

KASE : VALORISATION D'UNE PLANTE MEDICINALE ANTI-INFLAMMATOIRE

Par

M. LOMPO¹ ; S. OUEDRAOGO¹ ; S. SOURABIE¹ ; I.P. GUISSOU^{1,2}

¹ Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS)
Département Médecine-Pharmacopée Traditionnelle/Pharmacie
03 BP 7192 - Ouagadougou 03

² Faculté des Sciences de la Santé - Université de Ouagadougou.
03 BP 7021 - Ouagadougou 03.

RESUME

Khaya senegalensis A. Juss (MELIACEAE) est utilisé au Burkina Faso en tradithérapeutique dans les cas d'inflammations diverses. Une investigation de l'activité anti-inflammatoire selon le modèle de l'oedème à l'huile de croton de l'oreille de souris a permis de mettre en évidence un support pharmacodynamique explicatif de cette utilisation traditionnelle des écorces de tronc de la plante.

L'étude de la toxicité générale aiguë des extraits aqueux lyophilisés a permis d'évaluer la DL50 avec son intervalle de confiance les classant parmi les produits moyennement toxiques. La toxicité générale aiguë est corrélée d'une hypothermie qui laisse penser à une action centrale comme c'est le cas pour les neuroleptiques.

Dans le but de contribuer à l'utilisation thérapeutique rationnelle des écorces de tronc, des formulations galéniques sous forme de crèmes et de gels ont été proposées offrant une perspective d'usage de la plante sous une forme galénique moderne.

MOTS CLES : *Khaya senegalensis* - Ecorces de tronc - Anti-inflammatoire - Crèmes - Gels - toxicité - DL50.

I. INTRODUCTION

Khaya senegalensis A. Juss. (MELIACEAE) ou caïlcédrat est un grand arbre de 25 à 30 m de haut typique des savanes arborées (BERHAUT, 1967). Très largement employé au Burkina Faso en médecine et pharmacopée traditionnelles, il est utilisé dans de nombreuses pathologies parmi lesquelles les affections à composante inflammatoire en dermatologie, rhumatologie, traumatologie, odonto-stomatologie et en O.R.L.

La drogue, constituée essentiellement par les écorces de tronc, est la plupart du temps utilisée en macération, en décoction, en infusion ou broyée et incorporée dans du beurre de karité en pommade.

Dans le but de contribuer à la valorisation des données de la médecine et pharmacopée traditionnelles, nos travaux antérieurs (LOMPO, 1993) ont mis en évidence une activité anti-inflammatoire par voie générale (intrapéritonéale) de l'extrait aqueux de la poudre d'écorce. De même ces travaux (LOMPO, 1995) ont évalué la toxicité générale aiguë de l'extrait en définissant la DL50 qui est égale à 1250 mg/kg chez la souris. Cette toxicité est corrélée d'un effet hypothermisant marqué aux doses comprises entre 1000 et 1500 mg/kg où une faible variation de dose provoque un important abaissement de température. Cet extrait doit être par conséquent considéré de maniement difficile.

L'objectif du présent travail est de contribuer par une approche plus rationnelle à l'utilisation thérapeutique des écorces de tronc de *Khaya senegalensis* en proposant des formes galéniques topiques (crèmes et gels) présentant moins de risques d'utilisation.

II. MATERIEL ET METHODE DE L'ETUDE

1. Matériel

1.1. Le végétal

Les écorces de tronc de *Khaya senegalensis* A. Juss. sont récoltées dans la région de Saponé (Province du BAZEGA à environ 30 km au Sud de Ouagadougou) au Burkina Faso. Elles sont séchées à l'ombre dans une salle aérée et sous ventilation artificielle à l'abri de la poussière, puis réduites en poudre et conservées dans des récipients appropriés à l'abri de l'humidité à l'Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS).

1.2. Matériel de l'étude de l'activité anti-inflammatoire par voie topique

- les extraits
 - . extrait aqueux lyophilisé
 - . extrait à la pétroleine
 - . extrait chloroformique après épuisement à la pétroleine
 - . extrait méthanolique après épuisement à la pétroleine et au chloroforme
 - . extrait aqueux après épuisement à la pétroleine au chloroforme et au méthanol.
- les animaux

Ce sont des souris mâles NMRI (IFFA CREDO) de poids compris entre 28 et 32 g stabulées dans le laboratoire de pharmacologie dans les conditions de température

comprise entre 21 et 24°C et de taux d'humidité de 70 ± 5 %. La salle est soumise à un éclairage artificiel de 12 heures et d'obscurité de 12 h.

2. MÉTHODE DE L'ÉTUDE

2.1. Etude de l'activité anti-inflammatoire

A) PRÉPARATION DES DIFFÉRENTS EXTRAITS

- Extrait aqueux lyophilisé

100 g de poudre d'écorce sont mis à macérer dans 500 ml d'eau distillée au réfrigérateur pendant 24 h. Après agitation magnétique, l'extrait est filtré sur du coton hydrophile et lyophilisé pour donner une poudre de 5.9 g. soit un rendement d'extraction de 5.9g.

- Extrait à la pétroléine

520 de poudre d'écorces sont macérés dans un litre d'éther de pétrole sous agitation pendant 96 h en chambre froide. Le macéré est ensuite introduit dans un percolateur sur lequel 1 litre d'éther de pétrole est versé goutte à goutte. Le percolat recueilli et évaporé au rotavapor à 40°C sous pression réduite. Un résidu de 1.67g est recueilli. Le rendement est de 0.32%.

- Extrait chloroformique

Sur le marc résultant de l'extraction à l'éther de pétrole, 2,5 litres de chloroforme sont versés goutte à goutte et le percolat est recueilli dans un ballon rodé d'évaporation.

Cette solution chloroformique est également évaporée comme précédemment au rotavapor.

Le résidu obtenu pèse 6.3 g soit un rendement de 1.21 %.

- Extrait méthanolique

Sur le marc issu de l'extraction chloroformique, 3.8 litres de méthanol sont versés au goutte à goutte. Le percolat est recueilli et traité de la même manière que précédemment ; le résidu méthanolique obtenu pèse 97.8g, soit un rendement d'extraction de 18.81 %.

- **Extrait aqueux**

2.750 l d'eau distillée sont enfin coulés au goutte à goutte sur le marc resté dans le percolateur. Le percolat est évaporé sous pression réduite à 50°C pour donner un résidu sec de 25.5g ; le rendement obtenu est de 4.90%.

B) **METHODE DE L'ETUDE DE L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE**

- Etude de l'activité anti-inflammatoire topique des différents extraits versus l'indométacine selon le modèle de l'oedème à l'huile de croton de l'oreille de souris.

1) **Préparation des solutions utilisées**

Solution de kétamine chlorhydrate à 15 mg/ml :

75 mg de kétamine chlorhydrate sont dissous dans 5 ml d'eau pour préparation injectable

Solution d'huile de croton à 15 mg/ml :

selon le cas, 75 mg d'huile de croton sont dissous dans 5 ml de dichlorométhane ou d'éthanol

Solution d'indométacine à 50 mg/ml :

50 mg d'indométacine sont dissous dans 1 ml de la solution d'huile de croton ci-dessus.

les solutions d'extrait à la pétroleine et chloroformique se préparent de la même façon que l'indométacine.

les solutions d'extraits au méthanol et à l'eau se préparent de la même manière mais en utilisant respectivement comme solvants la solution éthanolique de croton et de l'eau.

2) **Protocole expérimental**

Deux lots d'au moins six souris pesées et marquées sont nécessaires pour chaque test. Le 1er lot (lot contrôle) ne recevant que la solution d'huile de croton et l'autre lot recevant la substance à étudier dissoute dans la solution d'huile de croton (des essais préliminaires ont montré l'inexistence d'interférence entre ces substances (NIKIEMA, 1997).

L'inflammation cutanée est induite chez le lot contrôle en appliquant 5 μ l de la solution d'huile de croton sur la surface interne du pavillon de l'oreille droite de la souris préalablement anesthésiée par la solution de kétamine chlorhydrate (150 mg/kg) par voie intrapéritonéale. L'oreille gauche n'est pas traitée et sert de témoin.

Le lot n°2 reçoit sur la face interne du pavillon de l'oreille droite (après être anesthésié comme précédemment) 5 μ l de la solution de substance à étudier (250 μ g par oreille).

N.B. : pour les solutions aqueuses, les extraits sont dissous dans de l'eau. Leur dépôt se fera immédiatement après celui de la solution d'huile de croton. Le contrôle recevra un dépôt (même volume) d'eau pour préparation injectable immédiatement après celui de la solution d'huile de croton.

Les deux lots sont observés pendant 6 h (maximum de l'inflammation) (TUBARO ; 1985). Les animaux sont sacrifiés par rupture de la moelle épinière au niveau cervical par étirement. Les oreilles droites et gauches sont alors sectionnées au ras de leur implantation. A l'aide d'un perce-bouton (diamètre 7 mm), un morceau du pavillon de l'oreille est prélevé au niveau de la marge en pointe et pesé immédiatement.

Les différences de poids entre les morceaux de l'oreille droite et gauche sont notées. Les tests sont réalisés de 10 à 16 h pour éviter les éventuelles variations des réponses dues aux fluctuations circadiennes des corticostéroïdes des animaux.

3) Expression des résultats

Soit D.M. la différence moyenne de poids entre les morceaux des oreilles droites traitées à l'huile de croton et ceux des oreilles gauches non traitées du lot contrôlé. Soit D.M.T. la différence moyenne de poids entre les morceaux des oreilles droites traitées à la substance anti-inflammatoire et ceux des oreilles gauches traitées. Soit D.i. la différence de poids entre les morceaux de l'oreille droite et de l'oreille gauche d'une souris donnée.

Le pourcentage d'inhibition de l'inflammation est :

$$(D.M. - D.M.T.) \times 100/D.M.$$

Le pourcentage d'inhibition calculé pour chaque animal est :

$$(D.M. - D.i.) \times 100/D.M.$$

2.2. Méthode de l'étude de la toxicité générale aiguë de l'extrait aqueux lyophilisé

Six lots de 6 souris femelles préalablement mis à jeun pendant 12 h sont constitués de la façon la plus homogène possible et reçoivent en intrapéritonéale respectivement des doses de 50 ; 100 ; 200 ; 300 ; 400 et 600 mg/kg de solution d'extrait aqueux lyophilisé. Des observations sont faites au bout de 24, 48 et 72 h comparativement à un lot témoin qui ne reçoit que de l'eau distillée. Les souris mortes sont dénombrées et les valeurs enregistrées et traitées à l'informatique selon le programme TALLARIDA SOFTWARE (1987) pour en déterminer la DL50 et son intervalle de confiance.

La valeur de la DL50 permet de classer l'extrait aqueux lyophilisé sur l'échelle de toxicité de HODGE et STERNER suivante chez le rat ou la souris :

- produits extrêmement toxiques	DL50 < 1 mg/kg
- produits très toxiques	DL50 de 1 à 50 mg/kg
- produits moyennement toxiques	DL50 de 50 à 500 mg/g
- produits faiblement toxiques	DL50 de 500 à 5000 mg/kg
- produits pratiquement non toxiques	DL50 de 5 à 15 g/kg
- produits relativement sans danger	DL50 > 15 g/kg

2.3. Méthodes de l'étude galénique

A) FORMULATION

a) Les crèmes

- Formule utilisée

. extrait de plante	1 g
. cire blanche	1 g
. alcool cetylique (lanette 16)	9 g
. propylène glycol	10 g
. émulgade 1000 NI	10 g
. eau conservante q.s.p.	100 g

- Mode opératoire : Après avoir pesé les différents constituants,

1. Faire fondre dans un mortier au bain marie à une température voisine de 70°C le mélange émulgade 1000NI, alcool cétylique (lanette 16) et cire blanche
2. Dissoudre le propyléneglycol dans 3/4 de la quantité d'eau nécessaire dans laquelle on a préalablement dissout à chaud l'agent conservateur (acide sorbique). Porter la température à 75°C.
3. Dissoudre l'extrait aqueux lyophilisé dans le 1/4 restant d'eau
 - Retirer le mortier du bain-marie et ajouter par petites portions 2 dans 1 en agitant vivement
 - y additionner 3 en fin d'opération en agitant lorsque la température du mélange est tombée au voisinage de 40°C
 - Mélanger en agitant de moins en moins vigoureusement jusqu'à refroidissement
4. Conditionner dans des pots de 125 ml.

b) Gel au carbopol de l'extrait aqueux lyophilisé

- Formule utilisée

. extrait de plante	1.0 g
. carbopol 940	1.5 g
. propylèneglycol	15.0 g
. EDTA	50.0 mg
. triéthanolamine	5.0 g
. eau conservante q.s.p.	100.0 g

- Mode opératoire : Après avoir pesé les différents constituants,

1. dissoudre l'acide sorbique et l'EDTA dans 3/4 de l'eau nécessaire additionnée de triéthanolamine ;
2. dissoudre l'extrait aqueux lyophilisé dans le 1/4 restant d'eau ;
3. dans un mortier, triturer avec soin le carbopol et propylèneglycol (homogénéiser) ;
4. verser 1 dans 3 en remuant lentement pour homogénéiser ;
5. laisser reposer le gel et conditionner dans des pots de 125 ml.

N.B. : Les crèmes et les gels des autres extraits sont préparés selon le même principe.

B. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE DES FORMES REALISEES

Le protocole utilisé est le même que décrit antérieurement selon le modèle de l'oedème à l'huile de croton de l'oreille de souris. Le lot témoin reçoit l'excipient après dépôt de l'agent inflammatoire tandis que le lot traité reçoit la crème ou le gel après avoir déposé l'agent inflammatoire.

C. CONTROLE DES FORMES REALISEES

Les tests suivants ont été réalisés :

- homogénéité de la forme
- étalement sur la peau
- toxicité cutanée
- stabilité d'activité
- stabilité d'aspect au cours du temps

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. Activité anti-inflammatoire des différents extraits versus indométacine

Tableau I : Inhibition de l'oedème par les différents extraits d'écorce de tronc de *Khaya senegalensis* A. Juss.

Extraits	Dose administrée ($\mu\text{g}/\text{oreille}$)	Nombre d'animaux	Pourcentage d'inhibition de l'oedème (%)
Extrait aqueux après épuisements successifs	250	6	11.0 \pm 7.8
Extrait aqueux lyophilisé	250	6	44.3 \pm 5.1
Extrait à la pétroléine	250	6	62.8 \pm 8.1
Indométacine	250	6	82.7 \pm 6.0
Extrait chloroformique après épuisement à la pétroléine	250	6	79.9 \pm 6.2
Extrait méthanolique après épuisement à la pétroléine et au chloroforme	250	6	25.6 \pm 7.7

L'analyse du tableau I montre l'existence d'un effet anti-inflammatoire pour tous les extraits réalisés mais à des degrés divers. On peut classer ces extraits suivant un ordre croissant de l'effet anti-inflammatoire de la façon suivante :

- extrait aqueux après épuisement successif à la pétroléine, au chloroforme et au méthanol. (inhibition d'oedème : 11%)
- extrait méthanolique après épuisement à la pétroléine et au chloroforme (inhibition d'oedème : 25.6%) ;
- extrait aqueux total lyophilisé (inhibition d'oedème : 44.3%) ;
- extrait à la pétroléine (inhibition d'oedème : 62.8%) ;
- extrait chloroformique (inhibition d'oedème : 79%) ;
- indométacine (inhibition d'oedème : 82.7 %).

Les extraits organiques (moins polaires) semblent présenter un effet anti-inflammatoire supérieur à celui des extraits méthanolique et aqueux plus polaires. Ceci s'expliquerait par leur caractère lipophile plus marqué que les derniers.

En effet, la barrière épidermique est essentiellement constituée par la couche cornée qui est surtout une barrière limitante de caractère lipophile (WEPIERRE, 1977). Les composés lipophiles pourraient s'y dissoudre et diffuser dans la matrice lipidique située entre les filaments de kératine et au sein des lipides intercellulaires. Les petites molécules hydrophiles beaucoup moins diffusibles migreraient lentement au sein des régions riches en eau.

La différence d'activité entre ces deux types d'extraits (moins polaires et polaires) peut également s'expliquer par la différence de composition chimique qui ferait que dans les extraits moins polaires on retrouve des substances à activité anti-inflammatoire plus marquée que celle des extraits plus polaires.

2. Toxicité générale aiguë de l'extrait aqueux lyophilisé

Le traitement informatique des données sur la mortalité cumulative :

- au cours de 24 heures

DL50 = 318 mg/kg avec un intervalle de confiance
(I.C.) = [228.9 - 442.6 mg/kg] à $p < 0.05$

DL5 = 145 mg/kg ; DL95 = 700 mg/kg

Les rapports $DL5/DL95 = 0.21$; $DL5/DL50 = 0.46$; $DL50/DL95 = 0.45$ prouvent la validité du test ; cependant le rapport $DL95/DL5$ est inférieur à 10 d'où les précautions à prendre quant à l'utilisation par voie générale.

- au cours de 48 heures

DL50 = 221.3 mg/kg avec I.C. = [165.6 - 295.9 mg/kg] à $p < 0.05$

- au cours de 72 heures

DL50 = 203.6 mg/kg avec I.C. = [124.6 - 332 mg/kg] à $p < 0.05$

Ces différentes valeurs de la DL50 classent l'extrait aqueux lyophilisé en administration intrapéritonéale comme étant moyennement toxique. Cette toxicité est corrélée d'un certain nombre de signes : Hypothermie ; tendance à l'immobilisation ; perte d'instinct d'exploration ; tendance à l'endormissement et au regroupement, perte du tonus, refus de s'alimenter.

L'hypothermie relevée au cours de cette étude serait alors un témoin voire un signe de la toxicité de l'extrait à l'instar de ce qui est observé avec certains psychotropes comme les neuroleptiques (COHEN, 1996 ; GINESTET et al. 1988). Une action centrale pourrait être alors envisagée.

III.3. Etude galénique

A) Formulation

Les formes topiques ont été choisies parce que présentant une action locale, ce qui éviterait l'hypothermie observée par voie générale.

a) Les crèmes

Les crèmes de l'extrait aqueux lyophilisé, de l'extrait à la pétroleine et au chloroforme se réalisent aisément sans artifice particulier.

b) Les gels : il en est de même pour les gels

B) Evaluation de l'activité des formes réalisées

Les mesures ont été faites seulement six heures après une administration unique

Tableau II : Inhibition de l'œdème des formes réalisées

Formes réalisées	Dose administrée mg/oreille	Nombre d'animaux	Pourcentage d'inhibition de l'œdème (%)
Crème de l'extrait aqueux lyophilisé	25	6	19.3 ± 6.4
Crème de l'extrait à la pétroleine	25	6	21.4 ± 12.1
Crème de l'extrait chloroformique	25	6	22.8 ± 6.9
Gel de l'extrait aqueux lyophilisé	25	6	30.4 ± 8.3
Gel de l'extrait à la pétroleine	25	6	20.4 ± 12.8
Gel de l'extrait chloroformique	25	6	24.8 ± 11.6
Gel de l'indométacine	25	6	24.7 ± 9.1

D'une manière générale, les gels obtenus semblent présenter une meilleure biodisponibilité que les crèmes.

Les rapports effet (gel) sur effet (extrait correspondant) sont les suivants :

- 68.5% pour l'extrait aqueux lyophilisé
- 32.5% pour l'extrait à l'éther de pétrole
- 31% pour l'extrait chloroformique
- 29.9% pour l'indométacine

Les rapports effet (crème) sur effet (extrait correspondant) sont les suivants :

- 43.5% pour l'extrait aqueux lyophilisé
- 34.1% pour l'extrait à la pétroleine
- 28.5% pour l'extrait chloroformique

Il en résulte que le gel et la crème de l'extrait aqueux lyophilisé présentent les meilleurs rapports effet (forme réalisée) sur effet (extrait non formulé). Ils semblent les plus intéressants à exploiter.

C) Contrôle des formes réalisées

Le contrôle, réalisé sur ces formes selon différents protocoles décrits par PRADEAU (1992) semble indiquer une bonne qualité de ces crèmes et gels. En effet, ils sont dénués de toute irritabilité de la peau ; l'indice d'irritation cutanée primaire étant < 0.5. Les pH des formes sont compris entre 5 - 6 donc voisin de celui de la peau. Leur stabilité organoleptique et d'activité au cours du temps est notable (plus d'une année de conservation).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Khaya senegalensis qui jouit d'une réputation non négligeable en médecine et pharmacopée traditionnelles fait présentement l'objet de nombreuses investigations dans le but de valoriser les données de l'utilisation traditionnelle contre les maladies inflammatoires. Du point de vue pharmacologique, la recherche du support pharmacologique explicatif de l'utilisation des écorces de tronc comme anti-inflammatoire a été démontrée par la mise en évidence de l'activité inhibitrice de l'oedème à l'huile de croton chez la souris des extraits aqueux, à l'éther de pétrole, au chloroforme et au méthanol. Cependant la prépondérance de cet effet inhibiteur de l'oedème semble plus marquée pour les extraits organiques moins polaires (chloroformique 79.9% d'inhibition, et à la pétroleine 62.8% d'inhibition qu'aux extraits plus polaires comme extrait aqueux lyophilisé (44.4. % d'inhibition). L'indométacine quant à elle présente 82.7% d'inhibition.

La DL50 de l'extrait aqueux lyophilisé qui est de 318 mg/kg après 24 h d'observation ; 221.3 mg/kg après 48 h et 203.6 mg/kg après 72 h d'observation le classe parmi les produits moyennement toxiques. L'hypothermie semble un signe de la manifestation de la toxicité générale aiguë.

Les propositions de formulation faites semblent offrir des perspectives de l'utilisation plus rationnelle des écorces de tronc sous forme de gels ou de crèmes.

En effet, la crème à 1% ou le gel à 1% de l'extrait aqueux lyophilisé semblent en particulier présenter un meilleur rapport effet (forme réalisée) sur effet (extrait non formulé). Par ailleurs, l'extrait aqueux lyophilisé présente un bon rendement d'extraction.

Les travaux futurs viseront au fractionnement des différents extraits en vue de mettre en évidence la substance active afin de pouvoir mieux la contrôler au cours du temps et envisager sa formulation galénique.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - **BERHAUT J. (1967)** : Flore du Sénégal - 2ème Ed. Clairafrique Dakar, P. 60.
- 2 - **COHEN Y.(1986)**: Abrégé Pharmacologie (2ème Ed. MASSON - Paris 89.
- 3 - **GINESTET D., KAPSAMBELIS V. et BRION N. (1988)** : Neuroleptiques in Pharmacologie clinique : Bases de la thérapeutique. Expansion scientifique Française, Paris, 2ème Ed. 1209-1232
- 4 - **LOMPO M. (1993)** : Etude pharmaco-toxicologique chez la souris et le rat de *Khaya senegalensis* (Desr.) A. Juss. (MELIACEAE) utilisé en tradithérapeutique au Burkina Faso. Mém. de DEA Sc. Biol. Appl. (Physiol. Animale) Univ. Ouagadougou 66-71
- 5 - **LOMPO M. (1995)** : Effet hypothermisant et toxicité générale aiguë chez les souris des écorces de tronc de KASE. CAMES Pharm. Méd. Trad. Afr. Lomé Presses de l'UB 73-80
- 6 - **NIKIEMA J.B. (1997)** : Contribution à l'étude phytochimique et pharmacologique de *Leptenia hastata* (Pres.) Decne. Thèse Doctorat ès Sciences Pharmaceutiques. Institut de Pharmacie. Univ. Libre de Bruxelles.
- 7 - **PRADEAU D. (1992)** : L'analyse pratique du médicament. Ed. Médicales Internationales. Tec et Doc. Lavoisier Paris - 970-976.
- 8 - **TALLARIDA R.J. and MURRAY R.B. (1987)** : Pharmacologic Calculation System based on "Manual of Pharmacologic Calculations with Computer Programm". Secoud Edition. Spring-Verlag. New York Inc. Serial N° 423213 - 12.28.1994.
- 9 - **TUBARO A., DRI P., DELBELIO G., ZILLI C., DELLA LOGGIA R. (1985)** : The Croton Oil Ear Test revisited. Agents and Actions, Vol. 17, 3-4
- 10 - **WEPIERRE J. (1977)** : Abrégé de Pharmacodynamie générale. Ed. MASSON - Paris, 18-22.