

# Etude de l'effet d'un principe anti inflammatoire isolé des inflorescences mâles de *Borassus aethiopum* Mart sur la cinétique de la protéine C réactive (CRP)

Sakandé J.<sup>1</sup>, Nikiéma J. B.<sup>3</sup>, Lompo M.<sup>4</sup>, Nacoulma O. G.<sup>2</sup>, Bassené E.<sup>6</sup>, Guissou I. P.<sup>4</sup>

## Résumé

Des travaux antérieurs ont permis d'isoler une substance anti-inflammatoire I<sub>1</sub> à partir des inflorescences mâles de *Borassus aethiopum* Mart. (Arecaceae). Cette substance I<sub>1</sub> a entraîné une inhibition de 89 % de l'œdème induit par la carragénine selon la méthode de Winter. Le criblage phytochimique permet de suspecter les phytostérols et/ou triterpènes comme responsables de cette activité. L'objectif de cette étude est d'explorer l'effet de la substance I<sub>1</sub> sur la cinétique des marqueurs de l'inflammation comme la Protéine C Réactive (CRP). Ainsi à To, des souris mâles NMRI reparties en 4 lots de 25 animaux reçoivent en intraperitonéale les produits suivants :

Lot 1 blanc (eau distillée), lot 2 témoin de référence (bétamétasone à 2 mg/kg), lot 3 (fraction E2F2 à 100 mg/kg), lot 4 (substance I<sub>1</sub> à 100 mg/kg). Une heure après l'inflammation est provoquée chez la souris par injection dans l'aponévrose plantaire de 0,025 ml d'une solution de carragénine 1 %. Les prélèvements sanguins sont réalisés sur 5 souris de chaque lot à To, T3H, T9H, T24H, T48H après l'induction de l'œdème. Le dosage de la CRP par immunoturbidimétrie a conduit aux résultats suivants : lot 1 blanc la CRP est passée de 2,1 mg/L à 24,1 mg/L, lot 2 bétamétasone : 2,4 mg/L à To le maximum a été observé à T9H (8,4 mg/l) et à T48H le taux de CRP est tombé à 3,67 mg/L. Le lot traité par la substance I<sub>1</sub> a observé un maximum de 18,35 mg/L à T3H, ce taux est passé au seuil le plus bas (2,75 mg/L) après 24 h. Ces résultats permettent de confirmer l'activité anti-inflammatoire de la substance I<sub>1</sub>. Des travaux futurs sont nécessaires pour comprendre le mécanisme d'action de la substance I<sub>1</sub>.

**Mots clés :** CRP, anti-inflammatoire, *Borassus aethiopum* Mart.

## Abstract

*Borassus aethiopum* MART (Arecaceae) is tropical plant widely spread in Africa. This plant is used in Burkina Faso traditional medicine for the treatment of inflammatory diseases.

The anti-inflammatory activities of extracts E2F2 and I<sub>1</sub> from *Borassus aethiopum* male inflorescences were investigated in mice according to the Winter's method of carrageenan induced paw oedema in previous studies and exhibited :E2F2= 70 % and I<sub>1</sub> = 89 % inhibition of oedema. The present study was run in order to research antiinflammatory mechanism. After a carrageenan induced paw oedema in 4 groups of 25 mices, each group received (group 1: control receiving distilled water, group 2 = control receiving

<sup>1</sup> Laboratoire de biochimie, UFR Sciences de la santé, Université de Ouagadougou, 03 BP 7021. Burkina Faso. Email : jean\_sakande@univ-ouaga.bf.

<sup>2</sup> Laboratoire de biochimie, UFR Sciences et vie de la terre, 03 BP 7021 BF.

<sup>3</sup> Laboratoire de pharmacognosie, UFR Sciences de la santé, Université de Ouagadougou 03 BP 7021 BF.

<sup>4</sup> Institut de recherche en sciences de la santé, 03 BP 7192 Ouagadougou 03 Burkina Faso.

<sup>5</sup> Laboratoire de pharmacologie et toxicologie, UFR Sciences de la santé, Université de Ouagadougou, 03 BP 7021 Burkina Faso..

<sup>6</sup> Laboratoire de pharmacognosie, UCAD, Sénégal.

betamétazone 2 mg/kg, group 3 = test group receiving 100 mg/kg of E2F2, group 4 : test group receiving 100 mg/kg of I<sub>1</sub>). The blood was taken from 5 mice of each group at 0, 3, 9, 24, 48 hours in order to follow C Reactive Protein (CRP) kinetic. Results (CRP values mg/kg) group 1 : 2.1 to 24, group 2 : 2.4 to 3.67, group 3: 3.68 to 7.28 and group 4 : 3.50 to 1.83. Results confirm antiinflammatory effect of the extracts by inhiting CRP synthesis.

Keywords: CRP, antiinflammatory, *Borassus aethiopum* Mart.

## Introduction

*Borassus aethiopum*, encore appelé rônier, appartient à la famille des Palmae ou Arecaceae. Cette plante est bien connue en milieu traditionnel burkinabé comme ayant des propriétés anti-mycosiques et anti-inflammatoires. Ses inflorescences mâles sont pour cela utilisées pour le traitement des mycoses cutanées, des escarres, de la gale et bien d'autres affections (GNANOU, 2001). C'est ainsi que nous avons entrepris l'étude des propriétés pharmacologiques des extraits de *Borassus aethiopum*. Au cours d'une étude antérieure, un principe anti-inflammatoire (I<sub>1</sub>) isolé des inflorescences mâles, a entraîné une inhibition à hauteur de 89 % de l'œdème induit suivant la méthode de Winter (COLOT, 1972). Le criblage phytochimique a permis de classer le principe anti-inflammatoire I<sub>1</sub> dans le groupe des stérols et/ou triterpènes. Le but de la présente étude est d'évaluer l'effet de la substance I<sub>1</sub> sur la cinétique de la protéine C réactive (CRP), un marqueur précoce de l'inflammation.

## Matériel et méthodes

### Matériel végétal

Les inflorescences mâles de *Borassus aethiopum* ont été récoltées dans la ville de Ouagadougou et identifiées par le département de Médecine et Pharmacopée traditionnelle de l'Institut de Recherche en Science de la Santé (IRSS-Ouagadougou Burkina Faso). La drogue végétale a été séchée à l'air libre sous abris et pulvérisée.

### Obtention de la fraction anti-inflammatoire E2F2

Une prise d'essai de 750 g de poudre a été successivement extraite par 5 solvants de polarité croissante (dichlorométhane, mélange dichlorométhane-méthanol 1/1 V/V, éthanol, eau en macération et en décoction). Les extraits obtenus ont été évaporés sous pression réduite pour donner respectivement E1, E2, E3, E4 et E5. L'extrait E2 qui a montré l'activité anti-inflammatoire la plus marquée a été fractionné par chromatographie sur colonne de gel de silice pour donner la fraction anti-inflammatoire E2F2.

### Isolement de la Substance anti-inflammatoire I1

La fraction E2F2 a été purifiée par chromatographie sur couche mince préparative de gel de silice G6F254; ce qui a permis d'isoler 3 substances I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>, I<sub>3</sub>. Le criblage pharmacologique de l'activité suivant la méthode de Winter (COLOT, 1972 ) a permis de retenir I<sub>1</sub> comme étant la substance anti-inflammatoire la plus active.

## Animaux de laboratoire

Des souris mâles NMRI pesant entre 30 et 40 g ont été utilisées. Ces animaux recevant la nourriture et l'eau à volonté ont été stabilisés dans une atmosphère à 22 °C avec 70 % d'humidité. La photopériode était de 12h/24h.

## Induction de l'œdème

L'inflammation est produite chez la souris en injectant sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche 0,025 ml d'une solution de carragénine à 1 % dans NaCl à 0,9 %.

Une heure avant l'injection des pattes, les substances sont administrées en intrapéritonéale aux souris réparties en 4 lots de 25.

- Lot 1 blanc reçoit de l'eau distillée ;
- Lot 2 traité avec de la bétamétasone à 2 mg/kg ;
- Lot 3 traité avec l'extrait E2F2 à 100 mg/kg ;
- Lot 4 reçoit la substance I1 à 100 mg/kg.

A To, T3H, T9H, T24H et T48H après l'induction de l'œdème, 5 souris de chaque lot sont anesthésiés par le dichlorométhane et le sang est prélevé par ponction cardiaque dans des tubes secs. Le sérum est séparé par centrifugation à 2000 t/mn pendant 5 minutes, aliquoté et conservé à -20 °C jusqu'au dosage.

## Dosage de la CRP

La CRP a été dosée par une technique immunoturbidimétrique sur un analyseur multiparamétrique. Les réactifs ont été fournis par le laboratoire Bio Direct France.

## Analyse statistique

L'analyse a été réalisée à l'aide d'un micro-ordinateur utilisant le logiciel Microsoft Excel 2000.

## Résultat

Les résultats comparatifs de l'effet des substances sur les valeurs de la CRP sont rapportés dans le tableau I. La valeur de base de la CRP à To varie de 2,1 à 3,68 mg/l dans tous les lots. La valeur maximale de CRP (24,1 mg/l) a été observée dans le lot blanc qui n'a reçu que de l'eau distillée avant l'induction de l'œdème par la carragénine 1 %. Le lot traité par la bétamétasone qui est l'anti-inflammatoire stéroïdien (AIS) de référence (figure 1) a montré la pente la plus faible. La CRP a atteint le maximum 9 heures après l'administration de la bétamétasone avec 8,43 mg/l et ce taux a diminué progressivement jusqu'à 3,67 mg/l au bout de 48 heures. La bétamétasone a donc montré sa capacité à limiter la réponse de l'organisme à l'inflammation par synthèse de la CRP.

**Tableau I.** Evolution des valeurs de la CRP (mg /L) en fonction des substances administrées.

Temps	Blanc	Betamétasone	E2F2	I <sub>1</sub>
T0	2,10	2,40	3,68	3,50
T3H	22,50	7,34	14,68	18,35
T9H	19,80	8,42	13,75	16,51
T24H	22,90	6,42	8,26	2,75
T48H	24,10	3,67	7,28	1,83

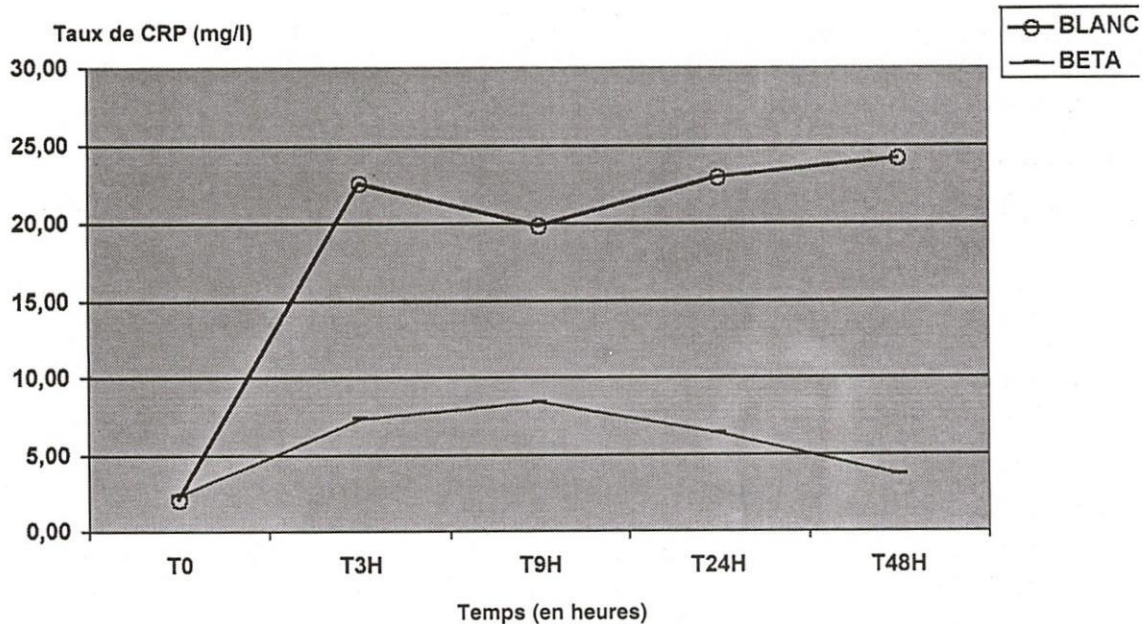


Figure 1. Cinétique de la CRP du lot traité avec la bétamétasone par rapport au lot témoin blanc.

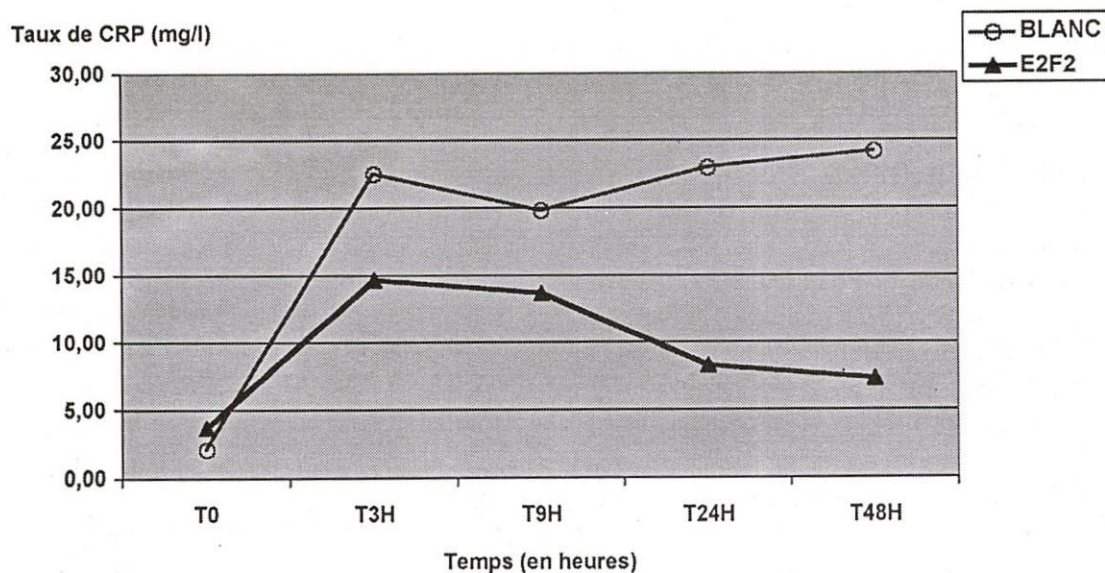


Figure 2. Cinétique de la CRP du lot traité avec la fraction E2F2 par rapport au lot témoin blanc.

La fraction méthanolique de l'extrait obtenu par percolation de la poudre des inflorescences mâles de *Borassus aethiopum* avec le mélange dichlorométhane méthanol 50 % V/V (E2F2) a manifesté une activité modérée sur la cinétique de la CRP (figure 2). Le maximum de synthèse de la CRP a été observé dès la troisième heure avec 14,68 mg/l. Cette valeur a diminué progressivement pour atteindre le taux de 7,28 mg/l après 48 heures. Avec la fraction E2F2 nous avons observé la valeur résiduelle la plus élevée après 48 heures.

Quant à la substance I<sub>1</sub> isolée et purifiée à partir de la fraction E2F2 son action sur la cinétique de la CRP s'est installée plus tardivement (figure 3). En effet le maximum de CRP a été observé 3 heures après avec un taux de 18,35 mg/l qui est proche de celui du lot blanc. A T9H, le taux de CRP (16,51 mg/l) est le double de celui observé avec le lot traité avec la bétamétasone (8,43 mg/l). Cependant 24 heures après l'injection de la substance I<sub>1</sub>, le taux de la CRP est plus bas (2,75 mg/l) comparativement au lot traité avec la bétamétasone (6,42 mg/l) (figure 4). La substance I<sub>1</sub> agit sur la cinétique de la CRP par un mécanisme probablement différent de celui de la bétamétasone.

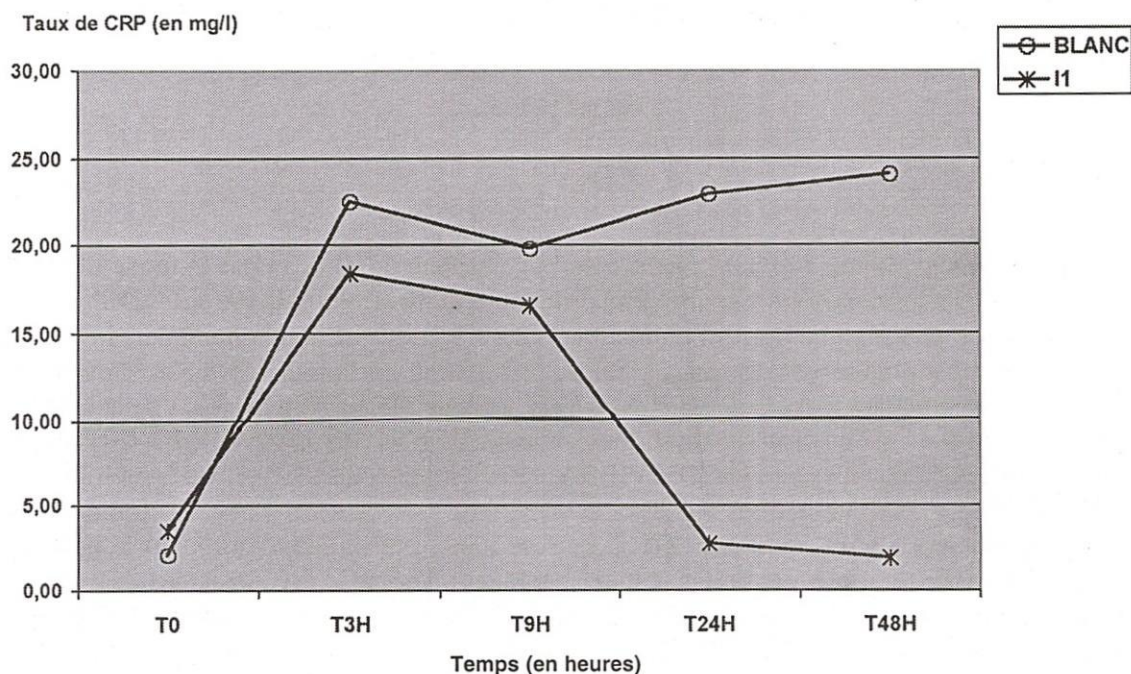


Figure 3. Cinétique de la CRP du lot traité avec la sous fraction I1 par rapport au lot témoin blanc.

## Discussion

L'induction de l'œdème chez la souris après injection dans l'aponévrose plantaire d'une solution de carragenine 1 % a entraîné une augmentation de la CRP de 2,1 mg/l à 24,1 mg/l après 48 heures. D'autres travaux menés chez le rat ont rapporté une augmentation de la CRP d'un niveau indétectable à  $270 \pm 70$  mg/l après 48 heures suite à une injection en sous cutanée d'huile de croton (HEUERTZ, 1993). Le niveau de réponse dans notre étude est plus faible,

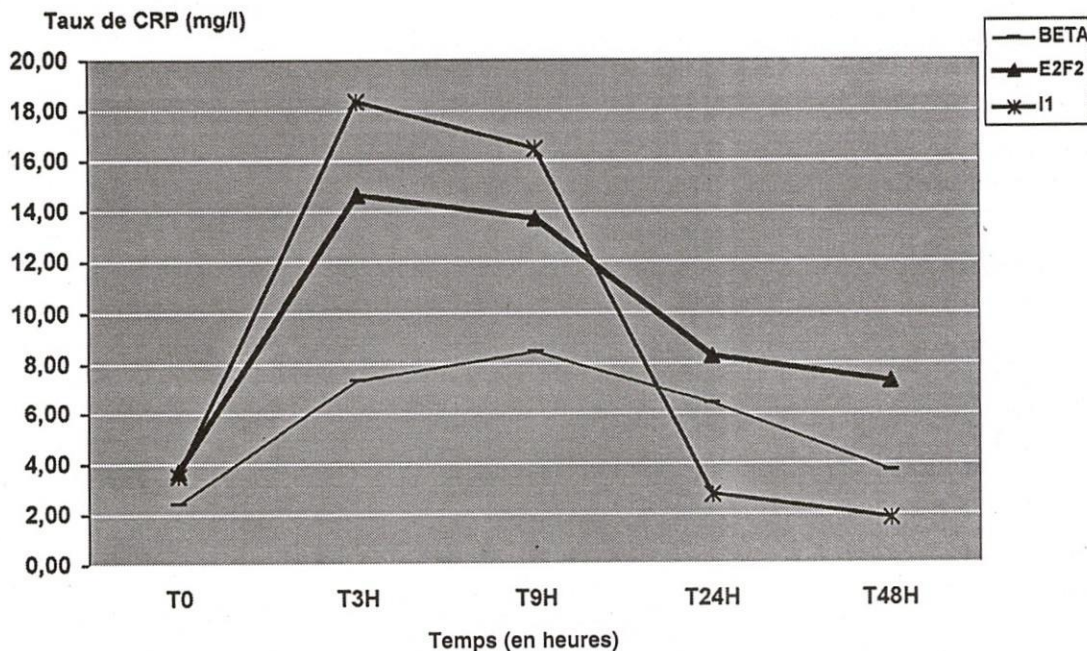


Figure 4. Comparaison de la cinétique de la CRP des lots traités par rapport au lot témoin blanc.

cela pourrait s'expliquer soit par la nature de l'agent phlogogène, soit par le mode d'admission soit par la susceptibilité liée à l'animal de laboratoire. Décrit en 1930, la CRP est une protéine de la phase aiguë de l'inflammation (TILLET, 1930). Elle est nommée ainsi parce qu'elle est précipitable par un polysaccharide C extrait de la capsule du pneumocoque. La CRP est synthétisée principalement par le foie, sa demi vie est de 6 heures. Le gène codant pour la synthèse est localisé sur le chromosome 1 (WHITEHEAD, 1983). La CRP est un polypeptide de 206 acides animés (OLIVEIRA, 1970). Le taux de CRP peut être multiplié par 500 à 1000 lors d'inflammations aiguës comme les infections bactériennes, les traumatismes et les nécroses tissulaires (PEPYS, 1981). Le rôle joué par l'inflammation dans la pathogénèse de l'athérosclérose est connu depuis quelques années. C'est ainsi que des travaux récents ont montré qu'il y a une association entre les risques cardiovasculaires et l'augmentation de la CRP sérique (RIDKER, 1997 ; YU, 2000). Ces études rapportent des corrélations positives entre d'une part l'augmentation de la CRP et l'étendue de l'infarctus du myocarde (DE BEER, 1982 ; PIETILA, 1987) et d'autres parts entre l'augmentation de la CRP et le risque d'arrêt cardiaque (UEDA, 1997 ; ANZAI, 1997). L'ensemble des informations sur la CRP confirme que l'étude de la cinétique de cette protéine permet de suivre fidèlement l'évolution des processus inflammatoires. En effet la CRP s'élève dès la 6<sup>e</sup> heure de l'inflammation, elle est franchement pathologique 24 heures après le début de l'inflammation et se normalise rapidement après la disparition de ce dernier (7-14 jours). L'administration de la beta-métasone (Anti-inflammatoire stéroïdien de référence) a entraîné une diminution du taux de la CRP. De même l'administration de la substance I<sub>1</sub>, a permis de ramener la CRP à la valeur normale 24 heures après. KOMATSUDA *et al.* ont observé la diminution de la CRP après le

traitement avec la prednisolone à 40 mg/jour chez une femme présentant un syndrome néphrotique (KOMATSUDA, 1998). Les glucocorticoïdes contrôlent l'inflammation par inhibition de plusieurs aspects du processus inflammatoire notamment par augmentation de la synthèse des gènes anti-inflammatoires et par diminution de la transcription des gènes inflammatoires (HOLGATE, 1998).

Le rôle joué par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sur la cinétique de la CRP est connu. Après 2 semaines de traitement avec la flurbiprofen (200 mg/j) et avec l'ibuprofen chez les sujets présentant un rhumatisme articulaire, on a observé une réduction significative du taux de la CRP (CUSH, 1990). Quand à l'aspirine son effet sur la cinétique de la CRP n'est pas élucidé. En effet RIDKER *et al.* dans une étude ont montré que l'utilisation de l'aspirine permet de réduire le risque d'infarctus de myocarde de 55,7 % chez des sujets ayant un taux sanguin élevé en CRP (RIDKER, 1997). Ces auteurs pensent que la diminution du risque serait liée à l'activité anti-inflammatoire de l'aspirine et à son activité antiagrégant plaquettaire. Cependant, FENG *et al.* ont montré que l'aspirine administrée à faible ou à forte dose sur une courte période n'affecte pas le taux de la CRP. Ces auteurs concluent que d'autres travaux seraient nécessaires pour déterminer l'effet de l'aspirine à long terme sur le taux de la CRP (FENG, 2000). Les connaissances sur le métabolisme de la CRP permettent d'envisager l'étude du mécanisme d'action de la substance I<sub>1</sub> isolé des inflorescences mâles de *Borassus aethiopum*. En effet la réplication de la CRPmRNA par les hépatocytes est stimulée par l'interleukine 6 circulant qui est stimulé à son tour par la tumor necrosis factor (TNF $\alpha$ ) et l'interleukine 1.

La CRP augmente concomitamment avec d'autres marqueurs de la phase aiguë de l'inflammation qui sont : fibrinogène, facteur VIIIc, facteur von Willebrand, tissu plasminogen activator (tpa), plasminogen activator inhibitor type1, plasminogène et le nombre de globules blancs (HAVERKATE, 1992). Les molécules d'adhésion (ICAM1, VCAM1, MPC1) augmentent également avec la CRP (AIKATERINI, 2002). Des travaux ont rapporté que la CRP est capable d'inhiber la chimiotaxie des neutrophiles sur les fragments du complément (HEUERTZ, 1993). Outre le métabolisme, le rôle joué par la CRP dans l'inflammation est activement exploré. C'est ainsi que Cermak a montré que la CRP est capable d'induire la synthèse du facteur tissulaire (TF) qui est un puissant facteur procoagulant et qui contribue au développement d'une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) et de la thrombose au cours de l'inflammation (CERMAK, 1993). D'autres ont également montré que la CRP jouerait un rôle d'immunomodulateur au cours de l'inflammation (ROBEY, 1987).

En conclusion, le rôle joué par la substance I<sub>1</sub> extraite des inflorescences mâles de *Borassus aethiopum* sur la cinétique de la CRP est prometteur. Des travaux futurs permettront d'explorer le rôle biologique de cette substance sur les cytokines, les molécules d'adhésion, les fragments du complément, les leucocytes et les autres marqueurs de l'inflammation (fibrinogène, vitesse de sédimentation).

## Références bibliographiques

- AIKATERINI P., EFSTATHIOS A., PANAGIOTIS G. *et al.*, 2002. Circulating levels of ICAM1, VCAM1 and MCP1 are increased in haemodialysis patients : association with inflammation, dyslipidaemia and vascular events. *Nephrol Dial Transplant*, 17, 435-441 p.
- ANZAI T., YOSHIKAWA T., SHIRAKI H. *et al.*, 1997. C reactive protein as a predictor of infarct expansion and cardiac rupture after a first Q wave acute myocardial infarction. *Circulation*, 96, 788-94.

- CERMAK J., KEY N. S., BACH R. R., BALLA J., JACOB H. S., VERCELLOTTI G. M., 1993.** C reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize tissue factor. *Blood* Vol 82, Issue 2, 513-520.
- COLOT M., 1972.** Notions techniques de Pharmacologie. Ed Masson, Ed Masson et Cnie, 137 p.
- CUSH J. J., LIPSKY P. E., POSTLETHWAITE A. E. et al., 1990.** Circulation of serologic indicators of inflammatory drug therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* vol 33, Issue 1, 19-28 p.
- De BEER F. C., HIND C. R., FOX K. M., ALLAN R. M., MASERI A., PEPYS M. B., 1982.** Measurement of serum C reactive protein concentration in myocardial ischemia and infarction. *Br Heart J*, 47, 239 – 43 p.
- FENG DL, TRACY RP, LIPINSKA I, MURILLO J, MCKENNA C., 2000.** Toffer G.H. Effet of short term aspirin use on C reactive protein J. of thrombosis and thrombolysis vol 9, Issue 1, 37-41 p.
- GNANOU D., 2001.** Contribution à l'étude de l'activité antifongique de *Borassus aethiopum* Mart (Arecaceae). *Thes pharm. Ouagadougou*, n° 722, 66 p.
- HAVERKATE F., 1992.** Low grade acute phase reactions in arterioclerosis and the consequences for haemostatic risk factor. *Fibrinolysis*, 6, 17-8.
- HEUERTZ R. M., PIQUETTE C. A. WEBSTER R. O., 1993.** Rabbits with elevated serum C reactive protein exhibit diminished neutrophil infiltration and vascular permeability in C5a – induced alveolitis, *American Journal of pathology* vol 142, issue 1, 319 p.
- HOLGATE ST, MAVROLEON G., 1998.** The molecular and cell biology of allergy. *J. Laryngol otol* 112, 1126-1137.
- KOMATSUDA A., MORITA K., OHTANI H., YAMAGUCHI A., MIURA A. B., 1998.** Remission of the nephritic syndrome in a patient with renal amyloidosis due to rheumatoid arthritis treated with prednisolone and methotrexate. *Am J. of kidney diseases* vol 32, Issue 5, page E7.
- OLIVEIRA E. B., GOTSCHLICH E. C., LIU T. Y., 1970.** Primary structure of human C reactive protein. *J. Biol Chem* ; 254, 489-502 p.
- PEPYS M. C., 1981.** Reactive protein fifty years on *Lancet*, 1, 653-6 p.
- PIETILÄ K. O., HARMOINEN A. P., PÖYHÖNEN L., KOSKINEN M., HEIKKILA J., RUOSTEENOJA R., 1987.** Intravenous Streptokinase treatment and serum C reactive protein in patients with acute myocardial infarction *Br Heart J.*, 58, 225-9 p.
- RIDKER P. M., CUSHMAN M., STAMPFER M. J., TRACY R. P., HENNEKENS C. H., 1997.** Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *New England Journal of Medicine* vol 336, Issue 14, 973-979.
- ROBEY F. A., OHURA K., FUTAKI S. et al., 1987.** Proteolysis of human C reactive protein produces peptides with patent immunomodulating activity *J. of Biol Chem*, Vol 262, Issue 15, 7053-7057.
- TILLET W. S., FRANCIS T., 1930.** Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J. Exp Med*, 52, 561-7.
- UEDA S., IKEDA U., YAMAMOTO K. et al., 1997.** C reactive protein as a predictor of cardiac rupture after a first Q wave acute myocardial infarction. *Circulation*, 96, 778, 84
- WHITEHEAD A. S., BRUNS GAP, MARKHAM A. F., COLTEN H. R., WOODS D. E., 1983.** Isolation of human C reactive protein complementary RNA and localization of the gene to chromosome 1. *Science*, 221, 69 – 71 p.
- YU H., RIFAI N., 2000.** High sensitivity C reactive protein and atherosclerosis : from theory to therapy *Clinical Biochemistry*, vol 33, 8, 601-610 p.