



Short Communication

<http://indexmedicus.afro.who.int>

Effets du décocté de *Biophytum petersianum* Klotzsh (Oxalidaceae), sur le calcium libre intracellulaire dans les cellules musculaires

Aklesso Piwèlong MOUZOU^{1*}, Bruno CONSTANTIN², Siméno TITRIKOU¹,
Messanvi GBEASSOR¹ et Guy RAYMOND²

¹ Faculté des Sciences, Laboratoire de Pharmacologie et de Physiologie Animale Université de Lomé, Togo

² CNRS – Physiopathologie et Pharmacologie des Canaux Ioniques, Institut de Physiologie et de Biologie Cellulaire, Université de Poitiers, 40 Avenue Recteur Pineau F-86022 Poitiers Cedex France

* Auteur correspondant, E-mail : mouzoul@gmail.com; B.P. 1515 Lomé, Togo Fax : (228) 221 85 95.

RESUME

L'effet de décocté de *Biophytum petersianum*, Klotzsh, (Oxalidaceae), a été étudié sur la variation du calcium libre intracellulaire dans les cellules musculaires squelettiques de rat en culture primaire, dans les lignées cellulaires sans dystrophine (SolC1) et avec dystrophine exprimée (Sold5). Cette plante est utilisée dans la pharmacopée traditionnelle pour traiter l'hypertension artérielle au Togo. Le calcium est responsable de la contraction des cellules musculaires squelettique, lisse et cardiaque. Son augmentation dans les cellules cardiaque et/ou lisse entraîne l'hypertension artérielle chez les hommes. Les résultats montrent que le décocté de cette plante entraîne une diminution du taux de calcium libre intracellulaire de base dans les cellules musculaires. Cette diminution partiellement réversible est dose et temps dépendants. La diminution du taux de calcium libre intracellulaire dans les lignées cellulaires SolC1 et Sold5 ainsi que dans les cellules musculaires squelettiques en culture primaire est similaire. Ce qui montre que l'effet est indépendant de la dystrophine, une protéine membranaire dont l'absence ou le dysfonctionnement induit une élévation du taux de calcium libre intracellulaire.

© 2009 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés : hypertension, *Biophytum petersianum*, calcium libre intracellulaire, rapport de fluorescence.

INTRODUCTION

La pharmacopée traditionnelle est une méthode de traitement des maladies très utilisée dans les pays en développement. Plusieurs maladies d'origine variée sont traitées à base de plantes. En Afrique, l'ethnomédecine couvre un domaine à caractère mystique mais une grande partie est attribuée au principe actif des substances contenues dans les feuilles, dans les écorces et/ou dans les racines des plantes. Il devient impérieux que la communauté scientifique, par des travaux de recherches appropriés, contribue à établir les bases scientifiques de cette pharmacopée. Dans la gamme des plantes médicinales utilisées au Togo, *Biophytum petersianum* Klotzsh (Oxalidaceae) est une plante utilisée pour

traiter l'hypertension artérielle (Titrikou et al., 1998) et il a été montré que son effet hypotenseur ne passe pas par l'inhibition du système nerveux sympathique mais implique partiellement la stimulation du système parasympathique (Titrikou et al., 2008). De même les travaux réalisés sur l'aorte de rat Wistar ont montré que le décocté de la plante inhibe l'influx calcique (Titrikou et al., 2007).

L'augmentation du taux de calcium libre intracellulaire dans le cytoplasme peut entraîner la mort cellulaire (Marchand et al., 2001) et l'hypertension artérielle chez les hommes (Resnick, 1999). Il a été reporté une augmentation du taux de calcium au repos dans les myotubes DMD et la souris *mdx* dépourvus de dystrophine (Tunner et al., 1988; Imbert et al., 1995). Chez la souris *mdx*

© 2009 International Formulae Group. All rights reserved.

les membres subissent une dégénérescence et nécrose, suivie d'une régénérescence qui permet par la suite à la souris d'avoir une vie quasiment similaire à la souris normale mais avec des muscles hypertrophiés (Bulfield et al., 1984). La dystrophine est une protéine de 427 kDa qui fait partie d'un complexe protéinique assurant un lien entre les filaments du cytosquelette et la matrice extracellulaire (Pons et al., 1990).

L'objectif général de notre travail est de rechercher l'effet du décocté sur les variations de calcium libre intracellulaire. Comme objectifs spécifiques, nous allons voir si : (i) le décocté de cette plante agit sur la variation du calcium libre intracellulaire dans les conditions de repos ; (ii) le rôle de la dystrophine dans cette variation calcique intracellulaire.

MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal

Biophytum petersianum (BP) est une herbacée qui a été récoltée au Togo en octobre et novembre 2005 et authentifiée au Département de Botanique de la Faculté des Sciences de l'Université de Lomé. Un spécimen y est déposé sous le numéro : 1032.. La plante entière est récoltée, lavée et séchée au Laboratoire de Botanique. Elle est ensuite broyée et macérée dans de l'eau désionisée (5 g/100ml d'eau désionisée) avec agitation à 37 °C pendant 8 heures. Elle est ensuite bouillie pendant 10 à 15 minutes. L'extrait est filtré d'abord sur du coton hydrophile stérile et ensuite à l'aide d'un filtre mini pores de 0,2 µM. Le filtrat obtenu est conservé à 4 °C pour être dilué à différentes concentrations avant l'utilisation.

Culture primaire de cellules musculaires squelettiques des rats nouveau-nés

La culture primaire des cellules musculaires squelettiques des mammifères a été réalisée à partir des cellules satellites obtenues par dissociation mécanique et enzymatique (trypsine) des muscles des pattes postérieures des rats Wistar nouveau-nés (1 à 3 jours d'âge) dans le Spinner (Tableau 1) conformément aux travaux antérieurs (Rivet et al., 1989; Cognard et al., 1993). Les cellules sont maintenues pendant 2 à 3 jours dans le milieu de prolifération qui est le Hamf12 (Gibco, Cergy Pontoise, France) (Tableau 1).

On y ajoute 10% de sérum de cheval (Gibco), 10% de sérum de veau foetal (Boehringer) et 1% d'antibiotique (Pénicilline G, Sigma) (Tableau 2). Le milieu de prolifération est ensuite remplacé par le milieu de fusion qui est du DMEM (Gibco) (Tableau 1). On y ajoute 5% de sérum de cheval et 1% d'antibiotique (Pénicilline G, (Tableau 2). L'atmosphère de l'incubateur est maintenue à une composition constante de 95% air et 5% CO₂, à une température de 37 °C et saturée en humidité afin d'éviter l'évaporation de l'eau des milieux de prolifération ou de fusion.

Culture des lignées cellulaires SolC1 et Sold5

La lignée cellulaire Sol8 a été fournie par l'Université Paris XII, Créteil, France. Cette lignée de cellule myogénique a été isolée à partir d'une culture primaire de muscle soléaire de souris C3H normales (Mulle et al., 1988). La lignée cellulaire SolC1 est un sous-clone de la lignée Sol8. Les deux lignées cellulaires sont dépourvues de dystrophine. La lignée SolC1 a été infectée par un vecteur rétroviral contenant de l'ADN codant pour la mini-dystrophine pour donner la lignée Sold5 exprimant donc la dystrophine (Marchand et al., 2001). Les expériences ont été effectuées sur les lignées SolC1 et Sold5. Les milieux de prolifération, de fusion, de congélation et de décongélation des lignées cellulaires sont résumés dans le tableau 2.

Solution physiologique

Les expériences sont effectuées dans le milieu de base (type McEven) dont la composition en Mm se présente comme suit: NaCl 130, KCl 5.4, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 0.8, Glucose 5.6, HEPES 10, pH 7.4. Le décocté est dilué dans ce milieu de base pour avoir les différentes concentrations. La différence entre les effets obtenus à 1/10 et à 1/5 de dilution n'est pas significative. Pour cela nous avons choisi de travailler avec la dilution de 1/10 pour étudier les effets sur les lignées cellulaires afin d'éviter toute toxicité éventuelle. Pour étudier la réversibilité du décocté, le rapport de fluorescence a été mesuré dans le milieu de base, dans le milieu de base plus le décocté et après lavage du décocté par retour dans le milieu de base. Les expériences sont réalisées sur les cellules à trois jours de fusion (F+3).

Tableau 1: Composition des milieux de base.

	Spinner	HamF12	DMEM*
Principaux sels inorganiques (mM/ml)			
NaCl	116	130	110
KCl	5.3	2.9	5.4
CaCl ₂	-	0.3	1.8
MgCl ₂	-	0.6	-
MgSO ₄	-	-	1
Na ₂ HPO ₄ , H ₂ O	8	1	1
NaHCO ₃	22.6	14	14
Autres composants (mg/l)			
D-Glucose	1000	1802	4500
Pyruvate de Na ⁺	-	110	-
Rouge de phénol	10	1.20	15
HEPES (mM)	3	-	-

* DMEM : Dulbecco Modified Eagle Medium, *HamF12 : Milieu de prolifération Gibco.

Tableau 2: Composition des milieux de culture.

	Culture primaire		Lignée cellulaire			
	Milieu de prolifération	Milieu de fusion	Milieu de prolifération	Milieu de fusion	Milieu de congélation	Milieu de décongélation
Milieu de base	Hamf12	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM
Sérum de cheval	10%	5%	-	2%	-	-
Sérum de veau fœtal	10%	-	10%	-	20%	20%
L-Glutamine	-	-	1%	1%	1%	1%
Antibiotique	1%	1%	1%	1%	1%	1%
Insuline	-	-	-	10µg/ml	-	10µg/ml

Mesure expérimentale de la concentration du calcium libre intracellulaire

La mesure de la concentration du calcium libre intracellulaire a été réalisée par la technique de fluorescence en utilisant la sonde Indo-1/AM. L'Indo-1/AM est s'accumule passivement dans les cellules et se trouve piégé sous sa forme carboxylée. Sa très forte affinité pour le calcium avec une constante de dissociation in vitro de $K_D = 250$ nM permet de suivre de faibles variations de calcium intracellulaire (Grynckiewicz et al., 1985). Les cellules sont incubées dans le milieu de base (type McEven) contenant $3 \mu\text{M}$ de l'Indo-1/AM (Sigma). La charge dure 45 minutes à la température ambiante (22°C) et à l'obscurité. Après rinçage avec le milieu de base, une post-incubation visant à assurer une

dé-estérification complète de la sonde est réalisée pendant 15 minutes à 37°C . La fluorescence est mesurée à la température ambiante avec l'appareil de cytofluorimétrie Olympus (OSP 100). L'émission de fluorescence s'effectue à 405 nm pour la forme de la sonde liée au calcium et à 485 nm pour la forme libre de la sonde. Le rapport de fluorescence (405/485) donne un niveau de calcium libre intracellulaire et la variation de cette fluorescence de base permet de déterminer la variation du calcium libre intracellulaire (diminution ou augmentation).

Analyse des données

L'analyse des données a été réalisée par les logiciel Prism 3.0 et Origin 5.0 (MICROCAL SOFTWARE INC., Northamph,

USA). Le test *t*-Student's a permis l'analyse statistique des résultats et, lorsque que $p < 0,05$, le résultat est considéré comme significatif.

RESULTATS ET DISCUSSION

Cellules musculaires squelettiques en culture primaire

En présence du décocté de *Biophytum petersianum*, le rapport de fluorescence diminue. Cette diminution est significative ($p < 0,05$) et dose-dépendante. L'effet est réversible lorsque qu'on revient en milieu de base. La figure 1 montre les histogrammes représentant le rapport de fluorescence dans le milieu de base et en présence du décocté à différentes concentrations. Au 1/50 de dilution, le rapport de fluorescence diminue de 16%, à 1/10 de dilution le rapport de fluorescence diminue de 24% et à 1/5 de dilution cette diminution est 26%. La différence entre les effets à 1/10 de dilution et à 1/5 de dilution n'étant pas significative, nous avons choisi de travailler sur les lignées cellulaires avec la dilution de 1/10 pour éviter toute toxicité éventuelle. Les résultats montrent qu'en présence de décocté de *Biophytum petersianum*, le rapport de fluorescence diminue dans les cellules musculaires squelettiques en culture primaire. Ces cellules expriment la dystrophine génétiquement normale.

Lignées cellulaires SolC1 et Sold5

La figure 2 montre des histogrammes représentant le rapport de fluorescence mesuré dans le milieu de base et en présence de décocté sur la lignée SolC1 (Figure 2A) et sur la lignée Sold5 (Figure 2B). Sur la lignée sans dystrophine (SolC1), le rapport de fluorescence diminue d'environ 27% en présence de décocté. Sur la lignée exprimant la dystrophine (Sold5), le rapport de fluorescence diminue d'environ 24% en présence du décocté. La différence entre les deux diminutions n'est pas significative.

Les résultats sont obtenus sur les lignées cellulaires sans dystrophine ou avec dystrophine exprimée sont similaires. Cette diminution du rapport de fluorescence (450/485) indique une diminution de la concentration du calcium libre intracellulaire. L'effet partiellement réversible et dose-dépendant est en accord avec les résultats antérieurs (Titrikou et al., 1998). La diminution de la concentration du calcium libre intracellulaire par le décocté justifie l'utilisation de cette plante dans le traitement de l'hypertension artérielle (Titrikou et al., 1998, 2007, 2008) puisque l'augmentation du calcium libre intracellulaire induit l'hypertension artérielle chez les

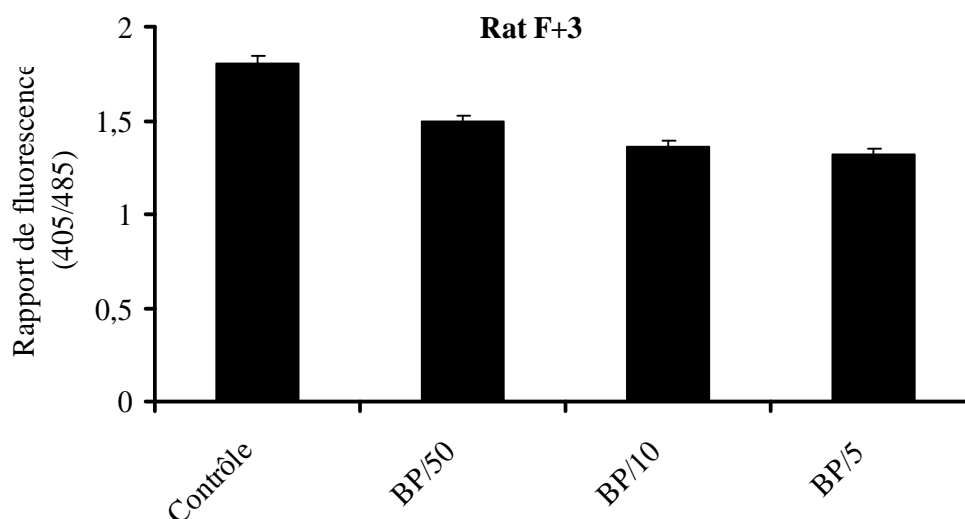


Figure 1: Histogrammes du rapport de fluorescence dans les cellules musculaires squelettiques des rats en contrôle et en présence de l'extrait (n = 12).

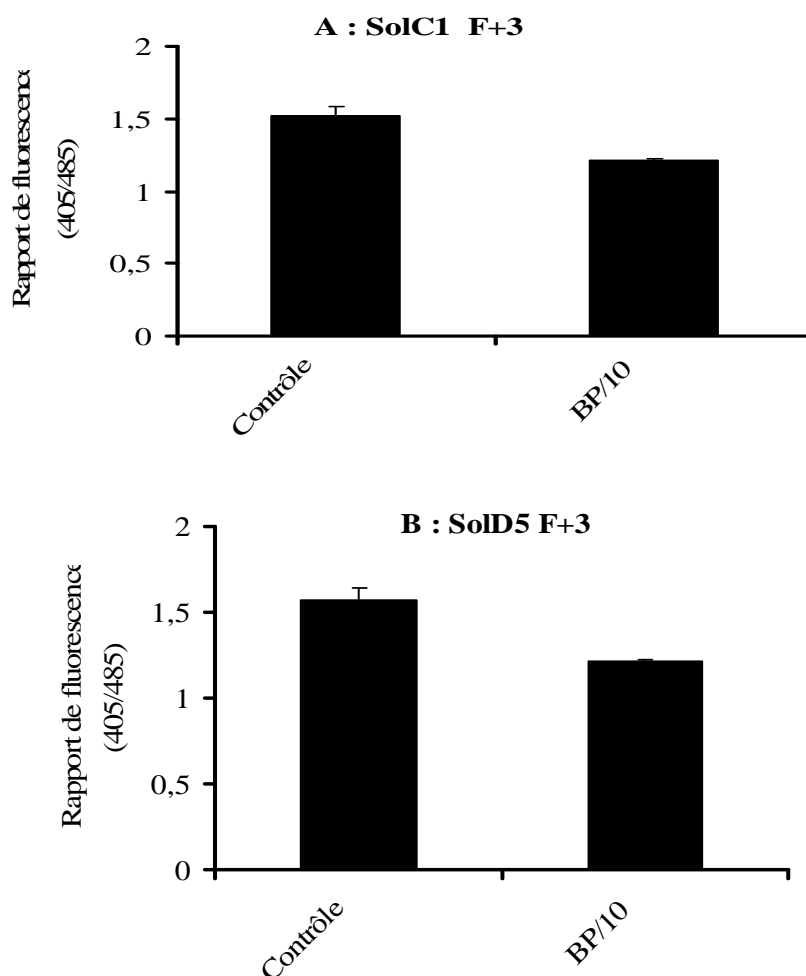


Figure 2 Histogrammes du rapport de fluorescence dans les lignées cellulaires sans dystrophine (A, n = 17) et avec dystrophine exprimée (B, n = 18).

hommes (Resnick, 1999). L'effet du décocté de la plante ne passe pas par la dystrophine car il est similaire à celui obtenu sur les cellules musculaires squelettiques en culture primaire, sur les lignées cellulaires avec ou sans dystrophine. Le décocté exercerait un effet inhibiteur sur un ou des mécanisme(s) cellulaire(s) intervenant dans l'homéostasie du calcium intracellulaire. Ces résultats sont en accord avec ceux de Titrikou et al. (2007) qui montrent un effet inhibiteur du décocté sur l'influx calcique. D'autres travaux ont montré que le décocté de *Sclerocarya birrea* Hochst (Anacardiaceae), une plante utilisée dans le traitement de l'hypertension artérielle au Burkina Faso a un effet inhibiteur sur la libération du calcium induite par la caféine (Belemtougri et al., 2001). La caféine est un

activateur des canaux calciques du réticulum sarcoplasmique connu sous le nom de récepteurs à la ryanodine (Ehrlich, 1994). L'effet inhibiteur du décocté de *B. petersianum* pourrait passer par un mécanisme similaire.

Conclusion

Les résultats obtenus montrent que le décocté de *Biophytum Petersianum* possède des composés actifs capables de diminuer le taux basal du calcium libre intracellulaire dans les cellules musculaires squelettiques possédant la dystrophine naturelle (cellules musculaires de rat en culture primaire). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus sur les lignées cellulaires sans dystrophine (SolC1) ou avec dystrophine exprimée (SolD5).

L'effet du décocté ne passerait pas par la dystrophine, une protéine dont l'absence ou le dysfonctionnement entraîne l'augmentation de la concentration du calcium libre intracellulaire. Le décocté agirait sur un ou des mécanisme(s) impliqué(s) dans l'homéostasie du calcium libre intracellulaire. La diminution du taux de calcium libre intracellulaire justifie l'utilisation de cette plante dans la pharmacopée traditionnelle pour traiter l'hypertension artérielle. Les investigations sur l'intervention du récepteur à la ryanodine et/ou du récepteur à l'inositol triphosphate du réticulum sarcoplasmique seraient nécessaires puisque l'effet du décocté n'est pas voltage-dépendant dans la mesure où les expériences ont été réalisées sans stimulation.

REMERCIEMENTS

Les remerciements vont à l'Institut de Physiologie et de Biologie Cellulaires, Université de Poitiers UMR 6187, CNRS France où les travaux ont été réalisés.

BIBLIOGRAPHIES

- Belemtougri RG, Constantin B, Cognard C, Raymond G, Sawadogo L. 2001. Effets of *Sclerocarya Birrea* (A. rich) hochst (anacardiaceae) leaf extracts on calcium signalling in cultured rat skeletal muscle cells. *Journal of Ethnopharmacology*, **76**: 247-252.
- Bulfied G, Siller WG, Wight PA, Moore, KJ. 1984. X-chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse. *PNAS USA*, **81**: 1189-1192.
- Cognard C, Constantin B, Rivet-Bastide M, Imbert N, Besse C, Raymond G. 1993. Appearance and evolution of calcium currents and contraction during the early post-fusional stages of rat skeletal muscle cells developing in primary culture. *Development*, **117**: 1153-1161.
- Grynkiwicz G, Poenie M, Tsien RY. 1985. A new generation of indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, **260**: 3440-3450.
- Imbert N, Cognard C, Dupont G, Guillou C, Raymond G. 1995. Abnormal calcium homeostasis in Duchenne muscular dystrophy myotubes contracting *in vitro*. *Cell Calcium*, **18**: 177-186.
- Marchand E, Constantin B, Vandebrouck C, Raymond G, Cognard C. 2001. Calcium homeostasis and cell death in *mdx* dystrophin-deficient cell line in culture. *Cell Calcium*, **29**: 85-95.
- Mulle C, Benoit P, Pinset C, Roa M, Changeux JP. 1988. Calcitonin gene-related peptide enhances the rat of desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor in cultured mouse muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 5728-5732.
- Pons F, Augier N, Heilig R, Léger J, Mornet D, Léger JJ. 1990. Isolated dystrophin molecules as seen by electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 7851-7855.
- Resnick L. 1999. The cellular basis of hypertension and allied clinical conditions. *Progress Cardiovascular Display* **42**: 1-22.
- Rivet M, Cognard C, Raymond G. 1989. The slow inward calcium current is responsible for a part of contraction of patch-clamped rat myoballs. *Pflügers Arch.*, **413**: 316-318.
- Titrikou S, Aklikokou AK, Gbeassor M. 1998. Effets de l'extrait de *Biophytum petersianum* (Oxalidaceae), Klotzsh, sur le système cardiovasculaire de cobaye. *Pharma. Méd. Trad. Africaine*, **10**: 32-42.
- Titrikou S, Eklou-Gadégbekou K, Mouzou a, Aklikokou K, Gbéassor M. 2007. Calcium antagonist activity of *Biophytum petersianum* on vascular smooth muscle of Wistar rat. *I. J. P. T.*, **6**(2): 185-189.
- Titrikou S, Eklou-gadégbékou K, Aklikokou SK, Gbéassor M. 2008. Effets de *Biophytum petersianum* (Oxalidaceae) sur la pression artérielle chez le rat Wistar. *Phytothérapie*, **6**: 215-218.
- Tunner PR, Westwood T, Regen CM, Steinhardt RA. 1988. Increased protein degradation results from elevated free calcium levels found in muscle from *mdx* mice. *Nature*, **335**: 735-738.