

## **Activité anti-toxoplasmosse, screening phytochimique et étude de la cytotoxicité de l'extrait éthanolique 70% de *Hunteria eburnea* Pichon (Apocynaceae)**

***Camara Djeneb***

Laboratoire de Botanique, Unité de Formation et de Recherche Biosciences, Abidjan, Université Félix Houphouët-Boigny, Cote d'Ivoire

***Coulibaly Kiyinlma***

UFR Sciences biologiques, Département de production Végétale. Université Peleforo Gon Coulibaly, Korhogo, Côte d'Ivoire

***Kanga Yao***

Laboratoire de Botanique, Unité de Formation et de Recherche Biosciences, Abidjan, Université Félix Houphouët-Boigny, Cote d'Ivoire

***Bisanz Cordelia***

***Delauw Marie-France***

Laboratoire Timc-Imag de l'Université Grenoble-Alpes, France

***Zirihi Guédé Noël***

Laboratoire de Botanique, Unité de Formation et de Recherche Biosciences, Abidjan, Université Félix Houphouët-Boigny, Cote d'Ivoire

Doi: 10.19044/esj.2018.v14n30p37 [URL:http://dx.doi.org/10.19044/esj.2018.v14n30p37](http://dx.doi.org/10.19044/esj.2018.v14n30p37)

---

### **Abstract**

*Hunteria eburnea* is a medicinal plant used in traditional medicine in the Sassandra Region (Ivory Coast) in the treatment of malaria and skin diseases. The aim of this study is to study the inhibitory effect of 70% ethanolic extract of *Hunteria eburnea* stem bark on *Toxoplasma gondii*, a protozoan parasite such as *Plasmodium falciparum* that causes toxoplasmosis. The 70% ethanolic extract was obtained from the parts of the plant that are used by traditional health practitioners in the Haut-Sassandra Region (Ivory Coast). The 70% ethanolic extract of *Hunteria eburnea* stem bark revealed high anti-*Toxoplasma gondii* activity with an estimated IC<sub>50</sub> of 0.72 mg / mL and no cytotoxicity to HFF cells. (Human Foreskin Fibroblasts). Also, the phytochemical screening of this extract revealed the presence of sterols / triterpenes as well as alkaloids. This result indicates a promising source of new anti-*Toxoplasma* drugs from *Hunteria eburnea*, a West African medicinal plant.

---

**Keywords:** HFF cells, Ivory Coast, Medicinal plants, *Toxoplasma gondii*

---

### Résumé

*Hunteria eburnea* est une plante médicinale utilisée en médecine traditionnelle dans la Région du Haut-Sassandra (Côte d'Ivoire) dans le traitement du paludisme et des maladies de la peau. Le but de cette étude, est d'étudier l'effet inhibiteur de l'extrait éthanolique 70 % de l'écorce de tige de *Hunteria eburnea* sur *Toxoplasma gondii*, un parasite protozoaire comme *Plasmodium falciparum* responsable de la toxoplasmose. L'extrait éthanolique 70 % a été obtenu à partir des parties de la plante qui sont utilisées par les tradipraticiens de santé de la Région du Haut-Sassandra (Côte d'Ivoire). L'extrait éthanolique 70 % de l'écorce de tige de *Hunteria eburnea* a révélé une activité anti-*Toxoplasma gondii* élevée avec une (CI<sub>50</sub>) estimée à 0,72 mg/mL et une absence de cytotoxicité vis-à-vis des cellules HFF (Human Foreskin Fibroblasts). Aussi, le criblage phytochimique de cet extrait a mis en évidence la présence de stérols/triterpènes ainsi que des alcaloïdes. Ce résultat indique donc une source prometteuse de nouveaux médicaments anti-*Toxoplasma* à partir de *Hunteria eburnea*, une plante médicinale ouest africaine.

---

**Mots clés:** Cellules HFF, Côte d'Ivoire, Plantes médicinales, *Toxoplasma gondii*

### Introduction

*Toxoplasma gondii* est un parasite cosmopolite. Des études épidémiologiques chez l'homme ont montré sa large distribution géographique et sa forte prévalence. L'incidence de la toxoplasmose dans la population générale est difficile à évaluer car l'infection est le plus souvent asymptomatique. La toxoplasmose affecte environ 7 à 80 % de la population mondiale mais le pourcentage de personnes séropositives pour l'infection toxoplasmique varie d'un pays à l'autre en fonction des groupes ethniques, des habitudes culinaires et des conditions d'hygiène (Tenter *et al.*, 2000). L'incidence de la toxoplasmose dans la population générale est difficile à évaluer car l'infection est le plus souvent asymptomatique et ne fait pas l'objet d'une déclaration obligatoire auprès des services de santé (Porto *et al.*, 2008). Les traitements actuels de la toxoplasmose sont la combinaison de 2,4-diaminopyrimidines (pyriméthamine, triméthoprime) et les sulfamides dont sulfadiazine et sulfaméthoxazole (Gras *et al.*, 2005). En raison du manque de spécificité et de l'efficacité limitée de ces traitements actuels, il y a un besoin impérieux de rechercher de nouveaux composés pour traiter la toxoplasmose. Les produits d'origine naturelle sont une source importante de découverte de nouvelles entités chimiques dont sont issus bons nombres de médicaments.

Ainsi, que ce soit dans le domaine du cancer, des maladies neurodégénératives ou des maladies infectieuses, les substances naturelles sont sollicitées pour la découverte de nouveaux médicaments. Avant les années 1990, le principe actif d'environ 80% de médicaments vendus était isolé de produits d'origine naturelle ou des analogues inspirés de produits naturels (Mariam, 2012). Parmi eux, on peut citer des antibiotiques (la pénicilline, la tétracycline, l'érythromycine), des antiparasitaires (la quinine, l'artémisinine), des immunosuppresseurs (cyclosporine, rapamycines) et des anticancéreux (taxol, doxorubicine). Le principe actif de ces célèbres médicaments a été isolé souvent à partir des plantes, mais aussi à partir des champignons (pénicilline) ou des bactéries (Traoré, 2012). C'est pour cette raison qu'une enquête ethnobotanique a été réalisée auprès des tradipraticiens de santé. Suite à cette enquête *Hunteria eburnea* a été sélectionnée en raison de la fréquence de son utilisation par les tradipraticiens de santé pour traiter et guérir les personnes atteintes du paludisme. Le but de ce travail est d'évaluer *in vitro* l'activité de l'extrait éthanolique 70 % de *Hunteria eburnea*, une plante médicinale de la pharmacopée ivoirienne sur *Toxoplasma gondii* et de déterminer sa cytotoxicité.

## **Materiel et Methodes**

### **Matériel végétal**

Le matériel végétal utilisé est constitué des écorces de tronc de *Hunteria eburnea* récoltées dans le Département d'Issia dont l'identification a été faite par comparaison avec un échantillon de l'herbier du Centre National de Floristique de l'Université Felix Houphouët Boigny (Abidjan Côte d'Ivoire) sous le numéro 15904 ( Forêt du Banco, 01 /06/1981, Aké-Assi L).



**Figure 1** : Rameau feuillé de *Hunteria eburnea*, (Issia, 2015)

### **Matériel biologique**

Le matériel biologique est composé de cellules HFF (Human Foreskin Fibroblasts) qui sont des cellules humaines, de fibroblastes issus du derme et

du parasite *T. gondii* RH-YFP2 (souche RH exprimant deux gènes codant pour la yellow fluorescent protein).

### **Préparation des extraits:**

Les écorces de tige de *Hunteria eburnea* récoltées, ont été découpées, rincées à l'eau et séchées à l'abri du soleil. Ces organes végétaux séchés ont été ensuite réduits en poudre fine grâce à un broyeur électrique IKA-MAG RTC. On obtient une poudre de couleur grise. Les extraits (total aqueux et éthanolique 70%) ont été préparés selon la méthode décrite par (Zirihi *et al.*, 2003).

- **Extrait total aqueux:**

Cent grammes (100 g) de poudre des écorces sont homogénéisés dans 1 litre d'eau distillée dans un Blender (Mixer) de marque Life's Superb (LS-317) pendant trois minutes à la température ambiante. Cette opération est répétée trois fois et l'homogénat obtenu est filtré successivement sur du coton hydrophile puis sur du papier Wattman (3 mm). A l'aide d'une étuve réglée à 50°C, le solvant d'extraction est éliminé. L'évaporat sec récupéré, sous forme de poudre, constitue l'extrait total aqueux (ETA).

- **Extrait éthanolique 70%:**

Cinq grammes (5g) de l'ETA ont été dissouts dans 100 ml d'une solution d'éthanol 70% puis homogénéisés dans un Blender. Après décantation dans une ampoule à décanter, le surnageant recueilli est filtré sur du coton pour le débarrasser de tout résidu et séché à l'étuve (50°C). La poudre obtenue constitue l'extrait éthanolique 70% (EE70%).

### **Criblage phytochimique**

La mise en évidence des groupes phytochimiques tels que les alcaloïdes, les stérole/triterpènes, les tannins et les saponosides a été effectuée par des méthodes qualitatives de coloration selon Harbone (1998).

### **Test de prolifération des souches de *T. gondii***

Les souches de *T. gondii* RH-YFP2 (souche RH exprimant deux gènes codant pour la yellow fluorescent protein), ont été maintenues en culture par passages sur tapis de cellules HFF confluentes dans du milieu D10. Les parasites sont déposés sur des lamelles de verre recouvertes d'un tapis de cellules HFF confluentes. Après 30 secondes de centrifugation à environ 100 g pour accélérer la sédimentation des parasites sur les cellules HFF, les plaques de culture sont incubées à 37 °C pendant 15 min. Le tapis cellulaire est ensuite lavé 3 fois avec du milieu PBS (phosphate buffer saline : NaCl 137 mM ; KCl 2,7 mM ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM) afin d'éliminer les parasites extracellulaires. Le noyau des cellules HFF est coloré à l'Hoechst 33258, ils auront une couleur bleu. Pour le traitement intracellulaire, on réalise une

invasion synchronisée avec environ 100 parasites par lamelle de verre recouvert d'un tapis de cellules HFF confluentes. On remplace le milieu de culture par un milieu D10 supplémenté des extraits de plantes (0 – 1 mg/ml). Après 24h de culture, les cellules parasitées sont fixées. Le nombre de parasites à l'intérieur des vacuoles parasitophores est comptabilisé. Les parasites qui expriment la YFP sont visualisés directement au microscope à épifluorescence (Derouin *et al.*, 1989).

### **Test de cytotoxicité sur les cellules HFF**

L'étude de la toxicité est inspirée de la méthode de Mossman (1983). Pour mesurer la toxicité de l'extrait éthanolique, les cellules HFF ont été ensemencées dans des plaques de 96 puits (CellStar) à raison de 3000 à 5000 cellules par puits dans 100  $\mu$ l de milieu D10. Ces cellules sont maintenues en culture pendant 24 heures (cellules en division) ou 96 heures (cellules confluentes). Par la suite elles ont été exposées pendant 24 heures à différentes concentrations (0 - 1000  $\mu$ g/ml) en extrait de plante solubilisé dans du tampon PBS. Cela a été fait en triplicate. La viabilité a été déterminée à l'aide du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (MTT). L'anneau de tétrazolium qu'il contient est réduit en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules métaboliquement actives, qui précipite et donne une couleur violette. La quantité du précipité formé est proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Dans chaque puits, le MTT est ajouté à une concentration de 500  $\mu$ g/ml et incubé pendant 3h à 37°C. Les cristaux de formazan sont solubilisés dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) 10 mM. La mesure de la densité optique à 544 nm a été faite à l'aide d'un spectrophotomètre Safir (Tecan) ; cette mesure de l'absorbance permettra de déterminer la quantité relative de cellules vivantes et actives métaboliquement. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de viabilité par rapport au contrôle sans extrait de plante. Taux viabilité = (Abs544 nm extrait/ Abs544 nm témoin)  $\times$  100.

### **Résultats**

#### **Activité anti-*Toxoplasma gondii* de l'extrait éthanolique 70 % de *Hunteria eburnea***

Quand on observe l'effet de l'extrait éthanolique 70 % de *Hunteria eburnea* sur la prolifération de *T. gondii* (figure 2), on constate qu'il inhibe la prolifération du parasite, et que cette inhibition est dose dépendante. A la concentration de 0,72 mg/mL, on observe une inhibition de 50% des parasites. En effet, à la plus forte concentration en extrait de plante qui est de 1,2 mg/mL, nous avons un taux d'inhibition d'environ 80%. Au-delà de cette concentration la sensibilité de l'appareil est influencée par la coloration de

l'extrait de plante. La  $CI_{50}$  de l'extrait éthanolique 70 % de *Hunteria eburnea* est estimée à 0,72 mg/mL.

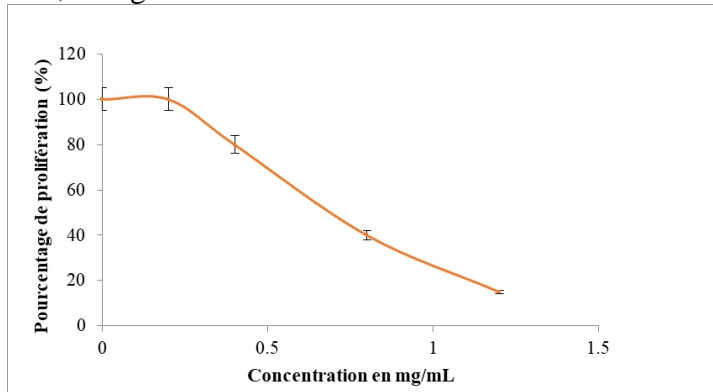


Figure 2 : Effet de l'extrait éthanolique de *Hunteria eburnea* sur la prolifération de *T. Gondii* l'intérieur des fibroblastes humains (HFF).

### Toxicité de l'extrait éthanolique 70 % de *Hunteria eburnea* sur des cellules humaines HFF

L'observation de l'effet des extraits éthanolique de *Hunteria eburnea* sur la viabilité cellulaire nous apprend que quelque soit les conditions des cellules (en arrêt ou en division), *Hunteria eburnea* augmente le taux de viabilité (figure 3). Ce taux est cependant plus faible pour les cellules confluentes que pour les cellules en division. Il y a sûrement dans l'extrait des composés antioxydants qui aide les cellules à améliorer la performance de leur SDH. Les cellules confluentes sont plus âgées et dans des conditions physiologiques qui font qu'elles fonctionnent moins bien que les cellules en division. On peut conclure que *Hunteria eburnea* n'a pas d'effet toxique sur les cellules humaines, au contraire elle améliore le fonctionnement des cellules.

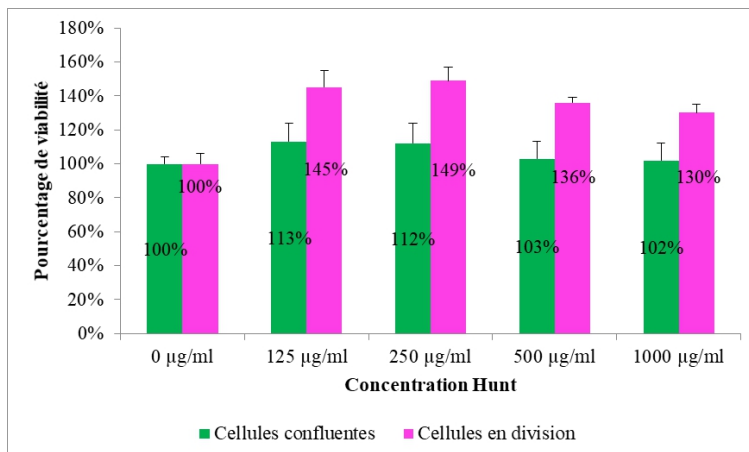


Figure 3 : Effet des différentes concentrations de l'extrait éthanolique 70 % de *Hunteria eburnea* sur la viabilité des cellules humaines HFF.

## Criblage phytochimique

Le Tableau I donne les résultats obtenus lors du criblage phytochimique de l'extrait éthanolique de *Hunteria eburnea*. Les tests effectués révèlent la présence de divers métabolites secondaires dans l'extrait évalué. Dans l'extrait éthanolique 70 %, il a été noté la présence de stérois/triterpènes et des alcaloïdes.

**Tableau I :** Résultats du screening phytochimique de l'extrait éthanolique 70 % de *Hunteria eburnea*.

Molécules recherchées	Echantillon testé (EE 70 %)
Alcaloïdes	+
Polyphénols	-
Tanins galliques	-
Tanins cathéchiques	-
Flavonoïdes	-
Terpènes/stérois	+
Coumarines	-
Saponines	-

+ : présence du groupe chimique

- : absence du groupe chimique

**EE 70 % :** extrait éthanolique 70 %

## Discussion

L'enquête ethnobotanique menée auprès des tradipraticiens de santé de la Région du Haut-Sassandra (Côte d'Ivoire), a révélé que l'écorce de tige de *Hunteria eburnea* est utilisée pour traiter les maladies parasitaires et les dermatoses. Les recettes obtenues de cette plante sont monospécifiques, ce qui constitue un avantage dans le traitement des patients. Selon N'Guessan *et al.* (2008) les associations de plantes mal assorties, sont parfois dangereuses. L'activité *in vitro* de l'extrait éthanolique 70 % de *Hunteria eburnea* effectuée sur *T. gondii* a montré un taux d'inhibition d'environ 80% avec une CI<sub>50</sub> de 0,72 mg/mL. À cet égard, *Hunteria eburnea* pourrait être une source prometteuse de nouveaux médicaments anti-parasitaires, comme c'est le cas pour plusieurs antipaludiques tels que l'artémisinine. Ce résultat pourrait en partie justifier l'utilisation courante de cette plante dans le traitement du paludisme par les tradipraticiens de santé dans la Région du Haut-Sassandra (Côte d'Ivoire). Nos résultats corroborent ceux de Benoit-Vical *et al.* (2000), qui ont aussi montré l'efficacité *Vernonia colorata* sur *T. gondii* mais avec une CI<sub>50</sub> de 16,3 mg/L. Lorsqu'on compare cette valeur de CI<sub>50</sub> à celle obtenue avec l'extrait aqueux de *Vernonia colorata* de Benoit-vical *et al.* (2000) ou la CI<sub>50</sub> est de 0,0163 mg/mL on peut dire que l'activité de l'extrait éthanolique 70 % de *Hunteria eburnea* est moindre. Cette différence de résultat pourrait s'expliquer par le fait que les protocoles expérimentaux sont très différents. Alors que nous observons directement les parasites au microscope à épifluorescence, leur étude réalise un test ELISA pour les détecter. La

précision de ces tests ELISA n'est pas évidente. De plus, pendant que nous incubons les parasites en présence de la drogue durant 24 heures, ces auteurs le font pendant 72 heures. La durée d'incubation ainsi que la méthode de détection du parasite peuvent avoir une influence sur les valeurs de  $CI_{50}$ . Le résultat du test de cytotoxicité effectué sur les cellules HFF a montré que l'extrait éthanolique de *Hunteria eburnea* n'est pas toxique sur les cellules humaines HFF. En effet, selon Bené (2017), lorsque le taux de viabilité d'un extrait est strictement supérieur à 30 % l'extrait est déclaré non cytotoxique. Nos résultats sont conformes à ceux de Camara *et al.* (2016) et de Yapou *et al.* (2016) qui ont aussi montré que les écorces de tige de *Bersama Abyssinica* (Fresen.): Melianthaceae et les feuilles de *Mallotus oppositifolius* (Geiseler) Müller. Arg (Euphorbiaceae) utilisées en milieu traditionnel en Côte d'Ivoire n'avaient pas d'effets cytotoxiques sur les cellules HFF.

## Conclusion

Ce travail a montré le potentiel thérapeutique de *Hunteria eburnea* sur *Toxoplasma gondii*. L'extrait éthanolique 70 % inhibe fortement la croissance *in vitro* de *toxoplasma gondii* à des concentrations qui ne sont pas toxique sur les cultures cellulaires HFF. Aussi le résultat de la présente étude encourage les investigations futures sur cette plante dans l'optique d'isoler la ou les molécules responsables de l'efficacité anti-toxoplasmose, de manière à concevoir un médicament traditionnel amélioré (MTA) pour le traitement de la toxoplasmose.

## Remerciements

Les auteurs remercient le Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes (LAPM) de Grenoble en France, où les études de cytotoxicité ont été réalisées, le Laboratoire de Botanique, où le séchage des plantes récoltées a été effectué et les tradipraticiens de la Région du Haut-Sassandra.

## References:

1. Bené. (2017). Plantes médicinales du Gontougo (district du Zanzan, Côte d'Ivoire) : inventaire, évaluation des activités pharmacologiques de deux plantes et formulation d'une pommade dermatologique à partir de l'extrait hydroalcoolique de *Bersama abyssinica* fresen. (Melianthaceae). Thèse de Univerisité de Botanique, Université Félix Houphouët-Boigny (Côte d'Ivoire), 200 p.
2. Benoit-Vical F., Santillana-Hayat M., Kone-Bamba D., Malli E M., & Derouin F. (2000). Anti-toxoplasma activity of vegetal extracts used in west african traditional medicine. Parasite, 7 : 3-7.



3. Camara D., Bené K., Gnahoue G., Fofié N.B.Y., & Zirihi G.N. (2016). Etude ethnobotanique, évaluation de l'activité antifongique sur *Candida albicans* et de la toxicité sur des cellules HFF de *Bersama Abyssinica* (Fresen.), une plante de la pharmacopée ivoirienne. *European Scientific Journal*, 12 (3) : 171-1885,
4. Derouin F., & Chastang D. (1989). *In vitro* effects of folate inhibitors on *Toxoplasma gondii*. *Antim Agents and Chemoth.*, 33, 1753-1759.
5. Gras L., Wallon M., Pollak A., Cortina-Borja M., Evengard B., Hayde M., Petersen E., & Gilbert R. (2005). Association between prenatal treatment and clinical manifestations of congenital toxoplasmosis in infancy: a cohort study in 13 European centres. *Acta Paediatr*, 94, 1721-31.
6. Harborne J B. (1998). A guide to modern techniques of plant analysis. Springer, 3rd Edn, India (New Delhi), pp 5-32.
7. Mosman T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65 : 55-63.
8. N'Guessan K., Kouadio K., Kouamé N F., Traoré D., & Aké-Assi L (2008). Etude botanique des plantes emménagogues utilisées en médecine traditionnelle par les Abbey et Krobou d'Agboville (Côte-d'Ivoire). *Rev Med Pharm Afr*, 21: 43–60.
9. Porto A. M., Amorim M. M., Coelho I.C., & Santos LC. (2008). [Serologic profile of toxoplasmosis in pregnant women attended at a teaching hospital in Recife]. *Rev Assoc Med Bras*, 54, (3), 242-248.
10. Tenter AM., Heckerroth AR., & Weiss LM. (2000). *Toxoplasma gondii* from animals to humans. *Int J Parasitol*, 30:1217–58.
11. Traoré M. (2012). Synthèses et évaluations de nouveaux composés antipaludiques et antitoxoplasmoses. Thèse Unique en Microbiologie et Parasitologie. Université de Grenoble, (France), 184p.
12. Yapo Y C V., Konkon G., Coulibaly K., Camara D., & Zirihi G. N. (2016). Etude botanique, évaluation de l'activité antifongique sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans* et de la toxicité sur des cellules HFF de feuilles de *Mallotus oppositifolius* (Geiseler) Müller. Arg (Euphorbiaceae). *J. Anim. Plant Sci.* 28 (1), 4330-4339.
13. Zirihi G N., Kra A M., & Guédé-Guina F. (2003). Evaluation de l'activité antifongique de *Microglossa pyrifolia* (Lamarck) O. kuntze (Asteraceae) “ pymi ” sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. *Rev de Méd et de Pharma Afric*, 17 : 11-19.