

**EVALUATION *IN VIVO* ET *IN VITRO* DE LA TOXICITE
DES EXTRAITS AQUEUX D' ECORCES DE TIGE ET DE RACINES
DE *Mitragyna inermis* (Willd).O.Ktz (RUBIACEAE)**

OUEDRAOGO Y ^{1,2} NACOLMA O.³ GUISSOU I.P.^{1,3} GUEDE GUINA F⁴

¹ Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS/CNRST) BP 7192 Ouagadougou.

² Faculté des Sciences et Techniques, Université de Ouagadougou BP 7021.

³ Faculté des Sciences de la Santé, Université de Ouagadougou.

⁴ Faculté des Sciences et Techniques, Université de Cocody, RCI.

Résumé.

Mitragyna inermis est une espèce de la famille des Rubiaceae, utilisée en tradithérapie dans diverses pathologies : troubles gastro-intestinaux, maladies infectieuses et parasitaires, fièvres et adynamies, troubles gynéco-obstétricaux, affections rhumatismales et ostéo-articulaires. La plante est également utilisée pour ses propriétés stimulantes et fébrifuges (8).

Des travaux antérieurs ont mis en évidence l'activité de la plante comme agent de protection de l'organisme : activité stimulante des éléments biologiques supportant l'immunité de l'organisme : globules blancs, lymphocytes, plaquettes, protéines totales, alpha-1, alpha-2, bêta et gamma- globulines (Ouedraogo Y., fév. 1996 Ouagadougou). L'intérêt de la plante exige qu'une approche de sa toxicité puisse être entreprise en vue de son adaptation en tradithérapie.

La présente étude consiste d'une part, à mettre en évidence les principaux groupes chimiques de la plante, d'autre part, à évaluer l'activité hémolytique des saponosides contenues dans les extraits aqueux d'écorces de racines et de tige de *Mitragyna inermis*, de même que la DL50 des extraits chez la souris par voie intrapéritonéale (10).

Les résultats obtenus mettent en évidence une hétérogénéité de groupes chimiques : alcaloïdes, composés réducteurs, anthraquinones, stérols et triterpènes, tanins et polyphénols, saponosides. Ils ont également permis de déterminer l'indice hémolytique des saponosides présents dans les extraits d'écorces de tiges et de racines de *Mitragyna inermis*.

- un indice hémolytique de 13125 pour les extraits de tige
- un indice hémolytique de 9455 pour les extraits de racines. Ces indices permettent de classer les extraits dans la catégorie des substances pouvant présenter des effets hémolytiques en cas d'administration à fortes doses et dans le cas de non intégrité des muqueuses digestives.

De même la DL50 (800mg /Kg de poids corporel) permet de classer les extraits dans la catégorie des substances faiblement toxiques.

MOTS CLES : *Mitragyna inermis*, saponosides, indice hémolytique, indice de mousse, Pharmacopée Traditionnelle

INTRODUCTION

Toute substance biologiquement active est susceptible, à fortes doses ou à faibles doses et pour une administration prolongée de produire des effets indésirables, voire nocifs. C'est le cas particulier des produits végétaux riches en saponosides. Leurs propriétés principales sont constituées d'effets antifongiques et antimycosiques, anti-inflammatoires et anti-helminthiques.

Les saponosides présents dans les extraits d'écorces de tiges et de racines de *Mitragyna inermis* mis en évidence par le screening phytochimique possèdent d'une part des propriétés physiques caractérisées par un pouvoir aphrogène ou pouvoir moussant (indice de mousse), d'autre part par des propriétés physiologiques marquées s'exprimant par un indice hémolytique.

Ces composés chimiques pouvant conférer à la plante des propriétés toxiques à fortes doses par voie générale, il apparaît indispensable de procéder à la détermination de leur pouvoir hémolytique pour une adaptation rationnelle de la tradithérapie surtout pour les modes d'administration et les précautions à observer en cas de non intégrité au niveau des muqueuses digestives (bouche, estomac, intestin, etc.). De même l'évaluation de la toxicité générale aiguë de l'extrait est nécessaire pour situer les limites de tolérance de la plante. Elle a été effectuée par voie intrapéritonéale chez la souris.

Un criblage phytochimique des extraits a été réalisé. Des travaux précédents ont mis en évidence l'activité stimulante de *Mitragyna inermis* sur

des éléments biologiques, supports du système de défense immunitaire de l'organisme chez le lapin (globules blancs, lymphocytes, plaquettes, protéines totales, globulines) (Ouédraogo Y., DEA de Biochimie 1996).

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Objectif général :

Evaluer in vivo et in vitro la toxicité de *Mitragyna inermis*.

Objectifs spécifiques :

1°) Mesurer la toxicité aiguë des extraits aqueux d'écorces de racines de *Mitragyna inermis* par la DL50 chez la souris ;

2°) Tester l'activité hémolytique in vitro d'extraits aqueux d'écorces de racines et de tiges de *Mitragyna inermis*.

MATERIEL ET METHODES

A . Matériel

1) Matériel pour le criblage phytochimique

- Ecorces de tige et de racines de *Mitragyna inermis* récoltées sur le lieu habituel de croissance de la plante (bas-fonds, cours d'eau). La récolte s'est effectuée à 7 Km de Ouagadougou (axe Ouaga-Fada), séchées et broyées finement dans les conditions de température du laboratoire

- Appareil à extraction type Soxhlet ;

- Solvants, réactifs divers pour l'étude phytochimique classique.

2) Matériel pour la détermination de la DL50

a) Matériel animal

Souris Ico (NMRI Han) de 20 à 30 g. provenant du Centre International de Recherche Développement sur l'Élevage en Zone Sub-humide (CIRDES) sis à Bobo-Dioulasso au Burkina Faso.

b) Matériel végétal

Lyophilisat aqueux d'écorces de racines de *Mitragyna inermis*.

3) Matériel pour les tests d'hémolyse

a) Matériel animal

Sang de bœuf prélevé à l'abattoir frigorifique de Ouagadougou, recueilli dans un récipient stérile contenant du citrate de sodium à raison d'un volume pour 4 volumes de sang. Le culot globulaire est obtenu par 4 lavages avec de l'eau physiologique

Sang humain : 1ml de sang dissout dans 25ml de solution physiologique.

b) Le matériel végétal

Les lyophilisats sont obtenus à partir de la macération aqueuse : 100 g de poudre végétale sont mis en contact avec 1000 ml d'eau distillée. Après une agitation magnétique continue pendant 24 heures, le mélange est filtré au coton hydrophile. Le filtrat est ensuite centrifugé 10 mn selon 2 000 t/mn. Le surnageant est introduit dans un lyophilisateur jusqu'à obtention d'un lyophilisat parfaitement sec qui est conservé dans un dessiccateur. Nous disposons ainsi de deux lyophilisats :

- un lyophilisat aqueux d'écorces de tige de *Mitragyna inermis* à 0,1 g/ml
- un lyophilisat aqueux d'écorces de racine de *Mitragyna inermis* à 0,1 g/ml

4) Réactifs pour les tests d'hémolyse

- Solution 1 : phosphate disodique : 119,31g/l
- Solution 2 : phosphate monopotassique : 45,36 g/l
- Tampon phosphate (PH 7,5 – 0,33 M obtenue par le mélange de :
 - 85 ml de solution I
 - 15 ml de solution II
- Eau physiologique (NaCl 0,9%) : 9g de NaCl dans 1 000 ml eau distillée
- Solution saline tamponnée phosphate obtenue par le mélange de :
 - Solution tampon phosphate PH 7,5 : 1 ml
 - Solution de NaCl à 0,9% : 29 ml
- Saponine (étalon) à 0,05 g/ml.

.B - Méthode d'étude

1) Le criblage phytochimique

Il consiste à caractériser ou identifier les principaux groupes chimiques d'une plante à partir d'une méthode d'extraction convenable.

Le protocole utilisé pour les extractions et caractérisations est celui préconisé par CIULEI I.(1982). Pour ce faire, des extraits organiques, alcooliques et aqueux ont été réalisés en vue de l'identification et de la caractérisation des groupes chimiques par les méthodes courantes (réaction de Mayer et de Dragendorff pour les alcaloïdes, réaction de Liebermann pour les stéroïdes, réaction de Shibata pour les flavonoïdes).

a) Extrait chloroformique :

25g d'écorces de racines puis de tiges sont épuisées en premier lieu par le chloroforme dans un appareil à extraction (type Soxhlet) en continu pendant 24 heures. Les drogues soumises à extraction sont gardées et épuisées successivement par l'éthanol à 96° et par l'eau distillée.

Les principaux groupes chimiques extractibles en milieu chloroformique sont recherchés et identifiés par des réactions de caractérisation. Ce sont :

- les matières grasses et les acides gras à haut poids moléculaire (lipides) ;
- les stérols, triterpènes et stéroïdes ;
- les alcaloïdes bases ;
- les aglycones flavoniques (flavonols, flavones, flavanes, isoflavones, etc) ;
- les caroténoïdes (carotènes et xanthophylles) ou tétraterpènes ;
- les anthraquinones et les coumarines ;

b) Extrait alcoolique

La drogue épuisée au chloroforme est séchée et reprise dans 150ml d'éthanol à 96°. Elle est épuisée au Bain-Marie bouillant pendant 2-3 heures. Après épuisement total, l'extrait alcoolique obtenu est concentré jusqu'à 80ml. L'extrait ainsi obtenu, susceptible de renfermer des groupes de composés polaires solubles dans l'alcool, est divisé en deux parties :

- l'une est hydrolysée par la potasse alcoolique (KOH) 3 M à chaud. Dans cette fraction seront recherchés et caractérisés les anthraquinones, les

coumarines, les stérols et les triterpènes, les saponines, les flavonoïdes, les leucoanthocyanes et les anthocyanes.

- Dans la partie non hydrolysée seront recherchés les tanins et polyphénols, les hétérosides et les alcaloïdes quaternaires

c) Extrait aqueux

La drogue épuisée par le chloroforme puis par l'éthanol est séchée et reprise par l'eau distillée à chaud. Après filtration, le soluté obtenu renferme les groupes chimiques les plus polaires qui sont entre autres les composés réducteurs, les saponosides, les tanins. L'épuisement par l'éthanol étant total, on ne retrouve plus les mêmes composés chimiques dans l'extrait aqueux.

2 - Etude de la toxicité générale aiguë

Nous avons utilisé 6 lots de 18 souris dont un lot témoin. Chaque animal est identifié par un numéro et une marque différente. Les animaux sont préalablement mis à jeûn pendant 24 h, ensuite le poids de chaque souris est pris, et ils reçoivent une dose donnée par lot. La voie d'administration est la voie intrapéritonéale.(26)

La méthode de calcul de la DL50 et de ses limites de confiance est celle décrite en 1944 par Miller et Tainter. Elle consiste à porter directement sur du papier Log. Probit, le pourcentage de mortalité en fonction du log de la dose.

L'écart-type de la DL50 est donné par :

$$S = \frac{\text{dose létale } 84\% - \text{dose létale } 16\%}{2}$$

L'écart à la moyenne de la DL50 est estimé par la formule :

$$\text{Ecart à la moyenne} = \frac{2S}{2N'}$$

où N' est le nombre total d'animaux dans les lots ayant donné des pourcentages de mortalité entre 7 et 93%...

La détermination de la DL50 permettra de situer la toxicité de l'extrait sur l'échelle de valeur de toxicité des substances chimiques proposé en 1980 par (Hodge A.C. et Sterner J.H.).

On peut également utiliser un logiciel informatisé à cet effet.

3 - Etude de l'effet hémolytique de l'extrait végétal

Les saponosides (ou saponines) présents dans les extraits d'écorces de tiges et de racines de *Mitragyna inermis* possèdent d'une part, des propriétés physiques caractérisées par un pouvoir aphrogène ou pouvoir moussant (indice de mousse), d'autre part par des propriétés physiologiques s'exprimant par un indice hémolytique.

Ces composés chimiques pouvant conférer à la plante des propriétés toxiques à fortes doses ou par voie générale, il apparaît indispensable de procéder à la détermination de leur pouvoir hémolytique pour une adaptation rationnelle à la tradithérapie, surtout pour les modes d'administration et les précautions à observer en cas de non intégrité au niveau des muqueuses digestives (bouche, estomac, intestin, etc.).

a) L'indice hémolytique de l'extrait

(Protocole de Paris et Moyse(1965))

Dans une série de 12 tubes à essai contenant des volumes égaux de culot globulaire (0,5 ml) on ajoute des quantités croissantes de solution de saponines à 0,05 g/ml et 2 ml de solution tampon pH 7,5. L'ensemble est laissé au repos pendant 24 h. L'apparition d'un liquide rouge limpide indique une hémolyse totale.

La même opération est effectuée parallèlement en remplaçant la solution de saponines par les extraits aqueux de tige et de racine de *Mitragyna inermis*.

L'indice hémolytique est donné par la relation :

$$\frac{a \times S}{b}$$

S = 30.000 = indice hémolytique de la saponine

a = quantité de saponine en gramme provoquant une hémolyse totale.

b = quantité en gramme de drogue provoquant une hémolyse totale.

RESULTATS ET DISCUSSION

1) Résultats du criblage phytochimique. Les principaux groupes chimiques identifiés selon les méthodes classiques de caractérisation et d'identification sont consignés dans le tableau ci-après :

Tableau II : Résultats du criblage phytochimique

EXTRAITS	RESULTATS DES TESTS	
	écorces de racines	écorces de tiges
<u>I - CHLOROFORMIQUE</u>		
* Matières grasses et acides gras à haut poids moléculaire	++	++
* Stéroïls, triterpènes et stéroïdes	++	++
* Alcaloïdes bases	++	++
* Anthraquinones	++	++
* Coumarines	±	±
* Caroténoïdes et xanthophylles	++	++
<u>II - ALCOOLIQUE NON HYDROLYSE</u>		
* Tanins et Polyphénols	++	++
* Composés réducteurs	++	++
* Alcaloïdes sels	++	++
<u>III - ALCOOLIQUE HYDROLYSE</u>		
* Coumarines	+	+
* Anthracénosides	++	++
* Saponines stéroïdiques et/ou triterpéniques	++	++
* Leucoanthocyanes	++	++
* Anthocyanes	++	++
<u>IV - AQUEUX</u>		
* Tanins	++	++
* composés réducteurs	++	++
* Indice de mousse	+++	+++
* Amidon	++	++

L'ensemble des groupes chimiques ainsi identifiés, ayant des propriétés pharmacologiques diverses pourrait justifier l'utilisation multiple de *Mitragyna inermis* en tradithérapeutique. La présence de saponosides est illustrée par un indice de mousse très marqué.

2) Détermination de la toxicité générale aiguë

a). Toxicité aiguë (DL50)

La mortalité due à la toxicité aiguë du macéré aqueux de la plante est présentée au tableau ci-après

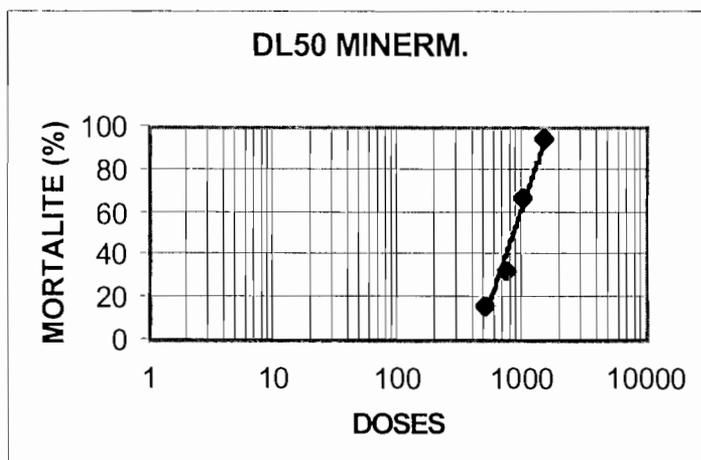
Tableau III *Résultats de l'étude de la toxicité aiguë du macéré aqueux en 72H. (toxicité retardée)*

	Nombre de souris	Nombre de morts	% de morts
Mg/kg			
300	18	0	0
500	18	3	17
750	18	6	33
1000	18	12	67
1500	18	17	93
2000	18	18	100

Les données permettent de construire la courbe correspondante. Celle-ci donne des valeurs de DL1, DL50 et DL99 respectivement de 304 , 810, et 2160 mg /Kg. de poids corporel.

Les caractéristiques de la toxicité aiguë du produit testé sont exprimées à la figure ci-après. L'égalité des rapports DL50/DL1 et DL99/DL50 confirme la validité de la droite de mortalité cumulée selon la méthode de Litchfield et Wilcoxon.

Courbe représentative de la toxicité générale aigue du macéré aqueux



Les caractéristiques de la toxicité aiguë du produit sont exprimées à la figure ci-contre. L'égalité des rapports DL50/DL1 et DL99/DL50 confirme la validité de la droite de mortalité cumulée selon la méthode de Litchfield et Wilcoxon.

DL50 = 810,7468 mg/kg (668,1495 ; 983,7772)

DL1 = 304,1783 mg/kg

DL99 = 2160,938 = 2160,938 mg/kg

DL99 = 2,66 et DL50 = 2,66

DL50 DL1

La valeur de la DL50 permet de classer la plante dans la catégorie des produits faiblement toxiques (classe de toxicité de Hodge et Sterner).

b). Classe de toxicité.

La valeur absolue de la DL50 indique qu'il s'agit d'un produit de faible toxicité.

. **Tableau IV** : Classe de toxicité de macéré aqueux étudié selon l'échelle de toxicité de Hodge et Sterner (1943)

Classe de toxicité *	DL50 (rat, souris : mg/kg*	Doses pour un enfant de 12,5 kg*
Extrêmement toxique	< 1	8 mg (le fait d'en goûter)
Très toxique	1 à 50	500 mg (le fait d'en avaler une petite gorgée)
Moyennement toxique	50 à 500	5 g (le fait d'en avaler une cuillerée à café)
Faiblement toxique	500 à 5 000	60 g (le fait d'en consommer un coquetier)
Pratiquement non toxique	5 000 à 15 000	180 g
Relativement sans danger	> 15 000	> 180 g

3) Détermination de l'activité hémolytique des extraits aqueux de tige et de racines de *Mitragyna inermis*.

a) Test d'hémolyse en présence de témoin

Le surnageant obtenu après centrifugation nous donne les résultats suivants :

- Dans le témoin-blanc, on observe un surnageant limpide avec un culot globulaire au fond du tube ;

- Dans le témoin de référence, on obtient un surnageant rose caractéristique d'une hémolyse en présence de saponines :

- Dans les tubes essais, on obtient également un surnageant rose pour les concentrations à 100 mg, 75 mg et 60 mg/ml. A 50 mg/ml par contre le surnageant est plus ou moins pâle avec un culot globulaire au fond du tube.

Les résultats ainsi obtenus confirment l'activité hémolytique de l'extrait.

b) Test d'hémolyse selon le protocole préconisé par Paris et Moise

Tableau V : Activité hémolytique de la solution étalon de saponine

	1	2	3	4	7	12
Saponine (ml)	0,5	1	1,5	2	3,5	6
Culot globulaire (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Tampon PH 7,5 (ml)	2	2	2	2	2	2
Quantité de saponine (g)	0,025	0,05	0,075	0,1	0,175	0,3

Tableau VI : Activité hémolytique de l'extrait aqueux d'écorces de tige de *Mitragyna inermis*

	1	2	3	4	8	12
Extrait écorce tige (ml)	0,5	1	1,5	2	3,5	6
Culot globulaire (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Tampon PH 7,5 (ml)	2	2	2	2	2	2
Quantité de drogue (g)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,4	0,6

Tableau VII : Activité hémolytique de l'extrait aqueux d'écorces de racines de *Mitragyna Inermis*

	1	2	3	11	12
Extrait écorce racine (ml)	0,5	1	1,5	5,5	6
Culot globulaire (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Tampon pH 7,5 (ml)	2	2	2	2	2
Quantité de drogue (g)	0,05	0,1	0,15	0,55	0,6

Où 0,175, 0,4 et 0,55 g représentent respectivement les quantités de saponines, d'extrait d'écorces de tige et de racine provoquant une hémolyse totale. Ces saponosides sont contenues dans 6 ml du milieu réactionnel (tube 7 de l'étalon, tube 8 de l'extrait d'écorces de tige), et dans 8ml de l'extrait d'écorces de racines (tube 11).

L'indice hémolytique des extraits d'écorces de tige et d'extrait d'écorces de racines est de :

$$\frac{30\ 000 \times 0,175}{0,4} = 13\ 125 \text{ pour la tige}$$

$$\text{et de } \frac{30\ 000 \times 0,175}{0,55} = 9\ 545 \text{ pour la racine}$$

La concentration en saponines (étalon) est de 0,05g/ml , ce qui correspond à un indice hémolytique de 30000. Les concentrations en saponines dans les extraits seront respectivement :

$$\text{Pour la tige : } \frac{0,05 \times 0,175}{0,4} = \mathbf{21\text{mg/l}}$$

$$\text{Pour la racine : } \frac{0,05 \times 0,175}{0,55} = \mathbf{15\text{mg/l}}$$

Dans les conditions opératoires : 0,175g de saponine contenus dans 6ml provoque une hémolyse totale, soit $\frac{1 \times 0,175}{6} = \mathbf{27\text{mg/ml}}$

Les extraits d'écorces de tige et d'écorces de racine entraînent une hémolyse totale respectivement à partir de :

$$\frac{1 \times 0,4}{6} = \mathbf{66\text{mg/ml}}$$

$$\frac{1 \times 0,55}{8} = \mathbf{68\text{mg/ml}}$$

Les extraits aqueux d'écorce de tige et de racines contiennent respectivement 21mg et 15mg/l de saponines ce qui permet de leur conférer un pouvoir hémolytique. Une hémolyse totale se produit pour une concentration équivalente en substances actives des écorces de tiges et des racines..

Comparativement aux saponines ayant servi d'étalon, il faut un peu moins de 3 fois plus (en termes de concentration) d'extrait d'écorces de racines ou de tige.

On admet généralement que :

- les propriétés hémolytiques sont attribuables à leur interaction avec les stérols de la membrane érythrocytaire ;
- l'interaction induit une augmentation de la perméabilité membranaire et un mouvement des ions : entrée de Na⁺ et H₂O , sortie de K⁺, la membrane

éclate, permettant ainsi la sortie de l'hémoglobine (MAJESTER-SAVORNIN 1991).

On peut aussi dire que les saponosides assure la défense du végétal contre les attaques microbiennes ou fongiques. L'activité antifongique ayant été bien établie aussi bien à l'égard d'espèces phytopathogènes qu'à l'encontre de divers candida ou de dermatophytes.

Les saponosides sont quasiment dépourvues d'activité antibactérienne mais sont parfois actifs *in vitro* sur des virus.

Il n'est pas rare que des saponosides soient cytotoxiques voire même antitumoraux. Certaines même inhibent la formation de tumeurs induites.

Enfin on a souvent évoqué leurs activités spermicides, piscicides, molluscides, analgésiques, immunomodulatrices, cytoprotectrices (Marston, A. et Hosttmann, K 1991.)

CONCLUSION

La présente étude a permis de mettre en évidence la richesse en principes actifs des écorces de racines et de tiges de *Mtragyna inermis* : alcaloïdes, composés réducteurs, anthraquinones, stérols et triterpènes, tanins et tanins et polyphénols, saponosides, doués de propriétés pharmacologiques. Cette abondance en principes actifs confère à la plante des propriétés remarquables, ce qui pourrait justifier ses multiples indications thérapeutiques et pour lesquelles elle est utilisée en tradithérapie.

L'étude de la toxicité de la plante, indispensable pour une adaptation de la tradithérapie a été réalisée pour situer les limites de tolérance de la plante. La DL50 déterminée à cet effet (810,7468 mg/kg de poids corporel) permet de classer les extraits parmi les substances faiblement toxiques.

L'étude a montré en particulier une abondance en saponosides .Ce groupe de composés, dont l'activité principale est antifongique, antimycosique, anti-inflammatoire et anti-helminthique revêt un intérêt particulier dans diverses pathologies.

Cependant, par leurs propriétés hémolytiques (destruction des globules rouges du sang), l'administration de la plante requiert quelques précautions surtout par voie générale ou parentérale (scarification par exemple) ou la présence de plaies dans le tractus digestif. Aussi la détermination de l'indice hémolytique des extraits s'avère nécessaire. Celui-ci nous donne les valeurs suivantes :

13125 pour l'extrait d'écorces de tiges

9545 pour l'extrait d'écorces de racines.

En partant des précautions ci-dessus indiquées et dans le cas d'administration prolongée de la plante à fortes doses ou à faibles doses, il serait conseillé de procéder au suivi de l'hémogramme par la détermination des trois valeurs que sont le nombre de globules rouges, le taux d'hémoglobine et l'hématocrite, ce qui permettra de prévenir les risques d'une éventuelle anémie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- **CIULEI, I. (1982)** Methodology for analysis of vegetable drug. Practical manual on industrial utilization of medicinal and aromatic plants.
- 2- **CONNOLLY, J.D. and HILL, R.A. (1996)**. Triterpenoids. Nat. Prod. Rep. 13, 151-169
- 3- **G. Valette (1972)**. Précis de pharmacodynamie . 3^è éd. pp. 332-333.
- 4- **GÜNTHER, B. et WAGNER, H. (1996)**. Quantitative determination of triterpenes in extracts and phytopreparations of *Centella asiatica*(L.) Urban. *Phytomedicine*, 3, 59-65.
- 5- **H. WAGNER, S. BLADT (1986)**. Plant drug analysis 2nd. Ed. 364 pages.
- 6- **HANSEN, J.R. (1998)**. Diterpenoids. Nat. Prod. 15, 93-106.
- 7- **HODGE A.C. et STERNER J.H : (1980)**. in études de toxicité : quelques données fondamentales (A.K. DONE) TEMPO MEDICAL Afrique N°7.
- 8- **J. KERARHO et J.G. ADAM : (1974)**. La pharmacopée sénégalaise traditionnelle. Plantes médicinales et toxiques
- 9- **L.GUIGNARD, L.COSSON, M.HENRY (1985)**.. Abrégé de Phytochimie. MASSON pp.121-200.
- 10- **LIETCHFIEL J.T., WILCOXON F.A.(1949)**. A simplifield method of evaluating dose effect experiments *J. pharmacol. Ther* ; 95 ; 113
- 11- **Jacques WEPIERRE (1977)**. Abrégé de Pharmacodynamie Générale. Ed. MASSON Paris.191 pages. Pp.140-141.
- 12- **Jean BRUNETON (1993)**. Pharmacognosie :Phytochimie, Plantes médicinales. 2nd. Ed. Tec & Doc Lavoisier, Paris, 915 pages.
- 13- **MAHATO, S.B. et NANDY, A.K. (1991)**.. Triterpenoid saponins discovered between 1987 and 1989. *Phytochemistry*, 30, 1357-1390.
- 14- **MAJESTER-SAVORNIN, B et al. (1991)**. Saponines of the ivy plant. *Hedera helix* and their leishmanicidic activity. *Planta Med.* 57, 260-262.

- 15- MARSTON, A. et HOSTETTMANN, K. (1991).** Plant saponins: chemistry and molluscicidal action. in "Ecological, chemistry and biochemistry of plant terpenoids". Harborne, J.B. et Tomas-Barberan F.A. eds p.264-286. Clarendon Press, Oxford.
- 16- MILLER LC.; TAINTER M.L. (1944).** Estimation of DL50 and Its Error by means of Logarithmic Probit Paper. Proc.Soc.Exp. Biol. Med. 57,261-264.
- 17- NACOULMA O. (1996).** Plantes médicinales et pratiques médicales traditionnelles au Burkina Faso, cas du plateau central. Thèse Doctorat d'Etat es Sciences Naturelles. Université de Ouagadougou.
- 18- Paris R.R., Moysse H., 1976.** Précis de matière Médicale. Ed. Masson, tome1, p.420