

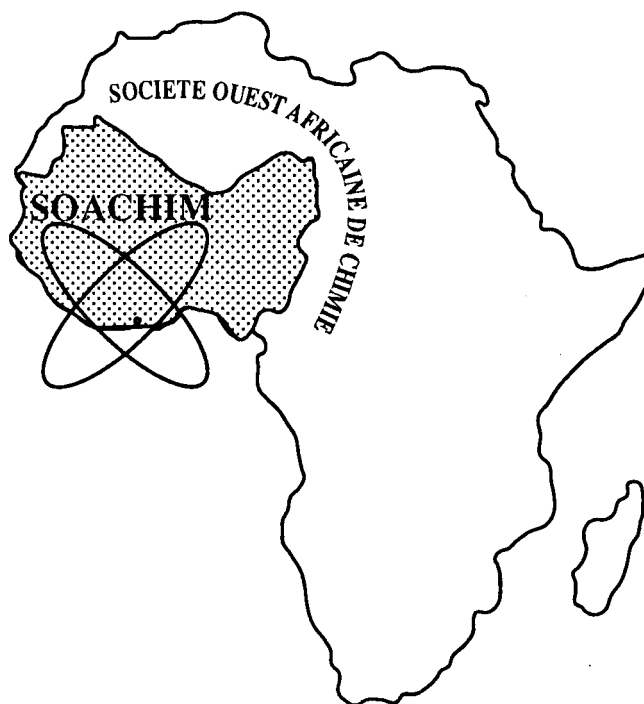
Caractérisation Phytochimique et toxicité aigüe des feuilles de Trema Orientalis (L.) Blume (Cannabaceae)

**Célestine Nkounkou Loumpangou,
Arnaud Wilfrid Etou O., Longin Justin Clair Bonazaba M.,
Béranger Igor Tsati K., Peggy Urielle Bazolo M.,
Jean-Maurille Ouamba, Ange Antoine Abena**

Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie

J. Soc. Ouest-Afr. Chim.(2016), 042 : 52 - 59

21^{ème} Année, Décembre 2016



ISSN 0796-6687

Code Chemical Abstracts : JSOCF2

Cote INIST (CNRS France) : <27680>

Site Web: <http://www.soachim.org>

Caractérisation Phytochimique et Toxicité aigüe des feuilles de *Trema Orientalis* (L.) Blume (Cannabaceae)

Célestine Nkounkou Loumpangou^{1*}, Arnaud Wilfrid Etou O.², Longin Justin Clair Bonazaba M.¹, Béranger Igor Tsati K.¹, Peggy Urielle Bazolo M.¹, Jean-Maurille Ouamba¹, Ange Antoine Abena²

¹. Faculté des Sciences et Techniques, université Marien Ngouabi, Unité de Chimie du Végétal et de la Vie (UC2V), Brazzaville, Congo, B.P. 69, tel. 00242 069102295

². Faculté des Sciences de la Santé, Université Marien Ngouabi, Laboratoire de Biochimie et de Pharmacologie, Brazzaville - Congo B.P. 69, tel. 00242 066837897

(Reçu le 29/08/2016 – Accepté après corrections le 09/02/ 2017)

Résumé : Les plantes médicinales et leurs extraits jouent un rôle essentiel dans le système de médicament à préserver notre santé. Dans le cadre de la valorisation des plantes Aromatiques et Médicinales, nous nous sommes intéressés aux feuilles de *Trema orientalis* (L.) Blume récoltées au Sud de Brazzaville-Congo. Ce travail a été consacré à l'étude de la toxicité aigüe de l'extrait aqueux de *Trema orientalis* (L.) Blume et à la caractérisation phytochimique par tube et par Chromatographie sur Couche Mince (CCM). Les flavonoïdes, coumarines, stérols et triterpènes, tanins (galliques et cathéchiques), sucres réducteurs et Saponosides, ont été mis en évidence dans ces feuilles, la présence des hétérosides cardiotoniques à noyaux cardénolides a été observée par les réactions de Kedde et de Baljet. Par ailleurs le test de toxicité sur l'extrait aqueux des feuilles sèches de *Trema orientalis* à 2000 mg/kg s'est révélé négatif. Il provoque à cette dose un gain pondéral des souris consécutif à une augmentation de la prise alimentaire.

Mots clés : *Trema orientalis*, Phytochimie, caractérisation, hétérosides cardiotoniques, toxicité aigüe

Phytochemical characterization and acute toxicity of *Trema orientalis* (L.) Blume (Cannabaceae) leaves

Abstract: Medicinal plants and their extracts play an essential role in the drug system for preserving our health. In the context of promotion of medicinal and aromatic plants, we focus our interest on *Trema orientalis* (L.) Blume collected in southern Brazzaville, Republic of Congo. This work aimed at studying acute toxicity of aqueous extract of *T. orientalis* (L.) Blume leaves and to deal with phytochemical characterization using tubes and thin layer chromatography. Flavonoïdes, coumarins, sterols and triterpens, tannins (gallic and cathechic), reducing sugars and saponosides were detected in these leaves. The presence of cardiotoniques heterosides with cardenolide kernel were observed through Kedde and Baljet reactions. In addition the test of toxicity on the aqueous extract of the dry sheets of *Trema orientalis* to 2000 mg/kg is negative. It causes with this amount a ponderal profit of the mice consecutive to an increase in the food catch.

Keywords: *Trema orientalis*, phytochemistry, characterization, cardiotonic heterosides, acute toxicity.

* **Auteur Correspondant :** Nkounkou Célestine, E-mail : celestine_ngoma@yahoo.fr

Tél : 0042 0691022/002420555261198

1. Introduction

Historiquement, les plantes ont été une source d'inspiration pour des nouveaux composés médicamenteux. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2008, plus de 80 % des populations africaines ont recours aux remèdes traditionnels qui sont essentiellement basés sur les extraits végétaux pour résoudre leurs problèmes de santé ^[1].

Presque toutes les cultures et les civilisations de l'Antiquité à nos jours dépendent entièrement ou partiellement de la phytothérapie en raison de son efficacité, son accessibilité, sa disponibilité, sa faible toxicité et de son acceptabilité.

La famille des Cannabaceae comprend environ 200 espèces répartis en 8 à 15 genres, *Trema orientalis* est une plante médicinale qui appartient à cette famille. On la trouve fréquemment dans une zone qui s'étend de l'Afrique du Sud jusqu'en Afrique tropicale ainsi que dans les régions chaudes d'Asie.

En République du Congo, *Trema Orientalis* est capable de pousser n'importe où à travers le territoire national ^[2].

Plusieurs travaux montrent l'intérêt de cette plante dans le domaine de la phytothérapie. Au Congo, elle est utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement des maladies telles que : L'asthme, la toux, l'hypertension artérielle, la hernie, l'infertilité féminine, le paludisme ^[3].

Peu d'études phytochimiques ont été réalisées sur les feuilles, nous notons la présence des xanthonés et autres molécules isolées dans les écorces de racines et dans les tiges sur l'espèce du Cameroun, d'Afrique du sud, du Nigéria et de Taiwan ^[4-9].

La large utilisation de cette plante en médecine traditionnelle, nous a motivés à réaliser un screening phytochimique et d'évaluer la toxicité aiguë sur les extraits des feuilles de cette dernière,

afin de mettre en cohérence les prescriptions et les activités potentielles des constituants chimique présents.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal

Les feuilles de *Trema orientalis* (L.) Blume (**figure 1**) ont été récoltées au sud de Brazzaville, dans le jardin botanique de la cité scientifique du Centre d'Etudes des Ressources Végétales (C.E.R.V.E). La plante a été identifiée par le Docteur KANI Emile, botaniste du centre d'Etudes des Ressources Végétales (C.E.R.V.E), un spécimen a été déposé à l'herbier national.

2.2. Matériel animal

Les souris swiss femelles adultes de poids compris entre 20 – 25 g provenant de l'animalerie de la Faculté des Sciences et Techniques ont été utilisées. Ces animaux ont été acclimatés pendant cinq (5) jours à l'Unité de Chimie du Végétal et de la Vie, dans les conditions standards (12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité à la température ambiante de 25 ± 1 °C) avec accès libre à la nourriture et à l'eau de robinet avant l'expérimentation.

2.3. Méthodologie

2.3.1. Caractérisation chimiques

2.3.1.1. Préparation des extraits

L'extraction a été effectuée par épuisement successif du matériel végétal pulvérisé à l'aide d'un broyeur mécanique avec des solvants en fonction de polarité croissante. Cinq solvants ont été utilisés (hexane, chloroforme, acétate d'éthyle, méthanol, et eau).



Feuille

Fruits

Figure 1: L'espèce *Trema orientalis* (L.) Blume

3 g de poudre végétale sont initialement macérés dans 35 mL d'hexane pendant 48 h. Le filtrat obtenu est évaporé à sec pour donner l'extrait hexanique (S₁). Le marc est laissé séché à l'air libre à la température ambiante et subit une deuxième, une troisième, une quatrième et une cinquième extraction respectivement avec 35 mL de chloroforme, 35 mL d'acétate d'éthyle, 35 mL de méthanol et 35 mL d'eau distillée, suivant les mêmes étapes et dans les mêmes conditions. Nous avons obtenu, les extraits chloroformique (S₂), d'acétate d'éthyle (S₃), méthanolique (S₄) et aqueux (S₅) (**figure 2**). Ces extraits serviront à la mise en évidence des métabolites primaires et secondaires contenus dans les feuilles de *Trema orientalis*

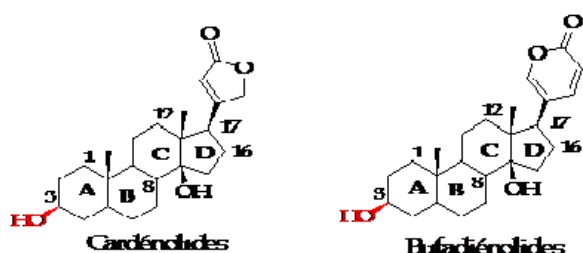


Figure 2 : Structure des Stéroïdes

2.3.1.2. Extraction des hétérosides cardiotoniques

25 g de poudre ont été délipidées par macération dans l'hexane pendant 24 h (2x). Le filtrat obtenu est évaporé à sec à l'air libre. 250 ml du mélange chloroforme/éthanol (v/v 4 :1) ont été ajoutés dans la poudre délipidée, le mélange est macéré pendant 24 h sous agitation magnétique. La phase chloroformique est récupérée puis évaporée à sec [10].

- **Mise en évidence des métabolites primaires et secondaires : les réactions colorées en tube**

Elles sont basées sur les réactions de colorations et des précipitations avec les réactifs spécifiques selon les méthodes classiques décrites par Bouquet [11]. La caractérisation des sucres est faite en utilisant la réaction de Keller-Kiliani, spécifique au 2,6-didésoxyhexoses. De ce fait, l'extrait hydroalcoolique a été dégraissé quatre fois à hexane puis évaporé à sec. L'extrait dégraissé obtenu est ensuite dissout dans 3 mL de FeCl₃ (0.3 mL d'une solution aqueuse à 10 % de FeCl₃ dans 50 mL d'acide acétique), 20 mL de H₂SO₄ concentré sont ensuite versés. La présence d'une coloration bleu-vert indique la présence des sucres [12].

- **Méthode chromatographique sur couche mince (CCM)**

Nous avons utilisés les méthodes décrites par Wagner H. et al. [13].

Les analyses sur couche mince sont réalisées en phase normale sur des plaques en verre et d'aluminium de gel de silice 60 F₂₅₄ (Merck).

La recherche des coumarines, flavonoïdes, des terpènes/stéroïdes a été effectuée sur les extraits S1 à S5.

- **Caractérisation des hétérosides cardiotoniques**

La présence des hétérosides cardiotoniques se différencie par deux noyaux glycostéroïdes (génines) ; les cardénolides et les bufadiénolides (**figure.3**).

- **Mise en évidence des stéroïdes à noyaux cardénolides**

Les noyaux cardénolides sont mis en évidence grâce à deux réactions à savoir, les réactions de Kedde et de Baljet.

L'extrait chloroformique obtenu précédemment a été dissout dans deux tubes à essai contenant 0,4 mL d'Isopropanol dans lesquels sont ajoutés respectivement 1 mL du réactif de Baljet, 1 mL du réactif de Kedde et des gouttes de KOH à 5 % dans l'éthanol. En présence de cardénolides, les colorations suivantes, orangée, rouge violacée sont observées.

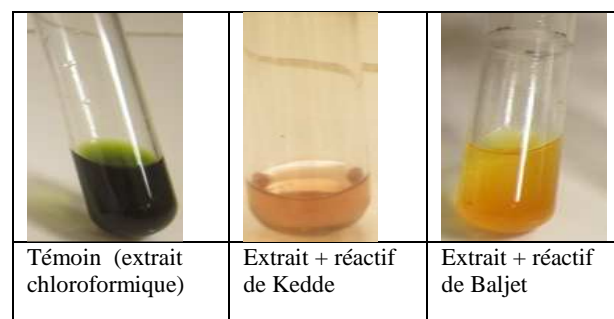


Figure 3 : Caractérisation en tube des hétérosides cardiotoniques à noyaux cardénolides

2.3.2. Etude de la toxicité aigüe de l'extrait aqueux de *Trema orientalis*

La toxicité orale aigüe a été évaluée conformément à la ligne directrice n° 423 de l'OCDE pour les essais des substances chimiques adoptées le 17 décembre 2001. Les souris sont à jeun, mais elles pouvaient boire pendant 3 heures avant l'administration de l'extrait. Une première étape a consisté à administrer à 3 souris l'extrait aqueux des feuilles sèches de *Trema orientalis* à 2000 mg/kg. Le lot témoin, constitué de 3 souris également a reçu de l'eau distillée à 0,5 mL/100g de poids corporel. Les animaux sont observés

individuellement 30 minutes après l'administration des produits, puis à toutes les heures pendant les 4 premières heures. Les observations ont porté sur le ptosis, la piloérection et le comportement général des animaux (convulsion, salivation, diarrhée, activité locomotrice spontanée, réaction au stimulus extérieur). La mortalité par lot est évaluée pendant les 24 premières heures après l'administration des produits. Au cas où il y'a 0 ou 1 mort dans le lot de souris traitées, un lot supplémentaire de 3 souris devrait recevoir à nouveau l'extrait aqueux de *Trema orientalis* à 2000 mg/kg. La consommation alimentaire et hydrique ainsi que le poids corporel des souris ont été mesurés deux fois par semaine pendant 14 jours après l'administration des produits [14].

4. Résultats et discussion

4.1. Caractérisation chimiques

La mise en évidence des composés en tube a révélé la présence de sept (07) grandes familles chimiques : les flavonoïdes, les saponosides, les terpènes/stéroïdes, les tannins (galliques et catéchiques), les sucres les saponosides et les coumarines. Par contre, les quinones et les alcaloïdes ne sont pas présents dans les feuilles de *Trema orientalis*.

Ces résultats sont en accord avec ceux de N'guessan sur l'espèce de la Côte d'Ivoire, sauf que cette dernière contient des alcaloïdes et l'absence des saponosides a été signalée [15,16].

La présence de ces métabolites a été confirmée par la méthode chromatographie sur couche mince, par la présence :

- des taches violettes, bleue et vertes observées au visible après chauffage et des spots fluorescents rouges et jaunes observés à 365 nm à UV, celles-ci caractérisent la présence des terpènes/stéroïdes (chromatogramme n°1 et **tableau I**) [13] ;
- des spots de fluorescences bleu dans les extraits S1 et S2 de rapport frontal respectifs 0,80 ; 0,94 et 0,96 ; 0,86 ; sont attribuables aux coumarines (chromatogramme n°2) [13] ;
- des spots de fluorescence jaune, vert, orange et bleue observés à 365 nm dans les extraits polaires, qui sont attribuables aux flavonoïdes (chromatogramme n°3 et **tableau II**) [13] ;
- des taches roses de rapport frontale 0,48 ; 0,64 et 0,74 dans les extraits polaires (S4 et S5) qui sont attribuables aux sucres (chromatogramme n°4) [13].

La co-élution de ces différents extraits avec les sucres de références : Glucose, ribose, saccharose,

et maltose ne permet pas d'affirmer avec certitude leur présence dans les extraits chromatographiés. A priori, le Ribose, le glucose et le maltose semblent être présents dans les feuilles de l'espèce étudiée. Mais il serait nécessaire de le confirmer par d'autres techniques plus spécifiques.

La présence des métabolites secondaires dans les feuilles de l'espèce *Trema orientalis* (terpène/stéroïdes, flavonoïdes, tanins, sucres, saponosides et coumarines) pourraient justifier l'usage traditionnel des feuilles dans le traitement des maladies telles que : l'hypertension artérielle, le paludisme, la toux et l'infertilité féminine au Congo. Ces résultats sont encourageants car, au paravent les travaux de Bouquet sur les écorces de *Trema orientalis* de Brazzaville Congo n'ont révélé la présence d'aucun groupe chimique [3, 11].

- Caractérisation des hétérosides cardiotoniques

• Mise en évidence des stéroïdes à noyaux cardénolides

La méthode colorimétrique de caractérisation des hétérosides cardiotoniques révèle la présence d'une coloration rouge violacé et assez stable en utilisant le réactif de Kedde et d'une coloration orangé stable par le réactif de Baljet (**figure 3**).

Le point commun de ces réactions est l'emploi d'un dérivé aromatique nitré qui en milieu alcalin (hydroxyde de sodium), s'additionne sur la lactone pour former un dérivé fortement coloré. Ces différentes couleurs observées justifient la présence des composés hétérosides cardiotoniques à noyaux cardénolides dans les feuilles de cette espèce, car ceux-ci sont les plus répandus dans les végétaux par rapport aux composés à noyaux **bufadiénolides** [17]. Par ailleurs, les résultats obtenus par les méthodes en tube et chromatographique témoignent la présence des sucres et des noyaux stéroïdes, ces sucres pourraient donc se fixer au noyau stéroïdique pour former des hétérosides cardiotoniques.

Les hétérosides cardiotoniques forment un groupes de substances homogènes du point de vue structural autant que pharmacologique ; Ce sont donc des médicaments majeurs de l'insuffisance cardiaque, d'origine végétale car ils ont une action sur le travail et le rythme du muscle cardiaque [18, 19].

La présence des composés hétérosides cardiotoniques dans les feuilles pourraient justifier son utilisation par les tradipraticiens de santé de l'Afrique en particulier (Côte- d'Ivoire, Ghana, Togo, Congo ; Nigeria) [3, 20, 21].

Chromatogramme n° 1 : Résultats de la CCM terpènes/stéroïdes des extraits des feuilles de *Trema orientalis*



	
<p>Eluant : Ether de pétrole/ acétate d'éthyle (7 :3)</p> <p>Révélateur : Anisaldéhyde sulfurique</p> <p>Observé à la lumière visible après chauffage</p>	<p>Eluant : Ether de pétrole/ acétate d'éthyle (7 :3)</p> <p>Révélateur : Libermann et Buchard</p> <p>Observé à UV 365nm</p>

Tableau I: Rapport frontal des CCM des terpènes/stéroïdes

révélateurs	anisaldéhyde sulfurique		Libermann et Buchard		Composés supposés
	coloration	Rapport frontal (Rf)	Rapport frontal (Rf)	coloration	
S1	Violet	0,29	0,27	rouge	terpènes/stéroïdes
		0,36	0,41		
		0,63	0,60		
		0,78	0,83		
		0,83			
		0,87			
S2	Violet	0,29	0,27	rouge	terpènes/stéroïdes
	Violet	0,36	0,41		
	Violet	0,48	0,52		
	Violet	0,56	0,60		
	Violet	0,63	0,83		
	Vert	0,72			
	Violet	0,78			
	Violet	0,83			
	Violet	0,87			
	0,95				
S3	Violet	0,29	0,41	rouge	
		0,48	0,60		
		0,56	0,83		
		0,63			
		0,72			
		0,78			
		0,83			
		0,87			
		0,87			
		0,95			


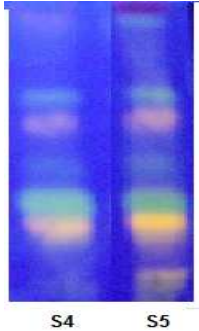
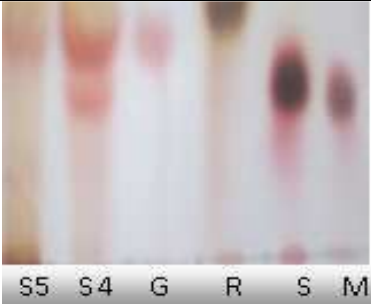
<p>Chromatogramme n° 2 : Résultats de la CCM des coumarines des extraits apolaires des feuilles de <i>Trema orientalis</i></p> 	<p>Chromatogramme n° 3 : Résultats de la CCM des flavonoïdes des extraits polaires des feuilles de <i>Trema orientalis</i></p> 
<p>Eluant : Toluène/éther éthylique/acide acétique glacial (1 :1 :1)</p> <p>Révélateur : KOH à 10%, observé à UV à 365nm</p>	<p>Eluant : acétate d'éthyle/ acide formique/ eau (8 :1 :1)</p> <p>Révélateur : réactif de Neu, observé à UV à 365</p>

Tableau II: Rapport frontal des CCM des flavonoïdes

Révélateur Neu			Composés supposés
extrait	coloration	Rapport frontal(Rf)	
S4	Orange	0,30	flavonoïdes
	Vert	0,36	
	Orange	0,50	
	Vert	0,63	
	vert	0,81	
S5	Orange	0,11	flavonoïdes
	Orange	0,30	
	Vert	0,36	
	Orange	0,50	
	Vert	0,63	
	Vert	0,81	
	Vert	0,95	
	bleu	0,98	

Chromatogramme n° 4 : Résultats de la CCM des sucres des extraits des feuilles de *Trema orientalis*



Eluant : Chloroforme/acide acétique/ eau (6/ 7/ 1) ;
Révélateur : Thymol sulfurique, obs. visible G : Glucose ; R : Ribose ; S : Saccharose ; M : Maltose

4.2. Toxicité aigüe de l'extrait aqueux de *Trema orientalis*

Le test de toxicité aigüe montre que l'extrait aqueux des feuilles sèches de *Trema orientalis* à 2000 mg/kg ne modifie pas le comportement général des souris et ne provoque pas la mort des souris dans les 24 h qui suivent l'administration de l'extrait. D'après le Système de classification Globalement Harmonisé (SGH) de l'OCDE, cet extrait est classé dans la catégorie 5 avec une $DL_{50} > 2000 - 5000$ mg/kg. Cet extrait pourrait de ce fait être un bon matériel pour les études

pharmacologiques. Les résultats des effets de *T. orientalis* sur le poids corporel, les prises alimentaire et hydrique montrent que les souris traitées avec cet extrait (2000 mg/kg) gagnent plus de poids que les souris témoins (**figure 4**) et, consomment plus d'aliments au 7^{ème} jour que les témoins (**figure 5**). Par contre, la prise hydrique est significative le 3^{ème} et 9^{ème} jour (**figure 6**). L'augmentation du poids corporel des animaux pourrait être attribuée à l'importante prise alimentaire due à l'extrait aqueux de *T. orientalis* qui pourrait stimuler l'appétit des souris. Une étude antérieure a montré cette corrélation ^[22].

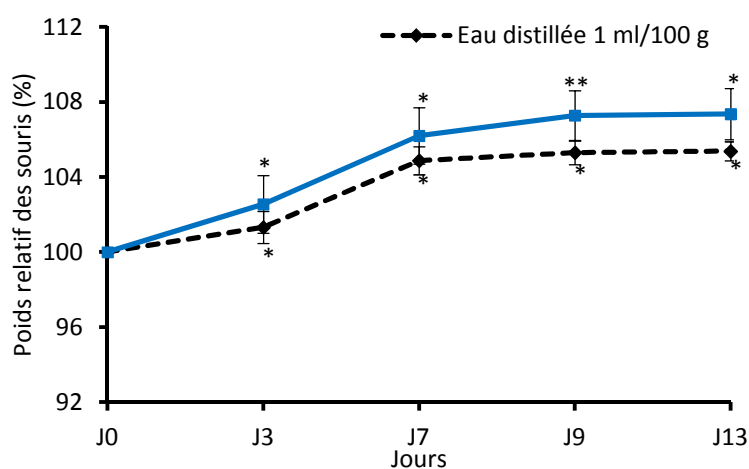


Figure 4 : Effet de l'extrait aqueux de *Trema orientalis* sur l'évolution pondérale des souris. Chaque valeur représente la moyenne \pm ESM ; avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; différence significative par rapport au lot témoin eau distillée ; $n = 3$ souris.

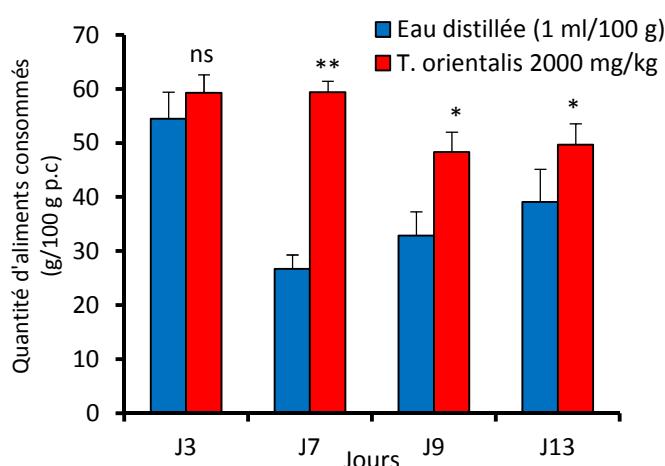


Figure 5 : Effet de l'extrait aqueux de *Trema orientalis* sur la prise alimentaire. Chaque valeur représente la moyenne \pm ESM avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; différence significative par rapport au lot témoin eau distillée ; ns : différence non significative ; $n = 3$ souris

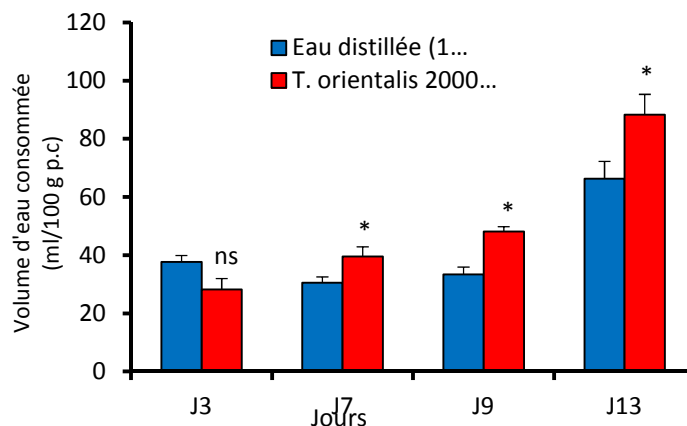


Figure 6: Effet de l'extrait aqueux de *Trema orientalis* sur la prise hydrique. Chaque valeur représente la moyenne \pm ESM avec * $p < 0,05$; différence significative par rapport au lot témoin eau distillée ; ns différence non significative ; n = 3 souris

5. Conclusion

Le screening phytochimique réalisé sur les cinq extraits apolaires et polaires a permis de mettre en évidence, des tanins galliques et catéchiques, des stérols et triterpènes, des coumarines ; des flavonoïdes, des sucres réducteurs, des saponosides par des réactions en tubes d'une part. D'autre part la chromatographie sur couche mince a confirmé la présence des flavonoïdes, des stérols et triterpènes, des coumarines et des sucres.

Les feuilles de *Trema orientalis* ne renferment pas d'alcaloïdes, de protéines et de quinones. Le screening phytochimique réalisé sur les extraits des feuilles a prouvé par ailleurs qu'elles contiennent des hétérosides cardiotoniques.

L'extrait aqueux des feuilles sèches de *Trema orientalis* à 2000 mg/kg n'est pas toxique. Il provoque à cette dose un gain pondéral des souris consécutif à une augmentation de la prise alimentaire. La présente étude permettra ainsi de comprendre la large utilisation en médecine traditionnelle de cette plante dont les propriétés pharmacologiques seraient en partie liées à sa richesse en principes actifs que renferment ses organes et qui nécessite d'être approfondies dans nos travaux avenir.

Références bibliographique

[1] Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005. 2002, Genève
 [2] Bouquet, A. *Plantes médicinales du Congo (Brazzaville)*. O.R.S.T.O.M. 1972, Paris.

[3] Adjanohoun E.J. Ahyla Assi L., Baniakwa J., Chibon P., Médecine traditionnelle et pharmacopée : contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République populaire du Congo. A.C.C.T. 1988, paris.

[4] Lauren Saint Luc. Systématique du genre *Trema* en Afrique occidentale. Thèse, Faculté des sciences, Département de Biologie, Université d'Ottawa 1998, Ontario.

[5] Nougoué D.T., Cartier G., Dijoux-Franca M.G., Tsamo E., Mariotte A.-M. Xanthones and Other Constituents of *Trema orientalis*. *Pharmaceutical Biology* (2001) 39 (3), 202–205.

[6] Pamisha pillay. Antiplasmodial neolignans from *trema* o-identification, synthesis and analogue generation, these. Faculty of Science, 2011, University of Cape Town.

[7] Ogunkoya, L., Olubajo, O.O., Sondha, D.S. A new triterpenoid alcohol from *Trema orientalis*. *Phytochemistry* (1977)16, 1606-1608.

[8] Kuo, W., Huang, Y., Wang, S., Ni, C., Shien, B., Chen, C. Chemical Constituents of *Trema orientalis*. *Journal of Chinese Medicine* (2007) 18, 27-36.

[9] Tchamo, D.N., Cartier, G., Dijoux-Franca, M.G., Tsamo, E., Mariotte, A.M. Xanthones and other constituents of *Trema orientalis*. *Pharmaceutical Biology* (2001) 39, 202-205.

[10] Mbodj. N. A. *Etude de l'activité antidiabétique des extraits acétoniques, méthanoliques et hexaniques de Vernonia colorata composées des wistar*. Thèse de doctorat. Faculté de médecine, pharmacie et d'Odontologie, Université Cheikh anta Diop. Dakar, 2003, Sénégal.

[11] Bouquet A. *Féticheurs et Médecine traditionnelle du Congo (Brazzaville)*. O.R.S.T.O.M. 1969, Paris.

[12] Houta O., Chouaeb H., Neffati M., Amri H. Criblage chimique préliminaire des protéines et caroténoïdes présents dans un *Crithmum maritimum* cultivé en Tunisie. *Journal de la société chimique de Tunisie* (2012) 14, 77-82.

[13] Wagner H., Bladt S. *Plant drug analysis*. 2nd édition 1996, Berlin.

- [14] OCDE. Ligne directrice de l'OECD pour les essais de produits chimiques : toxicité orale aiguë méthode par classe de toxicité aiguë ; 2001.
- [15] N'guessan K., Kadja B., Zirih G., Aké A., Dossahoua T. Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays de Krobou. *Sciences et Nature* (2000) 6 (1), 1-15.
- [16] Gbadamosi, I.T., Moody, J.O., Yekini, A.O. Nutritional Composition of Ten Ethnobotanicals Used for the Treatment of Anemia in Southwest Nigeria, *European Journal of Medicinal Plants* (2012) 2(2), 140-150.
- [17] Bruneton J., *Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales*. 3^e édition Tec & Doc (Lavoisier), 2005, Paris.
- [18] Vercauten J. Plan, formules et illustrations du cours de pharmacognosie 2^{ème} cycle des études de Pharmacie. Université Montpellier I, Laboratoire de Pharmacognosie 2011-2012, France.
- [19] Boutayna R. F. Analyse, classification et caractérisation de résines d'origine végétale par chromatographie et spectrométrie de masse. Thèse de chimie analytique, Université d'Orléans, (2009), 31p France.
- [20] Diafouka A. A., Lejoly J. *Plantes hypotensives utilisées en médecine traditionnelle à Brazzaville (Congo)*, Actes du 2^e Colloque Européen d'Ethnopharmacologie et de la 11^e Conférence internationale d'Ethnomédecine, Heidelberg, Médicament et Aliment : l'approche Ethnopharmacologique (1993). France.
- [21] Fézan H. T. B., Guy M. I., Kohué C.C. N'G., Clejesson H.B. M. Études de quelques plantes thérapeutiques utilisées dans le traitement de l'hypertension artérielle et du diabète : deux maladies émergentes en Côte d'Ivoire. *Sciences et Nature* (2008) 5 (1), 39 - 48.
- [22] Etou Ossibi A.W., Dimo T., Elion Itou R.D.G., Nsondé Ntandou G.F., Nzonzi J., Bilanda D.C., Ouamba J.M., Abena A. A. Effets de l'extrait aqueux de *Lippiumultiflora* Moldenke sur l'hypertension artérielle induite par le DOCA-sel chez le rat ; *Phytothérapie* (2012) 10 (6) : 363 – 368.