



Utilisation des feuilles de *Ficus sycomorus* L. (Moraceae) dans la prévention de l'hypercoagulation chez les drépanocytaires: identification de composés phénoliques potentiellement anticoagulant et antiagrégant plaquettaire

Alphonsine RAMDE-TIENDREBEOGO^{1,4*}, Moumouni KOALA¹,
Geoffroy OUEDRAOGO¹, Noufou OUEDRAOGO^{1,4}, Félix B. KINI¹, Pierre CHALARD³
et Innocent Pierre GUISSOU²

¹ Département de Médecine et Pharmacopée Traditionnelles-Pharmacie/Institut de Recherche en Sciences de la Santé (MEPHATRA-PH/IRSS), Centre National de la Recherche Scientifique et Technologique, 03 BP 7192 Ouagadougou 03, Burkina Faso.

² Laboratoire de Développement de Médicaments /Unité de Formation et de Recherche en Sciences de la Santé (UFR/SDS), Université Ouaga I Pr Joseph Ki-ZERBO, 03 BP 7021 Ouagadougou 03, Burkina Faso.

³ Institut de Chimie de Clermont-Ferrand/Chimie Organique et Médicinale (ICCF-UMR 6296).

⁴ Unité Mixte Internationale -Environnement, Santé, Sociétés (UMI 3189, ESS) CNRS/UCAD/UGB/USTTB/CNRST.

*Auteur correspondant; E-mail: ramdalphonsine@gmail.com; Tel : (+226) 70104438

RESUME

Ficus sycomorus est utilisé en médecine traditionnelle au Burkina Faso dans le traitement de diverses pathologies dont la drépanocytose. Les objectifs de cette étude consistaient d'une part à tester *in vitro* les effets du décocté aqueux et du macéré hydroéthanolique des feuilles sur les temps de coagulation sanguine et de formation d'agrégat plaquettaire, et d'autre part à identifier par HPLC-MS les composés majoritaires. Les résultats ont montré la formation d'agrégat plaquettaire dans le plasma riche en plaquette au bout de 5,27 min en absence d'extrait de la plante et après l'addition d'acide arachidonique. La coagulation du sang des sujets drépanocytaires SS, SC ainsi que celui du sujet sain AA a été observée respectivement au bout de $6,37 \pm 1,6$ min ; $7,76 \pm 2$ min et $11,55 \pm 0,8$ min en absence d'extrait de la plante. Cependant, en présence des extraits à différentes concentrations (10 ; 20 et 50 mg/mL), aucune formation d'agrégat plaquettaire, ni de coagulation n'a été observée. Les données spectrales ont permis d'identifier 07 composés phénoliques et leurs isomères de formules brutes $C_{21}H_{20}O_{11}$, $C_{21}H_{20}O_{12}$, $C_{21}H_{17}O_{13}$, $C_{16}H_{18}O_9$ et $C_{18}H_{31}NO_3$ dans les feuilles de cette plante. La présence de ces composés phénoliques justifierait la capacité des extraits à ralentir une coagulation excessive.

© 2019 International Formulae Group. All rights reserved

Mots clés: Drépanocytose, plante médicinale, coagulation, flavonoïdes, acides phénoliques.

Use of leaves of *Ficus sycomorus* L. (Moraceae) in the prevention of hypercoagulation in sickle cell patients: identification of phenolic compounds potentially anticoagulant and antiplatelet aggregation

ABSTRACT

Ficus sycomorus is used in traditional medicine in Burkina Faso in the treatment of various diseases including sickle cell disease. The objectives of this study were on the one hand to test *in vitro* the effects of

aqueous decoction and hydroethanol macerate of the leaves on blood clotting and platelet aggregation times, and on the other hand to identify by HPLC-MS the majority compounds. The results showed platelet aggregation in platelet-rich plasma after 5.27 min in the absence of plant extract and after addition of arachidonic acid. Coagulation of blood of SS, SC, and healthy AA subjects was observed after 6.37 ± 1.6 min, 7.76 ± 2 min and 11.55 ± 0.8 min respectively in the absence of plant extracts. However, in the presence of extracts at different concentrations (10, 20 and 50 mg/mL), no formation of platelet aggregates or coagulation was observed. The spectral data identified 07 phenol compounds and their isomers of the formulas $C_{21}H_{20}O_{11}$, $C_{21}H_{20}O_{12}$, $C_{21}H_{17}O_{13}$, $C_{16}H_{18}O_9$ and $C_{18}H_{31}NO_3$ in the leaves of this plant. The presence of these phenolic compounds would justify the ability of extracts to slow down excessive coagulation.

© 2019 International Formulae Group. All rights reserved

Keywords: Sickle Cell Anemia, medicinal plants, coagulation, flavonoids, phenolic acids.

INTRODUCTION

La drépanocytose est une maladie héréditaire liée à une anomalie de l'hémoglobine. C'est la première maladie génétique au monde. Plus de 50 millions de personnes sont porteurs du gène de la drépanocytose au niveau mondial. Elle est surtout très répandue en Afrique Subsaharienne où le trait drépanocytaire se situe entre 10 et 40% dans certains pays. Plus de 400 000 enfants naissent de cette maladie chaque année d'ici 2050 (Piel et al., 2013). La majorité des enfants atteints de la forme la plus sévère (homozygote SS) meurent avant l'âge de 5 ans. Ceux qui survivent présentent une atteinte des organes cibles qui réduit leur durée de vie (OMS, 2012). La drépanocytose constitue donc par sa fréquence et sa gravité un problème majeur de santé publique. La physiopathologie complexe de la maladie est basée sur la polymérisation de l'hémoglobine anormale (HbS) qui provoque une falciformation et une rigidité des hématies. Les drépanocytes ainsi constitués s'accumulent dans les capillaires et les obstruent créant des occlusions microvasculaires (Rees et al., 2010). L'hyperagrégation érythrocytaire provoquée va donc augmenter la viscosité sanguine et favoriser une hypercoagulation avec pour conséquence une mauvaise circulation du sang, une mauvaise oxygénation des organes et donc des crises douloureuses (Giro et al., 2004). Ces excès de coagulation opposés à une diminution des protéines anticoagulantes naturelles chez les drépanocytaires ont pour conséquence des accidents vasculaires

cérébraux (AVC) fréquemment rencontrés chez ces derniers (Bernaudin et Verlhac, 2008).

La prise en charge et le traitement de la drépanocytose restent toujours problématiques car le peu de médicaments conventionnels disponibles sont onéreux au regard du pouvoir d'achat de la majorité de la population africaine. De plus, certains antiagrégants plaquettaires et anticoagulants engendrent des effets secondaires à long terme (troubles digestifs, réactions allergiques, destruction de plaquettes et de globules blancs). Ainsi, la recherche de nouvelles molécules naturelles bioactives à partir des plantes médicinales pour la prévention et le traitement de l'hypercoagulation dans la maladie drépanocytaire est indispensable.

Des travaux antérieurs ont révélé que l'espèce *Ficus sycomorus* utilisée dans diverses recettes en médecine traditionnelle africaine possède de nombreux effets pharmacologiques tels que les effets : antiplasmodial, antimicrobien, antifongique, antiviral, antioxydant, anesthésique, antidiabétique (Sanon et al., 2003; Maregesi et al., 2008; Adeshina et al., 2009; Bekheet et al., 2011; Njagi et al., 2012). Au Burkina Faso, *Ficus sycomorus* figure parmi les plantes utilisées par les tradipraticiens de santé pour le soulagement des crises de la drépanocytose. D'autres travaux ont montré que les extraits de l'écorce et des feuilles de cette plante ont des propriétés antifalcémiantes (Nongonierma et al., 2005; Ramdé-Tiendrébéogo et al., 2014).

Des investigations phytochimiques ont montré que les composés phénoliques sont les principaux constituants de *Ficus sycomorus* (Sandabe et al., 2006; Lamien-Meda et al., 2008; Abdel-Hameed, 2009; Ramdé-Tiendrébogo et al., 2012). Nongonierma et al. (2005) ont identifié à partir des écorces de tige de cette plante, l'acide 3-hydroxybenzoïque et l'acide 4-hydroxybenzoïque qui possèderaient des effets antifalcémians. Cependant, il existe très peu de données sur les structures chimiques des composés phénoliques présents dans les feuilles de *Ficus sycomorus*.

La présente étude a pour objectifs d'évaluer les effets anticoagulant et antiagrégant plaquettaire des extraits de feuilles de *Ficus sycomorus* et d'identifier par HPLC-MS les composés phénoliques potentiellement bioactifs.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

Les feuilles de *Ficus sycomorus* ont été récoltées au bord du barrage N°2 de Tanghin à Ouagadougou (Burkina Faso) en juillet 2009 (coordonnées GPS : 12°23'29.57"N, 01°31'46.72"W). Après identification par l'équipe de botanique de l'Université Ouaga I Pr Joseph Ki-ZERBO, un spécimen a été déposé dans l'herbier de l'Unité de Formation et de Recherche en Sciences de la Vie et de la Terre (UFR/SVT) sous le code 01/2009. Le matériel végétal a été bien lavé et séché dans une salle aérée, à l'abri de la lumière pendant deux semaines, puis finement broyé par un broyeur mécanique.

Matériel biologique

Il était constitué par du sang veineux de patients drépanocytaires volontaires (ou avec assentiment pour les mineurs) suivis par un médecin à la « Clinique *Les Tisserins* » de Ouagadougou, Burkina Faso. Les patients étaient des homozygotes SS (âge compris entre 32 mois et 16 ans) et double hétérozygote SC (âge compris entre 8 ans et 26 ans). Du sang de volontaires sains, homozygotes AA a servi de référence. Les protocoles de l'étude ont été approuvés par le

Comité d'Ethique Institutionnel pour la Recherche en sciences de la Santé (CEIRES) de l'IRSS.

Réactifs chimiques

Les médicaments et les produits chimiques utilisés dans cette étude étaient constitués de : Citrate Phosphate Dextrose Adénine USP (Poly Medicure, Faridabad, India), Acide chlorhydrique (Sigma-Aldrich, Germany), Ethanol analytique (Prolabo, France), Méthanol technique (SdS, France), Acide arachidonique 5 mg/mL (Bio/Data, Horsham, PA), Acétylsalicylate de DL-Lysine (Aspégic 500 mg, Sanofi Aventis, France), Amberlite XAD-7 (Alfa Aesar, Allemagne).

Préparation des extraits

Le décocté aqueux des feuilles (DAF) de *Ficus sycomorus* a été préparé en introduisant 25 g de poudre des feuilles dans un ballon de 500 mL contenant 250 mL d'eau distillée. Le mélange a ensuite été porté à ébullition pendant 30 min à reflux. Après refroidissement, l'extrait a été filtré et centrifugé à 2000 rpm pendant 10 min. Le filtrat obtenu a été congelé puis lyophilisé à partir d'un lyophilisateur (Telstar cryodos 50). Une poudre hygroscopique et poreuse a été obtenue, et conservée dans un flacon hermétique afin d'éviter qu'elle ne prenne l'humidité. Le macéré hydroéthanolique des feuilles (MHF) a été réalisé en ajoutant 250 mL d'éthanol 95% à 50 g de drogue végétale. Le mélange est laissé à macération pendant 24 h à la température ambiante. Après filtration, la solution obtenue a été concentrée presque à sec à l'évaporateur rotatif (RE 111) puis congelée et lyophilisée. La poudre obtenue a été conservée dans les mêmes conditions que précédemment.

Préparation de l'extrait riche en composés phénoliques

Cent (100) grammes de feuilles pulvérisées de la plante ont été extraits par macération à basse température (4 °C) pendant 24 heures avec du méthanol.

L'extraction a été répétée 2 fois avec le marc obtenu après chaque filtration. Au total 1 litre de solvant a été utilisé. Les (03) filtrats ont été rassemblés puis concentrés presque à sec (100 mL) à l'évaporateur rotatif à une température inférieure à 40 °C pour donner un extrait brut. Cet extrait a été enrichi en composés phénoliques en utilisant une colonne à Amberlite XAD-7. Après fixation, la colonne de XAD-7 a été lavée avec de l'eau acidulée (0,5% de HCl) pour débarrasser les composés phénoliques des sucres libres et des composés non aromatiques. Les composés phénoliques absorbés ont été élués par du méthanol acidifié (0,5% de HCl). L'extrait méthanolique riche en composés phénoliques a été ensuite concentré à sec à 40 °C avec un évaporateur rotatif.

Test d'inhibition de la coagulation sanguine *in vitro*

L'effet des extraits a été testé sur du sang total selon la méthode précédemment décrite par Lee et White (1913) utilisée par Kale et al. (2008) avec de légères modifications. Deux (02) tubes en verre préalablement rincés au liquide physiologique puis séchés et étiquetés 1 et 2 ont été apprêtés. Dans le tube 2 ont été mis 2 mL de l'extrait à tester. Puis, à l'aide d'une seringue en plastique, 5 mL du sang veineux ont été prélevés chez un donneur et le chronomètre a été déclenché dès que le sang a pénétré dans la seringue. Il a été réparti en volume égal, soit 2 mL dans chaque tube. Les tubes ont été bouchés avec du coton cardé et immédiatement mis au bain-marie (type Fisher Scientific, Polytex 20) à 37 °C sans agitation. Après 3 minutes, les tubes ont été retirés du bain-marie, inclinés à un angle de 45° afin de constater la présence ou l'absence d'une coagulation. En absence de coagulat, le tube est remis dans le bain-marie et examiné toutes les 30 secondes jusqu'à coagulation complète (absence d'écoulement lorsque l'on retourne le tube). Dès que le sang du premier tube est coagulé, le deuxième tube est examiné et le temps de coagulation est noté.

Les extraits (DAF et MHF) ont été testés à des concentrations différentes de 10 mg/mL, 20 mg/mL et 50 mg/mL.

Test d'inhibition de l'agrégation plaquettaire (test qualitatif)

Il a été réalisé suivant la méthode décrite dans le bulletin technique n° 106270 Rev. A de ©Bio/Data Corporation (1981-2007).

Prélèvement du sang

Tous les patients sélectionnés pour ce test ont observé un jeûne d'au moins huit heures avant le prélèvement et n'ont pas pris d'aspirine comme médicament ou ingéré de composés qui en contiennent, ou tout autre produit pouvant modifier la fonction plaquettaire au moins 15 jours avant le test. 5 mL de sang ont été prélevés par ponction veineuse chez un donneur. L'heure du prélèvement a été notée. L'aiguille a été retirée de la seringue et le sang a été transvasé immédiatement et doucement dans un tube EDTA (Ethyl Diamine Tri Acétate) de 10 mL contenant 0,5 mL de la solution anticoagulante (Citrates Phosphate Dextrose Adenine Solution USP). Le tube a été bouché et retourné doucement 3 à 4 fois pour mélanger le contenu.

Obtention d'un plasma riche en plaquettes

Un plasma riche en plaquettes (PRP) a été préparé en centrifugeant le sang ci-dessus anticoagulé à 1500 rpm pendant 5 minutes à température ambiante (28 °C). (On vérifie qu'il n'y a pas de globules rouges dans la couche de plasma, dans le cas contraire, l'échantillon est centrifugé à nouveau à 1500 rpm pendant 5 minutes supplémentaires). Au moyen d'une pipette, la couche de plaquettes a été retirée avec soin et transférée dans un tube sec étiqueté PRP.

Test *in vitro*

0,45 mL de ce PRP a été prélevé chaque fois et introduit dans 5 autres tubes secs (étiquetés de 1 à 5). Les tubes ont été incubés à 37 °C pendant 3 minutes en agitant. Dans les tubes 2 et 3 ont été ajoutés 50 µL du DAF et du MHF respectivement. 50 µL de la

substance de référence l'Aspégic, préparé à 5 mg/mL a été ajouté dans le tube 4. Le test a été réalisé en ajoutant 50 µL d'acide arachidonique (5 mg/mL) directement dans les 4 premiers tubes tests (sans laisser le réactif couler le long de la paroi de la cuvette). Le cinquième tube contenant uniquement le PRP a servi de témoin négatif. Les tubes sont laissés au repos pour permettre la formation des agrégats. L'agrégation des plaquettes (s'il y en a) est observée à l'œil nu par comparaison des autres tubes au tube 1 (témoin positif) dans lequel le plasma riche en plaquettes devient plus limpide à la suite du regroupement des plaquettes. Le temps nécessaire à la formation des agrégats plaquettaires a été noté en utilisant un chronomètre. Les extraits ont été testés à 3 concentrations différentes : 10 mg/mL ; 20 mg/mL et 50 mg/mL.

Coloration et observation des frottis au microscope

Des frottis ont été réalisés sur des lames à partir du contenu de chaque tube. Après coloration au May-Grünwald Giemsa (MGG) selon la méthode décrite par Piaton et al. (2015), les lames ont été séchées à l'air puis observées au microscope (type Primo Vert 415510-1101-000) sous huile d'immersion (X100). Des images ont été prises à partir de l'appareil photo incorporé au microscope (type AxioCam ERc 5s).

Identification des composés par HPLC -MS

L'analyse HPLC a été réalisée sur Agilent 1200 série (Agilent Technologies, USA) équipé d'un détecteur à barrette d'iodes (DAD, Diode Array Detector). La spectrométrie de masse a été réalisée en utilisant un système ESI-Q-TOF-MS (Agilent 6540 Corp., USA) en mode négatif et positif. Les différents composés ont été repérés et identifiés grâce à leur temps de rétention avec une détection par absorption dans l'UV-vis. Les données enregistrées ont été analysées à l'aide du logiciel MssLynx 4.1 (de Rijke et al., 2006; Wang et al., 2016).

Analyses statistiques

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne \pm SEM (n=3). Les données ont été analysées en utilisant l'analyse de variance à un facteur (One Way ANOVA) suivi du post-test de Bonferroni pour les comparaisons multiples (Graph Pad Prism version 5.0 for Windows, Graph Pad Software, San Diego California USA). Les différences sont considérées comme statistiquement significatives pour une valeur de « p inférieure à 0,05 ».

RESULTATS

Effet anticoagulant des extraits

Les résultats du test anticoagulant ont été présentés dans le Tableau 1. En absence d'extrait, le temps moyen de coagulation du sang des patients drépanocytaires SS était égal à $6,37 \pm 1,6$ min tandis que celui des patients SC était de $7,76 \pm 2$ min. Les sujets sains ont montré un temps de coagulation supérieur aux deux cas précédents, avec une moyenne de $11,55 \pm 0,8$ min. Ces résultats montrent que le sang d'un sujet drépanocytaire SS ou SC se coagule plus promptement que celui d'un sujet sain AA. Cependant, en présence des extraits de la plante DAF et MHF à des concentrations différentes (10 ; 20 et 50 mg/mL), aucune coagulation n'a été observée dans le tube test (étiqueté 2) au moment où le coagulat était observé dans le tube témoin (étiqueté 1).

Effet antiagrégant plaquettaire des extraits

Les résultats du test antiagrégant plaquettaire ont été présentés dans le Tableau 2 et dans la Figure 1. Le Plasma Riche en Plaquette (PRP) a présenté un aspect limpide et la formation d'un amas témoignant du regroupement des plaquettes a été observée au bout de 5,27 min après addition de l'Acide Arachidonique (AA). La Figure 1b montre la présence de l'agrégat plaquettaire comparativement au frottis réalisé sur le PRP sans Acide Arachidonique (Figure 1a). En présence des extraits (DAF et MHF) à des concentrations différentes, aucune agrégation n'a été observée dans le tube test au moment

où l'agrégat était noté dans le tube témoin positif. La Figure 1c présente l'aspect des plaquettes en présence du DAF 50 mg/mL. L'effet des extraits était comparable à celui de la substance de référence l'Aspégic 5 mg/mL (Figure 1d).

Identification des composés phénoliques

Les données spectrales de l'extrait des feuilles de *Ficus sycomorus* riche en composés phénoliques ont été présentées dans le Tableau 3. Le spectre HPLC a montré sept

(07) pics majoritaires repérés selon leur temps de rétention. L'analyse des spectres MS a montré la présence de deux types d'ions quasi-moléculaires en mode positif : les ions $[M+H]^+$ formés par capture d'un proton et les ions adduits $[M+Na]^+$ ou $[M+K]^+$ permettant d'attribuer la masse molaire du composé. Les spectres ont aussi montré la présence des adduits chlorure ou formiate en mode négatif sur certaines molécules.

Tableau 1 : Temps moyen de coagulation (min) du sang *in vitro* en absence et en présence des extraits.

| Donneurs | Absence d'extrait | DAF (mg/mL) | | | MHF (mg/mL) | | |
|----------|---------------------|-------------|----|----|-------------|----|----|
| | | 10 | 20 | 50 | 10 | 20 | 50 |
| SS | 6,37 ^{a,b} | - | - | - | - | - | - |
| SC | 7,76 ^b | - | - | - | - | - | - |
| AA | 11,55 | nd | | | | | |

Les valeurs ont été exprimées en moyenne ± écart-type moyen (n = 3) ; a, p<0,05 contre SC ; b, p<0,05 contre AA ; DAF : Décocté Aqueux des Feuilles ; MHF : Macéré Hydroéthanolique des Feuilles ; - : absence de coagulation ; nd : non déterminé (sujet sain).

Tableau 2 : Effet des extraits sur la formation des agrégats plaquettaires *in vitro*.

| Extraits | Concentration (mg/mL) | t (min) | Aspect du plasma | | |
|------------|-----------------------|---------|------------------|---------|---------|
| | | | Trouble | Limpide | Agrégat |
| PRP+AA | 0 | 5,27 | | + | + |
| | 10 | - | + | | - |
| | 20 | - | + | | - |
| PRP+AA+DAF | 50 | - | + | | - |
| | 10 | - | + | | - |
| | 20 | - | + | | - |
| PRP+AA+MHF | 50 | - | + | | - |
| | 5 | - | + | | - |

PRP: Plasma Riche en Plaquettes; AA: Acide Arachidonique ; t : temps de formation de l'agrégat plaquettaire ; DAF : Décocté Aqueux des Feuilles ; MHF : Macéré Hydroéthanolique des Feuilles ; + : positif ; - : négatif.

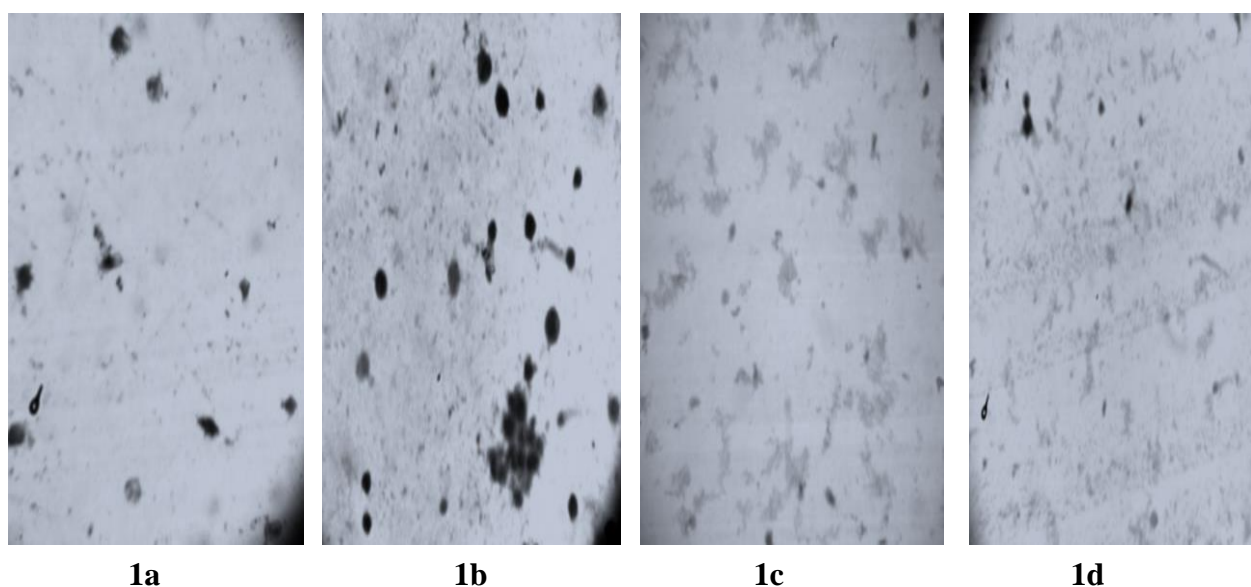


Figure 1: Aspect des plaquettes sanguines après coloration au MGG. **1a** : PRP sans Acide Arachidonique (AA), absence d'agrégat ; **1b** : PRP + AA, formation d'un agrégat plaquettaire ; **1c** : PRP + DAF (50 mg/mL) + AA, absence d'agrégat ; **1d** : PRP + Aspégic (5 mg/mL) + AA, absence d'agrégat.

Tableau 3: Données spectrales et formules chimiques brutes des composés phénoliques identifiés dans les feuilles de *Ficus sycomorus*.

| N° d'ordre | RT (min) | m/z | Formules chimiques déterminées | adduits | m/z Mesuré | m/z Calculé | Erreur (ppm) |
|------------|----------|-----------|---|----------------------|------------|-------------|--------------|
| 1 | 0,53 | 448,10055 | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ | M+Na ⁺ | 471,1044 | 471,1055 | 3,01 |
| | | | | M+K ⁺ | 487,0782 | 487,0794 | 3,15 |
| | | | | M; formiate | 493,1143 | 493,1144 | 0,26 |
| | | | | M+Cl ⁻ | 483,0854 | 483,0857 | 0,79 |
| 2 | 2, 11 | 354,09508 | C ₁₆ H ₁₈ O ₉ | M+Na ⁺ | 377,0829 | 377,0843 | 3,71 |
| | | | | M+Cl ⁻ | 389,0652 | 389,0645 | 1,80 |
| 3 | 2,30 | 354,09508 | C ₁₆ H ₁₈ O ₉ | Dimère | 707,1828 | Nd | nd |
| 4 | 3,04 | 464,09548 | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂ | M+Na ⁺ | 487,0832 | 487,0847 | nd |
| 5 | 3,11 | 478,07474 | C ₂₁ H ₁₇ O ₁₃ | - | - | - | - |
| 6 | 5, 38 | 309,23039 | C ₁₈ H ₃₁ NO ₃ | M; formiate | 354,2286 | 354,2286 | 0 |
| | | | | M+Cl ⁻ | 344,1995 | 344,1998 | 0,87 |
| | | | | M+K ⁺ | 348,1925 | 348,1935 | 2,87 |
| | | | | M+Na ⁺ | 332,2185 | 332,2196 | 3,31 |
| | | | | M; formiate | 354,2287 | 354,2286 | 0,28 |
| 7 | 5, 48 | 309,23039 | C ₁₈ H ₃₁ NO ₃ | M+Cl ⁻ | 344,1998 | 344,1998 | 0 |
| | | | | M+Na ⁺ | 332,2182 | 332,2196 | 4,21 |
| | | | | M+K ⁺ | 348,1923 | 348,1935 | 3,44 |
| | | | | M+H-H ₂ O | 292,226 | 292,2271 | 3,76 |

RT : Temps de Rétention ; nd: non déterminé.

DISCUSSION

Dans la maladie drépanocytaire, les globules rouges SS denses falciformés provoquent une coagulopathie avec activation plaquettaire, génération de thrombine, formation de fibrine et diminution des protéines inhibitrices (PC, PS) de la coagulation (Noubouossie et al., 2016). Le drépanocytaire est dans un état d'hypercoagulabilité biologique contrairement à un sujet sain vivant dans le même milieu que lui (Chinawa et al., 2013).

Les résultats ont montré qu'en absence d'extrait, l'addition d'acide arachidonique dans le plasma riche en plaquette a provoqué la formation d'un agrégat plaquettaire au bout de 5,27 min. Cependant, en présence des extraits DAF et MHF, à des concentrations différentes (10 ; 20 et 50 mg/mL), aucune formation d'agrégat plaquettaire n'a été observée dans le tube test au moment où l'agrégat était formé dans le tube témoin. La présence des extraits de plante DAF et MHF a inhibé l'agrégation *in vitro* des plaquettes. Aussi, les temps moyens de coagulation des patients drépanocytaires SS et SC qui étaient de $6,37 \pm 1,6$ min et $7,76 \pm 2$ min respectivement témoignent d'une coagulation rapide anormale du sang de ces malades comparativement au temps moyen de coagulation des sujets sains AA qui était de $11,55 \pm 0,8$ min. En présence des extraits DAF et MHF de *Ficus sycomorus* testés à des concentrations différentes (10 ; 20 et 50 mg/mL), aucune coagulation n'a été observée dans le tube test au moment où le coagulat était formé dans le tube témoin. L'agrégation des plaquettes étant la première étape de la coagulation sanguine (Chinawa et al., 2013), les résultats obtenus montrent que les extraits DAF et MHF par leur capacité d'inhibition des plaquettes à constituer cette première étape, affecteraient les voies de la cascade de la coagulation. Les extraits auraient donc une propriété ralentissante de la coagulation excessive. En effet, des études précédentes ont montré que les propriétés antidrépanocytaires de certaines plantes

seraient dues à la présence de composés phénoliques dans les extraits (Mpiana et al., 2012; Kambale et al., 2013). Les données spectrales (HPLC-MS) ont permis d'identifier 07 composés phénoliques dans les feuilles de *Ficus sycomorus* qui seraient responsables des activités biologiques observées.

Le kaempferol-3-O-glucoside identifié dans l'espèce *Angelica shikokiana* (Apiaceae) et reconnu pour ses effets antiagrégant plaquettaire et anticoagulant (Mira et al., 2017) a la même masse m/z égale à 448, 10055 et la même formule brute $C_{21}H_{20}O_{11}$ que le composé 1 qui a élué à 0,53 min dans notre étude.

La Quercetine-3-O- β -d-glucoside (ou Isoquercetine) reconnu pour ses propriétés antithrombotique et anticoagulante (Choi et al., 2016) a la même masse m/z égale à 464,09548 et la même formule chimique brute $C_{21}H_{20}O_{12}$ que le composé 4 dont le temps de rétention était de 3,04 min.

La Quercetine glucuronide isolée de l'espèce *Angelica shikokiana* (Mira et al., 2017) a la même masse m/z égale à 478, 07474 et la même formule chimique $C_{21}H_{17}O_{13}$ que le composé 5 qui a élué à 3, 11 min dans notre étude. Les composés 1 ; 4 et 5 agiraient comme la plupart de ces flavonols identifiés, par une inhibition de la formation de thromboxane A2, un fort inducteur de l'agrégation plaquettaire (Arslan et al., 2011).

L'acide 3,5-di-O-Caffeoylquinique isolé dans l'espèce *Centella asiatica* (Apiaceae) par Satake et al. (2007) et possédant des propriétés antiagrégante plaquettaire et anticoagulante, a la même masse m/z égale à 354, 09508 et la même formule chimique brute $C_{16}H_{18}O_9$ que les composés 2 et 3. Ces derniers qui ont élué à 2,11 min et 2,30 min seraient des isomères. Les composés 2 et 3 agiraient donc comme la plupart des acides phénoliques à propriété anticoagulante par une inhibition de la thrombine empêchant ainsi la transformation du fibrinogène en fibrine (Bijak et al., 2011; Wolberg, 2012).

Le 1-(3,4,5-Trimethoxyphenyl) nonan-2-amine isolé dans le genre *Preussia* (Gonzalez-Menendez et al., 2017) a la même masse m/z égale à 309, 23039 et la même formule chimique $C_{18}H_{31}NO_3$ que les composés 6 et 7 qui ont élué à 5,38 et 5,48 min. La présence d'un atome d'azote dans leur formule chimique indique que ces isomères seraient probablement des protéines. Ces composés 6 et 7 agiraient comme les protéines naturelles anticoagulantes par un ralentissement de la production de thrombine (Gandrille, 2012).

Conclusion

La présente étude avait pour objectifs d'évaluer les effets des extraits de feuilles de *Ficus sycomorus* sur les temps de coagulation sanguine et de formation d'agrégat plaquettaire, et aussi d'identifier par HPLC-MS les composés phénoliques majoritaires.

Les résultats obtenus ont montré que les extraits du décocté aqueux et du macéré hydroéthanolique des feuilles de cette plante ont une activité antiagrégante plaquettaire et une capacité à ralentir la coagulation sanguine *in vitro*. L'étude a aussi permis d'identifier les formules chimiques brutes de sept (07) composés phénoliques potentiellement responsables de ces activités biologiques.

Des études approfondies devraient permettre de déterminer les structures complètes et les noms exacts de ces composés phénoliques. Ce qui permettra de proposer la formulation galénique d'un phytomédicament dans la prise en charge de la drépanocytose et de ses composantes.

CONFLITS D'INTERETS

Les auteurs déclarent qu'il n'y a aucun conflit d'intérêt pour cet article.

CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

Moumouni KOALA a participé à la préparation des différents extraits et à l'interprétation des spectres HPLC-MS. Geoffroy G. OUEDRAOGO a contribué à la

réalisation des tests anticoagulant et antiagrégant plaquettaire. Noufou OUEDRAOGO a participé à l'interprétation des résultats des tests biologiques. Félix B. KINI a contribué à l'analyse des spectres. Pierre CHALARD a supervisé les travaux de l'analyse HPLC-MS. Innocent Pierre GUISSOU a dirigé cette étude.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Professeur Pierre CHALARD de l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF/France) pour avoir encadré les travaux d'analyse HPLC-MS dans son département.

REFERENCES

- Abdel-Hameed E-S. 2009. Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chemistry*, **114**(4): 1271-1277. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.005>
- Adeshina G, Okeke C, Onwuegbuchulam N, Ehinmidu J. 2009. Preliminary studies on antimicrobial activities of ethanolic extracts of *Ficus sycomorus* Linn. and *Ficus platyphylla* Del.(Moraceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, **3**(5). DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v3i5.51080>
- Arslan R, Bor Z, Bektas N, Meriçli AH, Ozturk Y. 2011. Antithrombotic effects of ethanol extract of *Crataegus orientalis* in the carrageenan-induced mice tail thrombosis model. *Thrombosis Research*, **127**(3): 210-213. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2010.11.028>
- Bekheet S H, Abdel-Motaal FF, Mahalel UA. 2011. Antifungal effects of *Ficus sycomorus* and *Pergularia tomentosa* aqueous extracts on some organs in *Bufo regularis* treated with *Aspergillus niger*. *Tissue Cell*, **43**(6): 398-404. DOI:

- <https://doi.org/10.1016/j.tice.2011.09.002>.
- Bernaudin F, Verlhac S. 2008. Accidents vasculaires cérébraux des drépanocytaires: apport du Doppler transcrânien et de l'imagerie en résonance magnétique. *Hématologie*, **14**(1), 25-35. DOI: <https://www.jle.com/10.1684/hma.2008.0209>
- Bijak M, Bobrowski M, Borowiecka M, Podśędek A, Golański J, Nowak P. 2011. Anticoagulant effect of polyphenols-rich extracts from black chokeberry and grape seeds. *Fitoterapia*, **82**(6): 811-817. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.04.017>
- Bio/Data Acide arachidonique. Bulletin Technique, Vol. 106270. (1981-2007) DOI:<http://www.biodatacorp.com/platelet-aggregation/aggregation-reagents/routine-general-agonists/arachidonic-acid.html> consulté le 11/07/2013.
- Chinawa J, Emodi I, Ikefuna A, Ocheni S. 2013. Coagulation profile of children with sickle cell anemia in steady state and crisis attending the university of Nigeria teaching hospital, Ituku-Ozalla, Enugu. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, **16**(2): 159-163. DOI: <http://dx.doi.org/10.4103/1119-3077.110132>
- Choi JH, Kim KJ, Kim S. 2016. Comparative Effect of Quercetin and Quercetin-3-O- β -d-Glucoside on Fibrin Polymers, Blood Clots, and in Rodent Models. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, **30**(11): 548-558. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbt.21822>
- de Rijke E, Out P, Niessen WM, Ariese F, Gooijer C, Udo AT. 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, **1112**(1-2): 31-63. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.019>
- Gandrille S. 2012. Protéine C activée: de la relation structure/activité à la conception de molécules à propriétés thérapeutiques ciblées. *Hématologie*, **18**(2): 96-108. DOI: <https://www.jle.com/10.1684/hma.2012.0696>
- Giroit R, Bégué P, Binet JL, Vacheron A, Queneau P, Sraer JD. 2004. La drépanocytose chez l'enfant. *Bull Acad Nat de Méd.*, **188**(3): 491-506.
- Gonzalez-Menendez V, Martin J, Siles JA, Gonzalez-Tejero MR, Reyes F, Platas G, Tormo JR, Genilloud O. 2017. Biodiversity and chemotaxonomy of *Preussia* isolates from the Iberian Peninsula. *Mycological Progress*, **16**(7): 713-728. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11557-017-1305-1>
- Kale MA, Shahi SR, Somani VG, Shamkuwar PB, Dhake A. 2008. Hemostatic activity of the leaves of *Tridax procumbens* Linn. *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)*, **2**(1). DOI: <http://dx.doi.org/10.22377/ijgp.v2i1.398>
- Kambale J, Ngolua K, Mpiana P, Mudogo V, Tshibangu D, Wumba D, Mvumbi L, Kalala L, Mesia K, Ekutsu E. 2013. Evaluation in vitro de l'activité antifalcémiant et effet antioxydant des extraits d'*Uapaca heudelotii* Baill.(Euphorbiaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, **7**(2): 523-534. DOI : DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v7i2.9>
- Lamien-Meda A, Lamien C, Compaoré M, Meda R, Kiendrebeogo M, Zeba B, Millogo J, Nacoulma O. 2008. Polyphenol content and antioxidant activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso. *Molecules*, **13**(3): 581-594. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules13030581>

- Lee RI, White PD. 1913. A clinical study of the coagulation time of blood. *The American Journal of the Medical Sciences*, **145**(4): 495-503.
- Maregesi SM, Pieters L, Ngassapa OD, Apers S, Vingerhoets R, Cos P, Berghe DA, Vlietinck AJ. 2008. Screening of some Tanzanian medicinal plants from Bunda district for antibacterial, antifungal and antiviral activities. *Journal of Ethnopharmacology*, **119**(1): 58-66. DOI: 10.1016/j.jep.2008.05.033.
- Mira A, Alkhiary W, Shimizu K. 2017. Antiplatelet and anticoagulant activities of *Angelica shikokiana* extract and its isolated compounds. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, **23**(1): 91-99. DOI: <https://doi.org/10.1177%2F1076029615595879>
- Mpiana P, Dianzenza E, Ngbolua K, Tshibangu D, Mbala B, Mhigo S, Atibu E, Kakule M, Bokota M. 2012. Antisickling properties, thermal and photochemical degradations of anthocyanin extracts from *Annona senegalensis* (Annonaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, **6**(5): 2241-2251. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v6i5.30>
- Njagi J, Piero M, Ngeranwa J, Njagi E, Kibiti C, Njue W, Maina D, Gathumbi P. 2012. Assessment of Antidiabetic Potential of *Ficus Sycomorus* on Alloxan-induced Diabetic Mice. *International Journal of Diabetes Research*, **1**(4): 47-51. DOI: <http://hdl.handle.net/123456789/6792>
- Nongonierma RB, Sy GY, Ndiaye L, Thiam D, Samb I, Samb A. 2005. Activité antidrépanocytaire de la fraction F3 de l'extrait acétonique des écorces de tiges de *Ficus gnaphalocarpa*. *Le Pharmacien d'Afrique*, **187**: 3-6.
- Noubouossie D, Key NS, Ataga KI. 2016. Coagulation abnormalities of sickle cell disease: Relationship with clinical outcomes and the effect of disease modifying therapies. *Blood Reviews*, **30**(4): 245-256. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.blre.2015.12.003>
- OMS. 2012. Compendium des stratégies de santé publique, Vol. 1: (177-183), Brazzaville: Bureau Régionale de l'Afrique.
- Piaton E, Fabre M, Goubin-Versini I, Bretz-Grenier M-F, Courtade-Saïdi M, Vincent S, Belleannée G, Thivolet F, Boutonnat J, Debaque H. 2015. Recommandations techniques et règles de bonne pratique pour la coloration de May-Grünwald-Giemsa: revue de la littérature et apport de l'assurance qualité. In *Annales de Pathologie* (vol. 4). Elsevier; 294-305.
- Piel FB, Hay SI, Gupta S, Weatherall DJ, Williams TN 2013. Global burden of sickle cell anaemia in children under five, 2010–2050: modelling based on demographics, excess mortality, and interventions. *PLoS Medicine*, **10**(7): e1001484. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001484>
- Ramdé-Tiendrébéogo A, Tibiri A, Hilou A., Lompo M, Millogo-Kone H, Nacoulma O, Guissou I. 2012. Antioxidative and antibacterial activities of phenolic compounds from *Ficus sur Forssk.* and *Ficus sycomorus L.*(Moraceae): potential for sickle cell disease treatment in Burkina Faso. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, **6**(1): 328-336. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v6i1.29>
- Ramdé-Tiendrébéogo A, Tibiri A, Ouedraogo M, Ouédraogo S, Nacoulma OG, Guissou IP. 2014. Study of Antisickling and Vasorelaxant Activities and Acute Toxicity Assessment of Crude Extracts of Leaves of *Ficus sycomorus L.* (Moraceae). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **17**(6): 829. DOI: <http://dx.doi.org/10.3923/pjbs.2014.829.835>.

- Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. 2010. Sick cell disease. *Lancet*, **376**(9757): 2018-2031. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61029-X S0140-6736(10)61029-X [pii].
- Sandabe UK, Onyeyili PA, Chibuzo GA. 2006. Phytochemical screening and effect of aqueous extract of *Ficus sycamorus* L. (Moraceae) stem bark on muscular activity in laboratory animals. *J Ethnopharmacol*, **103**(3): 481-483. DOI:S0378-8741(05)00545-3 [pii]10.1016/j.jep.2005.08.025
- Sanon S, Ollivier E, Azas N, Mahiou V, Gasquet M, Ouattara CT, Nebie I, Traore AS, Esposito F, Balansard G, Timon-David P, Fumoux F. 2003. Ethnobotanical survey and in vitro antiplasmodial activity of plants used in traditional medicine in Burkina Faso. *J Ethnopharmacol*, **86**(2-3): 143-147. DOI: S0378874102003811 [pii]
- Satake T, Kamiya K, An Y, Oishi T, Yamamoto J. 2007. The anti-thrombotic active constituents from *Centella asiatica*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **30**(5): 935-940. DOI: <https://doi.org/10.1248/bpb.30.935>.
- Wang J, Cao X, Ferchaud V, Qi Y, Jiang H, Tang F, Yue Y, Chin KL. 2016. Variations in chemical fingerprints and major flavonoid contents from the leaves of thirty-one accessions of *Hibiscus sabdariffa* L. *Biomedical Chromatography*, **30**(6): 880-887. DOI: <https://doi.org/10.1002/bmc.3623>
- Wolberg AS. 2012. Determinants of fibrin formation, structure, and function. *Current Opinion in Hematology*, **19**(5): 349-356. DOI: 10.1097/MOH.0b013e32835673c2