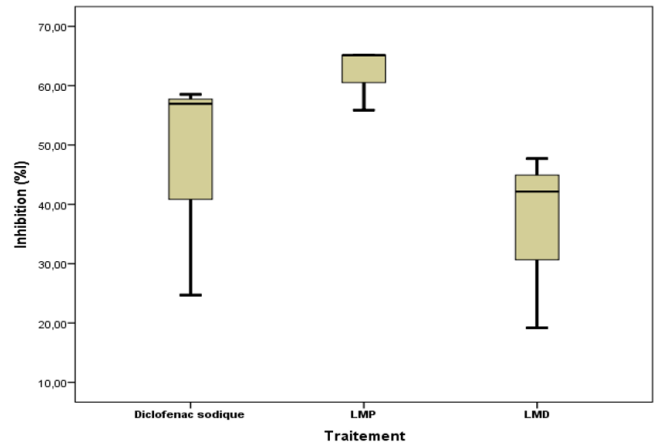


Figure 8: Taux d'inhibition de la dénaturation thermique de l'ovalbumine *in vitro* par *Lippia multiflora*

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 $46,7 \pm 19,1 < \%I < 75,0$, le produit est actif et si $75 < \%I < 100$, il est très actif. Il ressort de cette étude que le décocté de *Lippia multiflora* (LMD: $36,3 \pm 15,1\%$) est faiblement actif tandis que son percolât (LMP: $62,1 \pm 5,3\%$) est actif.

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 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 (Nader, 2019). 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 calcification 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 (Sangare *et al.*, 1991).

Dans le cas particulier du stress oxydatif, l'organisme considère les radicaux libres excessifs comme des agents pathogènes (responsables de l'hyperplasie intimale 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). A cet effet, la protéine C-réactive, l'alpha 1 glycoprotéine acide, le récepteur TLR4, le facteur de transcription NF-κB, 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.

Propriétés cytotoxiques de *Lippia multiflora*

La cytotoxicité a été évaluée en utilisant les érythrocytes comme modèle biologique.

La figure 9 ci-dessous donne le pourcentage d'hémolyse des extraits aqueux et organique *Lippia multiflora*.

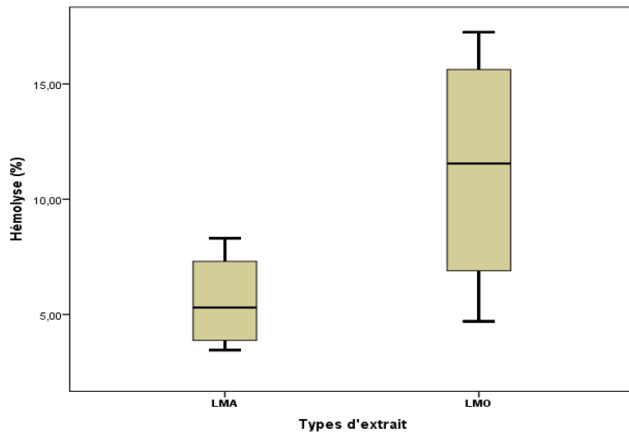


Figure 9: Taux d'hémolyse des érythrocytes en fonction d'extraits (aqueux et organique) de *Lippia multiflora*

Il ressort de cette figure que l'extrait aqueux est moins hémolytique (% hémolyse = $5,6 \pm 1,1$) que l'extrait organique (% hémolyse = $11,3 \pm 2,75$). Il faut cependant noter qu'à 1000 $\mu\text{g/mL}$, le taux d'hémolyse est inférieur à 50%, ce qui montre que *Lippia multiflora* n'est pas très toxique. L'analyse statistique (ANOVA à 1 facteur) a montré qu'il n'existe pas de différence significative entre les deux types d'extraits.

Propriétés anti-drépanocytaires de *Lippia multiflora*

Les figures 10A et 10B ci-dessous donnent les micrographies du sang SS non traité et du sang SS en présence de l'extrait aqueux de *Lippia multiflora*.

Comme on peut le constater sur la figure 10 (A), la majorité des érythrocytes présente un phénotype drépanocytaire. Cette falciformation en conditions d'hypoxie est une preuve que le sang utilisé provient d'un sujet drépanocytaire. Cependant, dans les mêmes conditions opératoires, les drépanocytes reprennent la forme circulaire biconcave caractéristique des érythrocytes normaux. Ces résultats

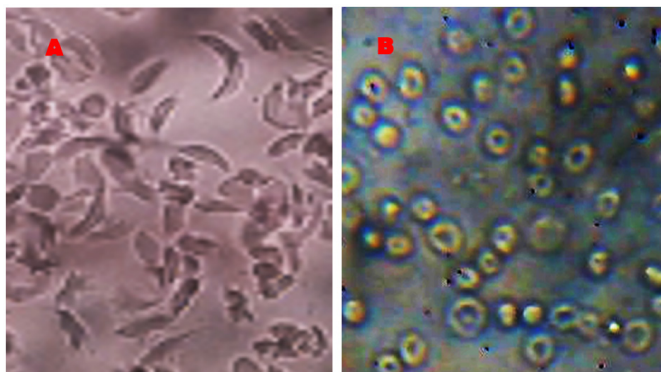


Figure 10: Micrographie optique du sang SS non traité (A) et du sang SS en présence de l'extrait aqueux de *Lippia multiflora* (B)

montrent que *L. multiflora* est doué des propriétés anti-drépanocytaires et confirment donc les travaux antérieurs (Masengo et al., 2022). Cette activité est due à la présence des composés phénoliques et/ou triterpéniques présents dans cette plante (Mpiana et al., 2008; Ngbolua et al., 2015; Tshilanda et al., 2015; Tshilanda et al., 2016; Gbolo et al., 2022). Masengo et al., (2023) ont également démontré *in silico* que cette activité peut être attribuée aux facteurs antinutritionnels tels que les acides oxalique et phytique présents dans les feuilles de *L. multiflora*.

La médecine alternative peut constituer ainsi un atout pour la couverture sanitaire universelle (CSU) en République démocratique du Congo (RDC). La CSU est une politique internationale qui vise à ce que chaque personne puisse accéder aux services de santé de qualité dont elle a besoin, «au bon moment et au bon endroit», sans que cela génère pour elle de difficultés financières (WHO, 2023). En effet, en RDC, le coût lié à la prise en charge de la drépanocytose est exorbitant aggravant la pauvreté des familles et détruisant ainsi leur avenir et celui de leurs enfants. Il est bien établi qu'en Afrique, plus de 80% de la population recourt à la médecine traditionnelle pour se soigner et constitue de ce fait un moyen pour se soigner à moindre frais. En outre, la capacité des pays Africains à produire ses propres médicaments est faible (plus de 95 % des médicaments étant importés).

Les résultats obtenus dans cette étude démontrent à suffisance que la médecine traditionnelle basée sur les évidences scientifiques peut aider à améliorer efficacement le besoin de la RDC et du continent en produits pharmaceutiques en vue d'atteindre l'objectif de développement durable n°3 des Nations Unis: «Bien-être et santé» pour tous à l'horizon 2030. Ainsi, en conjuguant sa riche biodiversité végétale, l'héritage médicinal traditionnel transmis par divers peuples au fil des années, et les recherches scientifiques modernes, la RDC a toutes les clés en main pour résoudre ses problèmes de santé. A cet effet, le financement de la recherche scientifique et des unités de transformation des plantes médicinales et aromatiques en médicaments essentiels pour couvrir le besoin du pays (accessibilité et faible coût) peut, en outre, faciliter le développement socio-économique à travers une initiative industrielle agricole à l'échelle communautaire (Masengo et al., 2022). En outre, les sujets drépanocytaires ont besoin d'une couverture sanitaire urgente au bon moment quelle que soit le lieu où ils se trouvent en RDC (ville ou milieu rural). La stratégie basée sur la prise en charge par les médicaments à base des plantes alimentaires sauvages tel que *Lippia multiflora* est une alternative crédible pour les malades aussi bien sur le plan des évidences scientifiques que sur le plan culturel (Ngbolua et al., 2021b; Masengo et al., 2021c). Ainsi, la domestication de cette plante sauvage, permet de lutter aussi contre les changements climatiques par la création d'un puits carbone visant la réduction des gaz à effet de serre comme le recommande le protocole de Kyoto (Ngbolua, 2020).

Limitations de l'étude

Les études scientifiques sur les effets de *Lippia multiflora* sur la drépanocytose sont encore très limitées, mais certaines recherches ont montré que cette plante peut aider à réduire la douleur et l'inflammation associées à la maladie. En effet, Abena et al., (2003) ont montré que les extraits de *L. multiflora* peuvent réduire la douleur et l'inflammation

chez les rats ce qui démontre que cette plante pourrait avoir un potentiel thérapeutique pour le traitement de la douleur chronique chez les patients atteints de drépanocytose.

Il a été rapporté aussi que les espèces du genre *Lippia* (dont *L. multiflora*) peuvent aider à prévenir les complications telles que les ulcères de la peau qui sont récurrentes dans la drépanocytose. Les chercheurs ont attribué ces effets aux propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires de la plante (Pacual *et al.*, 2001; Masengo *et al.*, 2021b), activités également démontrées *in vitro* dans cette étude. Cependant, il convient de noter que ces études ont été menées *in vitro* et sur des animaux de laboratoire et que des études biocliniques sont donc nécessaires pour déterminer l'efficacité et la sécurité de *L. multiflora* chez les humains atteints de drépanocytose. Par conséquent, avant de considérer l'utilisation de *L. multiflora* pour le traitement de la drépanocytose, une étude clinique à grande échelle est nécessaire.

CONCLUSIONS

Dans le présent travail, nous nous sommes assignées comme objectif de déterminer la composition chimique en quelques métabolites secondaires de *Lippia multiflora*, identifier ces derniers par CCM; évaluer son activité: antioxydante, anti drépanocytaire, inflammatoire et sa cytotoxicité pour se rassurer de son innocuité.

De cette étude, il a été trouvé que:

- L'analyse micrographique de la poudre de *Lippia multiflora* par le réactif de Steimetz a permis d'identifier les cellules épidermiques, les stomates, les fragments de vaisseaux spiralés et les trichomes unicellulaires non glanduleux;
- Du point de vue phytochimique, cette plante contient les acides phénoliques, les flavonoïdes, les anthocyanes, les leuco-anthocyanes, les quinones liées, les coumarines, les anthraquinones, les iridoïdes, les saponines, les stéroïdes et les tri-terpènes;
- L'activité anti-oxydante du percolât est supérieure à celle du décocté et qu'en outre les feuilles de *L. multiflora* ne sont pas cytotoxiques;
- Ces feuilles sont douées en outre des propriétés anti-inflammatoires et anti-drépanocytaires *in vitro*.

Cette plante bioactive étant probablement non cytotoxique, elle peut être développée et proposée comme candidat aliment fonctionnel pour le traitement symptomatique des crises drépanocytaires. Son activité pharmaco-biologique peut en outre être améliorée par bio-optimisation en l'associant à d'autres plantes alimentaires sauvages.

RÉFÉRENCES

- Abena, A.A., Diatwa, M., Gakosso, G., Gbeassor, M., Hon-di-Assah, T., Ouamba, J.M. (2003). Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects of essential oil of *Lippia multiflora*. *Fitoterapia*, 74: 231-236.
- Allo F.Y., Konan A.B., Méité S., Datté J.Y. (2020). Acute and sub-acute toxicity studies of the aqueous leaf extract of *Lippia multiflora* from the Bélier Region (Côte d'Ivoire). *Asian Journal of Emerging Research*, 2: 43-53.
- Barkat M., Kadri F. (2011). Impact de deux modes de cuisson sur la teneur en polyphénols solubles de six légumes. *Revue de génie industriel*, 6: 41-45.
- Bayala B. (2014). Étude des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-prolifératives et anti-migratoires des huiles essentielles de quelques plantes médicinales du Burkina Faso sur des lignées cellulaires du cancer de la prostate et de glioblastomes. Thèse de doctorat, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II, France.
- Dabire C.M., Bationo R.K., Hema A., Nebie R.C., Pale E., Dhannabal S.P., Nacro M. (2015). Total phenolics content, flavonoids profiling and antioxidant activity of *Lippia multiflora* leaves extracts from Burkina Faso. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 5: 28-33.
- 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 Drepanoalpha® et évaluation de leur activité antidrépanocytaire *in vitro*. *Annales Africaines de Médecine*, 16: e4882-e4898.
- Giroit M., Begué P., Galacteros F. (2003). La Drépanocytose. Editions John Libbey, Eurotext, Paris, France.
- Ksouri R., Megdiche W., Debez A., Falleh H., Grignon C., Abdelly C. (2007b). Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 244-249.
- Kumari C.S., Yasmin N., Hussain M.R., Babuselvam M. (2015). *In vitro* anti-inflammatory and anti-artheritic property of *Rhizopora mucronata* leaves. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 6: 482-485.
- Laguerre M., Lecomte J., Villeneuve P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46: 244-282.
- Lebreton P., Bouchez M.-P. (1967). Recherches chimiotaxinomiques sur les plantes vasculaires—V.: Distribution des composés polyphénoliques chez les pariétales. *Phytochemistry*, 6: 1601-1608.
- Lemogoum D., Van Bortel L., Van de Borne P. (2008). Aspects vasculaires de la drépanocytose. *Sang Thrombose Vaisseaux*, 20: 191-196.
- Masengo A.C., Ngbolua K.N., Gbolo B.Z., Inkoto L.C., Baholy R., Iteku 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 A.C., Lengbiye M.E., Inkoto L.C., Gbolo Z.B., Tshilanda D.D., Tshibangu D.S.T., Robijaona R.B., Ilumbe B.G., Ngbolua K.N., Mpiana P.T., Mudogo V. (2021b). Literature Review on the Phytochemistry and Pharmacological, Nutritional and Cosmetic Properties of *Lippia multiflora* and New Research Perspectives. *South Asian Research Journal of Natural Products*, 4: 35-38.
- Masengo C.A., Bongo G.N., Robijaona B., Ilumbe G.B., Ngbolua K.N., Mpiana P.T. (2021c). Etude ethnobotanique quantitative et valeur socio-culturelle de *Lippia multiflora* Moldenke (Verbenaceae), à Kinshasa, République Démocratique du Congo. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires* 9: 93-101.
- Masengo C.A., Ngbolua K.N., Ipepe D., Mbembo B.M., Djolu R. D., Inkoto C.L., Tshilanda D.D., Tshibangu D.S.T., Ilumbe G. B., Mpiana P.T. (2022). Enquête socio-économique et activité antifalcémiant de thé de Gambie (*Lippia multiflora* Moldenke, Verbenaceae) à l'Ouest de la République Démocratique du Congo. *Revue Congolaise des Sciences & Technologies*, 01: 24-34.
- Masengo A.C., Ngbolua K.N., Kwevi M.N., Kilembe T.J., She-tonde M.O., Kabena N.O., Tshilanda D.D., Tshibangu D.S.T., Ilumbe B.G., Mpiana P.T. (2023). Quantitative Determination of Oxalic and Phytic Acids of *Lippia Multiflora* Moldenke (Verbenaceae) Leaves and In Silico Study of Their Interaction with Haemoglobin S and 2,3-DPG-Mutase. *Sumerian Journal of Biotechnology*, 6: 1-10.
- Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T.C. (2000a). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52: 673-751.

- Mole S., Waterman P.G. (1987). A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies. *Oecologia*, 72: 137-147.
- Mpiana P.T., Mudogo V., Tshibangu D.S.T., Kitwa E.K., Kanganila A.B., Lumbu J.B.S., Ngbolua K.N., Atibu E.K., Kakule M.K. (2008). Antisickling activity of anthocyanins from *Bombax pentadrum*, *Ficus capensis* and *Ziziphus mucronata*: Photodegradation effect. *Journal of ethnopharmacology*, 120: 413-418.
- Mpiana P.T., Ngbolua K.N.N., Bokota M.T., Kasonga T.K., Atibu E.K., Tshibangu D.S., Mudogo V. (2010). *In vitro* effects of anthocyanin extracts from *Justicia secunda* Vahl on the solubility of haemoglobin S and membrane stability of sickle erythrocytes. *Blood transfusion*, 8: 248.
- Mpiana P. T., Tshibangu D.S.T., Shetonde O.M., Ngbolua K.N. (2007). *In vitro* antidrepanocytary activity (anti-sickle cell anemia) of some congolese plants. *Phytomedicine*, 14: 192-195.
- Mpiana P.T., Ngbolua K.N., Tshibangu D.S.T. (2016). Les aliments et la drépanocytose: Une mini-revue. *Comptes Rendus Chimie*, 19: 884-889.
- Nader E. (2019). Modulateurs de la rhéologie érythrocytaire et de l'éryptose dans la drépanocytose: pierre angulaire entre microparticules érythrocytaires et dysfonction vasculaire? *Santé*. Université de Lyon. Français.
- 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., Rafatro H., Rakotoarimanana H., Mudogo V., Mpiana P.T., Tshibangu D.S.T., 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., Lengbiye M.E., Mbembo M.B., Bongo N.G., Mutwale K.P., Ngombe K.N., Messi M., Ming M.J., Pegyemb E.D., Mpiana P.T. (2019). Selenium Content, Anthelmintic, Antioxidant and Antibacterial Activities of *Artocarpus heterophyllus* Lam. From Ubangi Ecoregion in Democratic Republic of the Congo. *American Journal of Biomedical Science & Research*, 6(2).
- Ngbolua K.N. (2020). Quantitative ethnobotany: Methodological approach for the evaluation and valorization of endogenous knowledge in tropical regions. Sciancia Scripts Publisher: Mauritius.
- 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. (2021a). 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).
- Ngbolua K.N., Molongo M.M., Libwa M.T.B., Amogu J.J.D., Kutshi N.N., Masengo C.A. (2021b). Enquête ethnobotanique sur les plantes sauvages alimentaires dans le Territoire de Mobayi-Mbongo (Nord-Ubangi) en République Démocratique du Congo. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 9: 261-267.
- Ngbolua K.N., Djolu R., Masengo C., Iteku J., Mpiana P., Mudogo J.C. (2023). Valeurs ethno-médicale et socio-économique de *Irvingia tenuinucleata* à Gbado-Lite, République démocratique du Congo. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 11: 40-48.
- Nijveldt R.J., Van Nood E.L.S., Van Hoorn D.E., Boelens P.G., Van Norren K., Van Leeuwen P. A. (2001). Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American journal of clinical nutrition*, 74: 418-425.
- Pascual M.E., Slowing K., Carretero E., Sánchez Mata D., Villar A. (2001). *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 76: 201-214.
- Prajitha V., Thoppil J.E. (2017). Cytotoxic and apoptotic activities of extract of *Amaranthus spinosus* L. in *Allium cepa* and human erythrocytes. *Cytototechnology*, 69:123-133.
- Price M.L., Van Scoyoc S., Butler G.L. (1978). A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.*, 26: 1214-1218.
- Sangare A., Monnet D., Diallo I., Yapo A.E. (1991). Intérêt clinique du dosage de la protéine c-réactive, de l' α -1-glycoprotéine acide et de la transferrine au cours de la drépanocytose homozygote. *Médecine d'Afrique Noire*, 38: 415-419.
- Tshibangu D.S.T., Ngbolua K.N., Lengbiye E.M., Tshilanda D.D., Mvingu B.M., Iteku B.J., Mbala B.M., Mudogo V., Mpiana P.T. (2016). Chemical composition and bioactivity of *Canarium schweinfurthii* stem bark extracts from DR Congo against Sickle cell disease and associated bacteria. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5:181-187.
- 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., Inkoto C.L., Mpongu K., Mata S., Mutwale P. K., Tshibangu D. S.-T., Bongo G.N., Ngbolua K.N., Mpiana P. T. (2019). Microscopic studies, phytochemical and biological screenings of *Ocimum canum*. *International Journal of Pharmacy and Chemistry*, 5: 61-67.
- Tshilanda D.D., Mutwale Kapepula P., Onyamboko D.V., Frederick M., Ngbolua K.N., 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.
- WHO (2023). Couverture sanitaire universelle. [https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/universal-health-coverage-\(uhc\)](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/universal-health-coverage-(uhc)).
- Yousfi H., Tahri E.H., Amrani E., Caid S.H. (2007). Étude de l'effet antioxydant des anthocyanes de l'olive, du raisin rouge, du chou rouge et de la fraise. *Biochimie, Substances naturelles et Environnement. Congrès international de Biochimie*. Agadir, 09-12 mai 2006, 452-455.