

ETUDE HISTOLOGIQUE DES EFFETS DE L'EXTRAIT AQUEUX DES FEUILLES DE LAPORTEA AESTUANS SUR LA REGENERATION OSSEUSE CHEZ LE RAT

NGUEGUIM T. Florence^{1*}, CANNET Catherine², NGUINDJEL Daniel¹, DZEUFIEU D.P. Desiré¹, DONFACK J. Hubert³, DIMO Théophile¹, KAMTCHOING Pierre¹

* tsngueguim@yahoo.fr

1. Laboratoire de Physiologie Animale, Département de Biologie et Physiologie Animales, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé I, BP 812 Yaoundé, Cameroun.
2. Laboratoire d'Histomorphométrie, Institut de Médecine Légale, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg, France.
3. Département des Sciences Biomédicales, Faculté des Sciences, Université de Dschang, BP 67, Dschang, Cameroun.

RESUME

Laportea aestuans (Urticaceae) est une plante utilisée dans la région du Centre Cameroun pour le traitement des fractures. La présente étude a pour but d'évaluer par analyse histologique les effets ostéo-inducteurs de l'extrait aqueux des feuilles de *L. aestuans* chez la rate (Wistar). Une cavité a été créée dans la portion antérieure de la diaphyse du fémur. L'extrait aqueux de *L. aestuans* a été administré quotidiennement par voie orale (100-400 mg/kg) pendant deux semaines. Au terme de la période expérimentale, les animaux ont été sacrifiés et les fémurs fixés dans du formol 10% tamponné puis transférés dans de l'éthanol à 70%. Ils ont ensuite été déshydratés et inclus en paraffine. Des coupes de 5µm ont été réalisées et les colorations suivantes faites : - H&E - Picrosirius et observation en lumière polarisée. Les animaux fracturés ne recevant aucun traitement ont présenté une structure

osseuse désorganisée avec la présence d'ostéoblastes et d'ostéocytes dans leurs lacunes. En lumière polarisée ces animaux ont présenté un aspect d'«os tissé» se traduisant par une trame collagénique peu organisée et une faible minéralisation. Les animaux traités à l'extrait de plante ont présenté une structure du cal osseux de plus en plus dense avec plus ostéoblastes et de plus en plus d'ostéocytes dans les lacunes à toutes les doses. En lumière polarisée et à la dose de 400 mg/kg d'extrait de plante, les animaux ont montré un début d'organisation lamellaire parallèle au sein de l'os tissé. L'extrait induirait une activation ostéoblastique, conduisant à une réparation osseuse plus rapide, ce qui justifierait son utilisation empirique dans le traitement des fractures.

MOTS CLES : Fracture, *Laportea aestuans*, activité ostéoblastique, histologie

ABSTRACT

Laportea aestuans (Urticaceae) is a plant used in the Cameroon centre region for fracture healing. The purpose of this study is to evaluate by histological analysis, the osteoinductive effect of the aqueous leaves plant extract of *L. aestuans* in female Wistar rats. A drill hole injury was created in the diaphysis of the femur. The aqueous extract of *L. aestuans* was administered orally (100-400 mg/kg) for two weeks. At the end of the experimental period, the animals were sacrificed and the femurs fixed in 10% buffered formalin and then transferred into 70% ethanol. They were then dehydrated and embedded in paraffin. Sections of 5µm were made and the following colorations realized : H & E, Picosirius staining and observation in polarized light. Fractured animals receiving no treatment exhibited a disorganized bone structure with the presence of osteoblasts and osteocytes in their lacuna. In polarized light, these animals presented an appearance of «woven bone» resulting in a poorly organized collagen structure and low mineralization. Animals treated with plant extract exhibited an increasingly dense callus structure with more osteoblasts and more and more osteocytes in the lacuna at all doses. In polarized light and at the dose of 400 mg/kg, the animals showed a parallel lamellar organization within the woven bone. Thus, the extract would induce osteoblastic activation, leading to faster bone repair, justifying its empirical use in the treatment of bone fractures.

KEY WORDS : Fracture, *Laportea aestuans*, osteoblastic activity, histology

INTRODUCTION

Les fractures peuvent être d'origine traumatique ou pathologique. Quelle qu'en soit l'origine, la discontinuité de l'os affecte le métabolisme osseux et l'activité de ses cellules. La consolidation d'une fracture est un processus tout à fait naturel mais nécessite une période assez longue (3 à 12 mois) pour que l'os fracturé se reconstitue totalement. De manière générale, le traitement est basé sur les méthodes chirurgicales consistant à repositionner les os brisés et à immobiliser le membre concerné (plâtre ou matériel orthopédique) ou non chirurgicales basées sur des suppléments en vitamine D combinée au calcium, des ostéo-inducteurs comme les BMPs (Inductos® et Osigraft®) la Raloxifene, l'Andronate entre autres [1,2]. Ces médicaments de synthèses sont accompagnés d'effets indésirables et très peu accessibles aux populations démunies. Au Cameroun, en raison du coût et de l'inaccessibilité de ces méthodes, environ 80% de la population utilisent les plantes médicinales pour accélérer la consolidation osseuse. *Laportea. aestuans* (*Urticaceae*) est une plante médicinale utilisée en médecine traditionnelle sous forme de décoction pour le traitement de divers maux tels que les dermatites, l'hypocalcémie [3] et les fractures. La présente étude a pour but d'évaluer par analyses histologiques les effets ostéoinducteurs de l'extrait aqueux des feuilles de *L. aestuans* chez le rat Wistar.

MATERIELS ET METHODES

Extraction aqueuse des feuilles de *L. aestuans*

Les feuilles fraîches récoltées ont été séchées à l'ombre, puis écrasées à l'aide d'un moulin électrique. De la poudre obtenue, 911 g ont été prélevés, puis mélangés à 6L d'eau distillée avant d'être portés à ébullition pendant 15 minutes selon les instructions du tradithérapeute. Après refroidissement, le mélange obtenu a été tamisé et la solution recueillie, filtrée à l'aide du papier wattman N°3 avant d'être lyophilisée à l'Institut Médicale et d'Etude de Plantes Médicinales (IMPM) donnant 98g d'extrait de plante, soit un rendement d'extraction de 10,75 %.

Animaux

Les rats albinos de souche Wistar, femelles sexuellement non expérimentées, âgées de 2,5 à 3 mois et pesant entre 170 et 200 g ont été utilisées en début de l'expérimentation. Ces animaux ont été élevés à l'animalerie du Laboratoire de Physiologie Animale de l'Université de Yaoundé I. Les rates étaient logées dans les cages collectives tapissées de copeaux de bois. Elles étaient élevées dans les conditions de température ambiante, aération suffisante sous un cycle nyctéméral naturel. Ces animaux recevaient pendant l'expérimentation, de l'eau à volonté et une alimentation composée d'un mélange de farine de maïs (60 %), de farine de blé (10 %), de farine de poisson (20 %), de tourteaux de palmiste (3 %), de poudre d'os (1 %), de poudre d'arachide (5 %) et de sel de cuisine (1 %) et un complexe vitaminique en poudre. Toutes les procédures de cette étude ont suivi les principes de l'utilisation des animaux de laboratoire et des soins de la «Communauté Européenne» lignes directrices (Directive 2010/63 / CEE) et ont été approuvées par le «Comité d'éthique animale» de la Faculté des Sciences, Université de Yaoundé I.

Induction fracture fémorale et traitement

Le matériel utilisé a été stérilisé dans de l'alcool (90%). Par la suite, 20 rates âgées d'environ trois mois (190-200g) ont été anesthésiées avec du Diazépam (10mg/kg) puis de la Kétamine (30 mg/kg) par voie intra péritonéale. Le fémur de la patte droite de chaque rate a été traité. Pour ce faire, la peau a été incisée à l'aide d'une lame de scalpel, le muscle dégagé et l'os du fémur a été exposé à la surface. A l'aide d'une perceuse Proxxon (D-54343 ; FOHREN) munie d'une mèche métallique (diamètre 0,8 mm) à son extrémité, une perforation de 0,8 mm de diamètre a été réalisée dans la portion antérieure de la diaphyse du fémur [4, 5]. Un groupe d'animaux (5 rats) recevaient de l'eau distillée (1mL/100g p.c). Les animaux fracturés ont reçu de l'eau distillée (1mL/100g p.c) ou l'extrait de plante aux doses de 100, 200 ou 400 mg/kg pendant deux semaines. Le traitement a commencé le jour suivant l'induction de la fracture.

Analyses histologiques

Au terme de la période expérimentale, les animaux ont été sacrifiés et les fémurs fixés dans du formol à 10% tamponné pendant trois semaines, transférés dans

de l'éthanol à 70% pendant une semaine puis décalcifiés dans du liquide de Kristensen, composé d'acide formique et de formate de sodium [6]. Cette méthode de décalcification utilise un acide faible et est de ce fait moins agressive pour le tissu osseux. Le temps de décalcification a été de 23 heures pour l'ensemble des échantillons osseux.

A l'issue de la décalcification, les fémurs ont été rincés 2 heures sous eau courante puis déshydratés selon le schéma appliqué aux organes de routine (cycle de 19h : éthanol de 50% à 100% puis xylène) et inclus dans une paraffine dont le point de fusion est de 62 - 64°C (Peel-a-way paraffin embedding wax, Ref: 19304-01, EMS, Philadelphia). Cette paraffine à haut point de fusion permet d'assurer une meilleure matrice d'enrobage à l'os et une coupe plus aisée.

Des coupes de 5µm ont été faites et les colorations suivantes réalisées : (i) Hématoxyline / Eosine (H&E) pour l'étude de la morphologie générale, (ii) Picrosirius (PS) [7, 8] pour la mise en évidence de la micro-anatomie osseuse observée en lumière polarisée. Le rouge Sirius F3B (Color Index (C.I.) 35782) est un colorant spécifique du collagène dont la longue molécule linéaire vient se fixer parallèlement sur les fibres de collagène, augmentant ainsi leur biréfringence. Cette méthode de coloration permet d'obtenir des images hautement contrastées nécessaires pour l'observation et la quantification des structures microscopiques osseuses [9].

RESULTATS

La **Figure 1** présente une cartographie du fémur montrant les sites de fracture (cal osseux). Une observation de ce cal osseux (**Figure 2**) chez les animaux fracturés recevant de l'eau distillée met en évidence une structure osseuse désorganisée avec la présence d'ostéoblastes (**Figure 2A**). Le cal osseux des animaux traités à l'extrait de plante à la dose de 100 mg/kg montre une présence d'ostéoblastes et d'ostéocytes dans leurs lacunes (**Figure 2B**). A la dose de 200 mg/kg il a été également noté une présence d'ostéoblastes et de plus d'ostéocytes dans leurs lacunes (Figure 2C). Parallèlement à de la présence d'ostéoblastes et de nombreux ostéocytes, il a été noté une vascularisation et un ancrage du cal dans la corticale osseuse à la dose de 400 mg/kg de l'extrait de plante (**Figure 2D**). Il est important de noter que les animaux recevant l'extrait de plante présentent des structures du

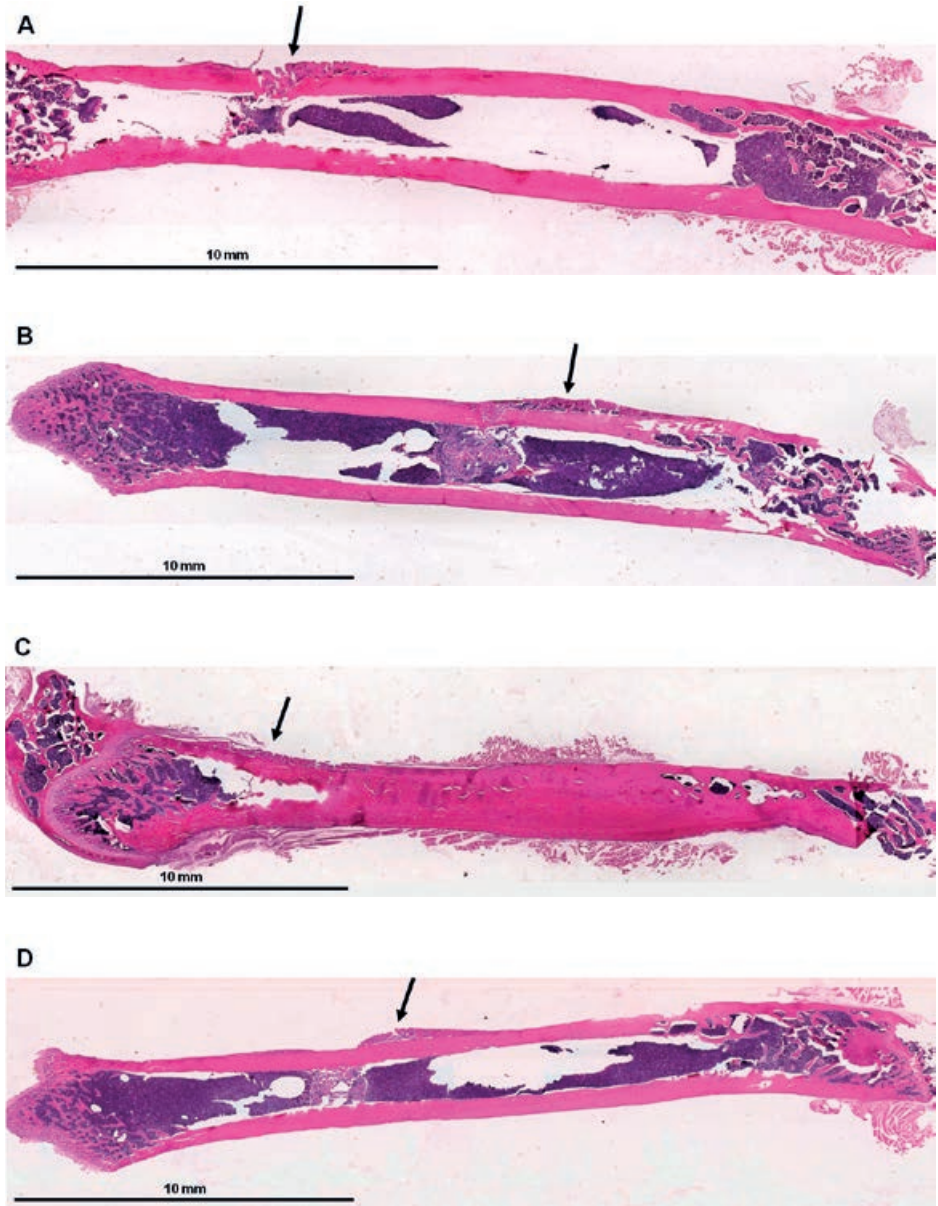


Figure 1 : Cartographie des fémurs des animaux recevant de l'eau distillée (A) et l'extrait de plante aux doses de 100 mg/kg (B) , 200 mg/kg (C) et 400 mg/kg (D). Les flèches indiquent la présence de cals osseux aux sites de fracture.

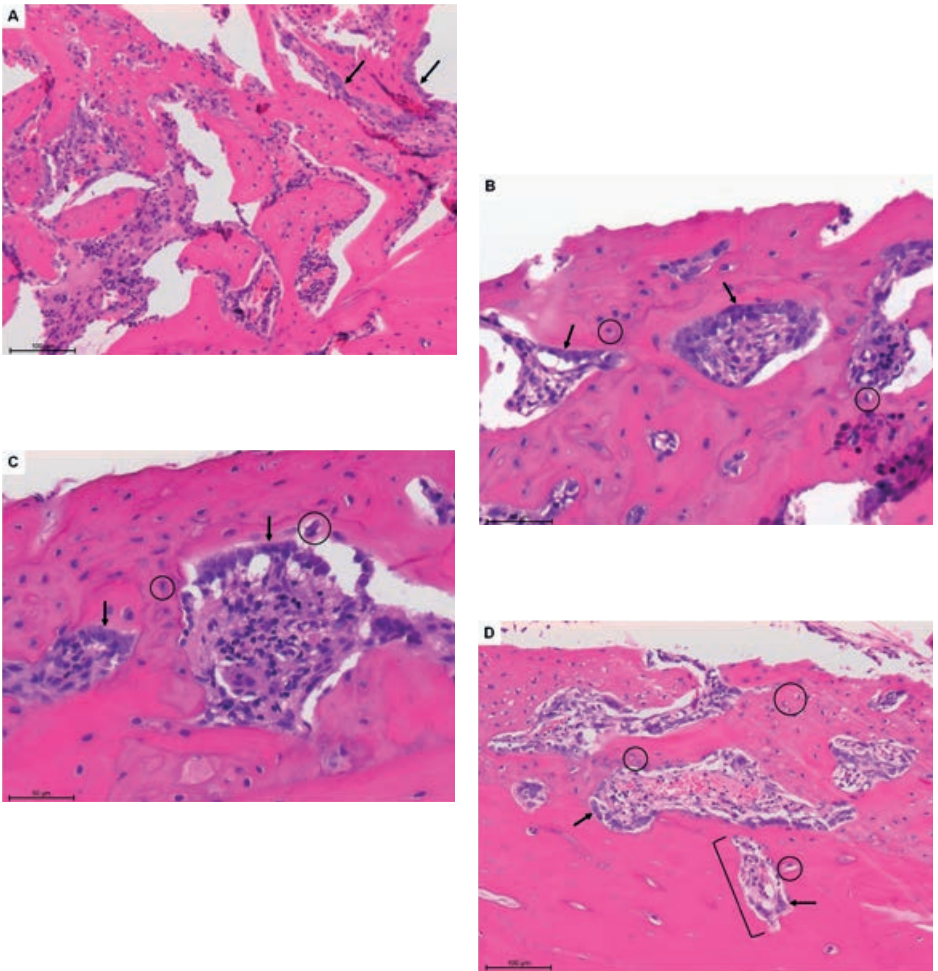


Figure 2 : Effets de l'extrait aqueux de *L. aestuans* au site de la fracture - Coloration H&E

A : Fracture recevant de l'eau distillée – Structure osseuse désorganisée, présence d'ostéoblastes (flèches) et faible calcification.

B : Extrait à 100 mg/kg – Présence d'ostéoblastes (flèches) et d'ostéocytes dans leurs lacunes (cercle) indiquant un processus de synthèse calcique.

C : Extrait à 200 mg/kg – Présence d'ostéoblastes (flèches) et de plus d'ostéocytes dans leurs lacunes (cercles).

D : Extrait à 400 mg/kg – Présence d'ostéoblastes (flèches), de nombreux ostéocytes dans leurs lacunes (cercles), vascularisation et ancrage du cal dans la corticale osseuse (crochet).

Les figures B, C et D présentent des structures du cal osseux de plus en plus denses. n=6

cal osseux de plus en plus dense et ce de manière dose-dépendante. L'observation en lumière polarisée des coupes colorées au picosirius met en évidence une organisation de lamelles parallèles des fibres de collagène le long de la corticale fémorale, caractéristique de l'os lamellaire, chez l'animal non fracturé (Figure 3A). Chez les animaux fracturés ne recevant aucun traitement, la même observation révèle la présence d'os tissé, se traduisant par une trame collagénique peu organisée et une faible minéralisation (Figure 3b). L'os tissé est un os immature présent dans les premiers stades de la réparation osseuse. Chez les animaux fracturés recevant l'extrait de plante à la dose de 400 mg/kg, il a été observé un début d'organisation lamellaire parallèle des fibres de collagène au sein de l'os tissé indiquant une minéralisation du cal osseux (Figure 3c).

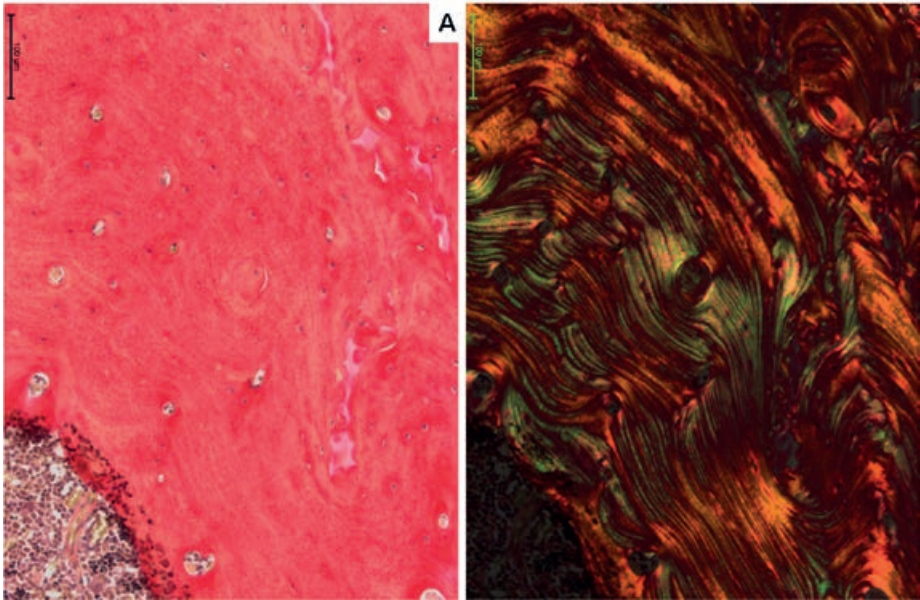
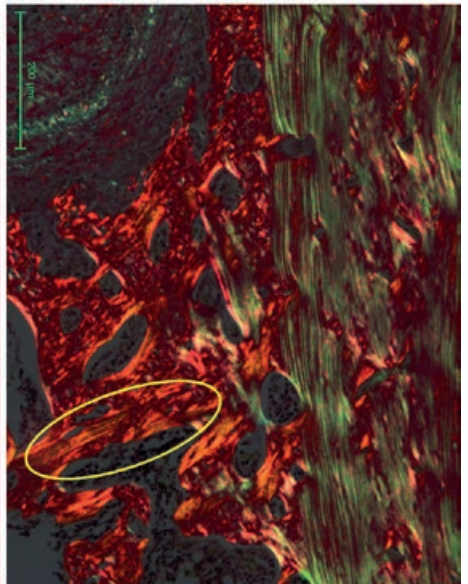
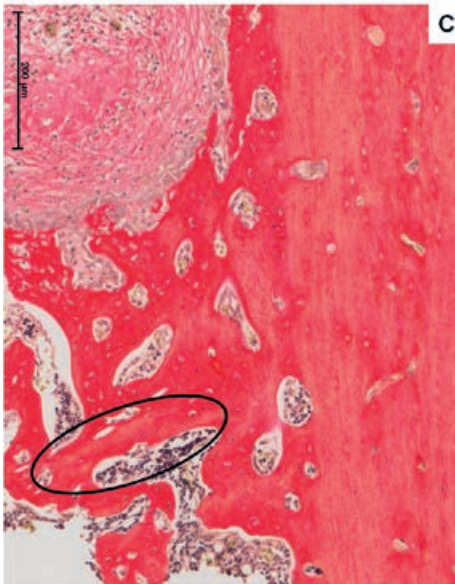
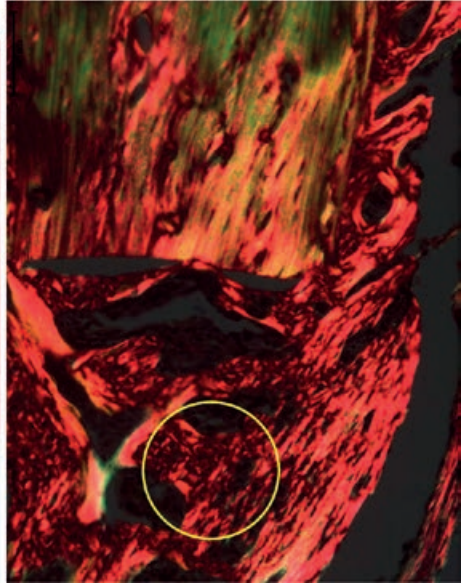


Figure 3 : Effets de l'extrait aqueux de *L. aestuans* au site de la fracture – Coloration PS et PS + polarisation

A : Os non fracturé – Organisation de lamelles parallèles des fibres de collagène observée en polarisation.

B : Os fracturé ne recevant aucun traitement – Aspect d'«os tissé» se traduisant par une trame collagénique peu organisée et une faible minéralisation (cercle).

C : Os fracturé recevant l'extrait de plante à la dose de 400 mg/kg – Début d'organisation lamellaire parallèle au sein de l'os tissé indiquant une minéralisation du cal osseux (cercle). n=6



DISCUSSION

Le but de cette étude était de démontrer les effets de l'extrait aqueux de *Laportea aestuans* sur la régénération osseuse. Après induction de la fracture il a été noté une formation du cal osseux chez les animaux fracturés recevant de l'eau distillée. Cette formation du cal osseux témoigne d'une régénération naturelle de l'os au niveau du site fracturaire. En effet, la présence d'une fracture active les facteurs de régulation locale et systémique (facteurs de croissance, de différenciation, cytokines, hormones et les composantes de la matrice extracellulaire) [10]. Ces différents facteurs interagissent et permettent la migration, la prolifération et la différenciation des cellules mésenchymateuses au site de la fracture [11,12]. La présence d'ostéoblastes et la faible calcification observées au site de la fracture à la fin du traitement chez les animaux ne recevant aucun traitement sont les témoins de la réparation naturelle de l'os fracturé, dans nos conditions expérimentales. La structure du cal osseux chez les animaux recevant l'extrait aqueux de *L. aestuans* est de plus en plus dense en fonction des doses administrées. Par rapport à l'aspect du cal des animaux fracturés ne recevant aucun traitement cette densité témoigne d'un effet accélérateur de l'extrait de plante sur la régénération osseuse. Il est bien connu que, les ostéoblastes sont des cellules qui synthétisent les macromolécules matricielles et que les ostéocytes sont des ostéoblastes (complètement différenciés) emprisonnés dans la matrice synthétisée et assurant les phénomènes d'échange calcique [10, 13]. La présence de nombreux ostéoblastes et de plusieurs ostéocytes dans leurs lacunes et ce, de manière dose dépendante, attesteraient non seulement d'une activation de la sécrétion matricielle mais aussi d'un processus de synthèse calcique. Par ailleurs les animaux recevant l'extrait de plante ont également montré au niveau du tissu osseux régénéré la présence d'une vascularisation. L'angiogénèse est une étape essentielle dans la guérison de la fracture. La différenciation cellulaire est contrôlée par les facteurs de croissance et une bonne vascularisation [14]. L'extrait de plante pourrait également agir sur le processus d'angiogénèse. Cette hypothèse reste à démontrer. En lumière polarisée, les animaux fracturés ne recevant aucun traitement, montrent un aspect d'«os tissé» se traduisant par une trame collagénique peu organisée et une faible minéralisation contrairement aux animaux non fracturés qui présentent une organisation de lamelles parallèles des fibres de collagène. Ces derniers effets sont comparables à l'os des animaux fracturés recevant l'extrait de plante à la dose de 400 mg/kg qui présente un début d'organisation lamellaire parallèle au sein de l'os tissé indiquant une minéralisation

du cal osseux. Ces résultats suggèrent que l'extrait aqueux de *L. aestuans* posséderait une activité ostéoblastique.

CONCLUSION

L'extrait aqueux des feuilles de *L. aestuans* administré aux animaux fracturés pendant deux semaines a entraîné une prolifération des ostéoblastes, une accélération de la minéralisation du cal osseux, un remplacement plus rapide de l'os immature ou « os tissé » et une vascularisation avec un ancrage du cal plus précoce à la dose de 400 mg/kg. L'extrait induirait une activation ostéoblastique, conduisant à une réparation osseuse plus rapide.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Mme NTAP Anne Catherine pour les informations sur l'utilisation empirique de cette plante.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. OBERT L, DESCHASSEAUX F, GARBUIO P: Critical analysis of safety and efficacy of BMPs in long bone non unions. *Injury*, 2005, **36**, 38-42.
2. BRANDI ML: Drugs for bone healing. *Exp. Op. Invest. Drugs.*, 2012, 21, Issue 8, 1169-1176.
3. JIOFACK T, FOKUNANG C, GUEDJE N, KEMEZE V, FONGNZOSSIE E, NKONG-MENECK B, MAPONGMETSEM P, TSABANG N: Ethnobotanical uses of medicinal plants of two ethnoecological regions of Cameroon. *Int. J. Med. Med. Sci.*, 2010, **2**(3), 60-79.
4. NGUEGUIM FT, KHAN MP, DONFACK JH, TEWARI D, TIWARI SC, NAGAR GK, TIWARI SC, DIMO T, MAURYA R, CHATTOPADHYAY N: Ethanol extract of *Peperomia pellucida* (piperaceae) promotes fracture healing by an anabolic effect on osteoblasts. *J Ethnopharmacol.*, 2013, **148**, 62-8.

5. NGUEGUIM FT, SAKOUONG TSH, DONFACK JH, GOUNOUE K R, DZEUFIEI DPD, KAMTCHOUING P, DIMO T: Aqueous extract of *Peperomia pellucida* (L.) HBK accelerates fracture healing in Wistar rats. *BMC Complement. Altern. Med.*, 2017, **188**, 1-9.
6. KRISTENSEN HK: An improved method of decalcification. *Stain Technol.*, 1948, **23**(3):151-154.
7. PUCHTLER H, WALDROP FS, VALENTINE LS: Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red F3BA. *Beitr. Pathol. Anat.*, 1973, **150**, 174-187.
8. JUNQUEIRA LC, BIGNOLAS G, BRENTANI RR: Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.*, 1979, **11**(4), 447-455.
9. DZIEDZIC-GOCLAWSKA A, ROZYCKA M, CZYBA JC, MOUTIER R, LENCZOWSKI S, OSTROWSKI K: Polarizing microscopy of picrosirius stained bone sections as a method for analysis of spatial distribution of collagen fibers by optical diffractometry. *Basic Appl. Histochem.*, 1982, **26**(4), 227-239.
10. USHA K. & NANDEESH BN. Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism, Fogelman et al. (eds.), *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*, © Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2012.
11. CANALIS E, MCCARTHY T, CENTRELLA M: Growth factors and the regulation of bone remodeling. *J. Clin. Invest.*, 1988, **81**, 277-281.
12. BOLANDER ME. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1992, **200**, 165-170.
13. TOPPETS V, PASTORET V, DE BEHR V, ANTOINE N, DESSY C, GABRIEL A : Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux. *Ann. Méd. Vét.*, 2004, **148**, 1-14.
14. LIESBET G, GERISCH A, VANDERSLOTEN RJW VAN OOSTERWYCK H: Angiogenesis in bone fracture healing: A bioregulatory model. *J. Theor. Biol.*, 2008, **251**, Issue 1, 137-158.