



Formulation d'un médicament traditionnel amélioré à base de *Kalanchoe crenata* (Andr) haw

Formulation of an enhanced traditional medicine based on *Kalanchoe crenata* (Andr) haw

Ernest Djoko¹, Corine Tchantchou², François-Marie Kanmangné¹, Yimta Foutse², Pierre Fotsing Kwetche³, Denis Wouessidjewe^{1,4}

1. Université des Montagnes, Laboratoire de Galénique, BP 208 – Bangangté (Cameroun)
2. Université des Montagnes, Laboratoire de Pharmacognosie, BP 208 - Bangangté (Cameroun)
3. Université des Montagnes, Laboratoire de Bactériologie des CUM, BP 208 - Bangangté (Cameroun)
4. Université Grenoble Alpes- UFR de Pharmacie, Département de Pharmacochimie moléculaire – UMR CNRS 5063.

edjoko@udm.aed-cm.org

Résumé

Kalanchoe crenata est une plante de la famille des Crassulaceae très utilisée en médecine traditionnelle africaine. Dans la région Ouest du Cameroun, *Kalanchoe crenata* est très utilisée avec satisfaction dans le traitement des otites et comme cicatrisant du nombril des nouveaux nés. Compte tenu des difficultés d'approvisionnement de la plante en saison sèche et dans les zones arides, ce travail s'est donné pour objectif de mettre au point un médicament traditionnel amélioré afin de rationaliser l'utilisation de *Kalanchoe crenata* sous une forme galénique à biodisponibilité améliorée et disponible en toute saison. La plante, qui pousse facilement autour des habitations (plante sauvage) a été récoltée à Bangangté durant les mois d'août et septembre 2012 puis identifiée à l'Herbier National du Cameroun. Les feuilles ont ensuite été nettoyées, lavées, ramollies à la flamme et broyées. Le jus brut obtenu a été filtré sur papier Whatman n° 3 puis lyophilisé, donnant une poudre à reconstituer dans de l'eau purifiée au moment de l'utilisation.

Le dosage des polyphénols totaux par spectrophotométrie, méthode de Folin-Ciocalteu a révélé que le lyophilisat titrait 6,33 µg équivalent acide gallique (EAG) par mg.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée pour quelques germes habituellement mis en cause dans les otites : 50 µg EAG par ml pour *Citrobacter freundii*, 100 µg EAG par ml pour *Staphylococcus aureus*, 200 µg EAG par ml pour *Klessiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* et *Escherichia coli*. Pour *Pseudomonas aeruginosa* la CMI de la poudre était de 400 µg EAG par ml.

La poudre a donc été conditionnée pour qu'après reconstitution, la solution puisse titrer 400 µg EAG par ml en référence à la CMI de *Pseudomonas aeruginosa*.

La solution reconstituée s'est révélée chimiquement stable et active sur les germes plus de 20 jours après reconstitution.

La poudre soumise à une température de 40 °C et à la lumière pendant un mois, s'est révélée stable.

Mots-clés

Formulation ; Médicament traditionnel amélioré ; *Kalanchoe crenata* ; Otite ; Antibactérien

Abstract

The objective of this study was to perform an improved traditional medicine based on *Kalanchoe crenata*, a local plant active on otitis.

The plant was harvested in Bangangté (West Cameroon) during the months of August and September, 2012. It has been identified in the National Herbarium of Cameroon. The leaves were



torn out, washed, softened in the flame, crushed and filtered, before the completion in our dosage form. This dosage form is a powder obtained by lyophilization of raw juice.

The activity test carried out with the juice of strains of *Staphylococcus aureus*, *Klessiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* showed no activity against these germs, but when concentrate to 50%, it showed an activity against *Staphylococcus aureus*. This led us to choose a more concentrated drug dosage form: i.e. powder to be reconstituted in an appropriate solvent at the time of use.

Assay of total polyphenols was performed spectrophotometrically using the Folin-Ciocalteu reagent. By this assay, we determined that our dry headlined 6.33 µg gallic acid equivalent per mg of powder.

The activity test showed the minimum inhibitory concentrations of 50 micrograms of gallic acid equivalents per ml for *Citrobacter freundii*, 100 micrograms per ml for *Staphylococcus aureus*, 200 micrograms per ml for *Klessiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. For *Pseudomonas aeruginosa* the MIC was 400 micrograms per ml GAE.

The drug product has been packaged to contain GAE 400 micrograms per ml after reconstitution. The suspension obtained after reconstitution in purified water retained its antimicrobial activity. The analytical assay showed that polyphenol content remained unchanged 20 days after reconstitution.

The preliminary stability test conducted showed that the drug product was stable to light, at a temperature of 40°C in the dark for more than one month storage.

Keywords

Clinical research; Non-pharmacological intervention; Validation; Surveillance; Methodology; Efficacy; Innocuity; Cost-efficacy

Introduction

Un médicament traditionnel amélioré (MTA) est un médicament à base de plantes issues des pharmacopées traditionnelles, de composition chimique testée, qui a fait l'objet de tests de toxicité sur les animaux, dont les études scientifiques ont évalué l'efficacité thérapeutique et dont la production est contrôlée [1].

La flore Camerounaise regorge d'un grand nombre de plantes dont une grande partie est utilisée en médecine traditionnelle pour leurs propriétés antimicrobiennes. Parmi ces plantes, *Kalanchoe crenata* (Andr) Haw (Crassulaceae) a fait l'objet de nombreuses études au Cameroun et dans d'autres pays du continent africain. Il a été démontré que le jus obtenu par pression des feuilles de *Kalanchoe crenata* avait une bonne activité antimicrobienne sur de nombreux microorganismes notamment *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebssiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* [2].

Kalanchoe crenata possède par ailleurs plusieurs autres propriétés faisant d'elle un médicament traditionnel dans de nombreuses pathologies telles que l'otite [3, 4, 5, 6], la sinusite, le paludisme [3, 4, 7], la fièvre jaune, la fièvre typhoïde [8], les affections ophtalmiques, la cicatrisation [9] et la conjonctivite. Au Congo, le jus est utilisé dans la dermatite vermineuse et sur les scarifications [10]. En République Démocratique du Congo, le suc des feuilles est utilisé en instillation oculaire dans le traitement de la conjonctivite et en instillation nasale dans la rhino-pharyngite [11]. Il peut être utilisé dans les affections cutanées [12, 4, 6, 13, 14, 15, 16, 7, 17] et certaines parasitoses intestinales [13, 14]. Certaines affections respiratoires sont traitées grâce à *Kalanchoe crenata* [18, 19, 13]. Il peut être également utilisé comme cardiotonique [6], tonifiant chez les femmes enceintes [13].

Matériel et méthode

Le matériel végétal utilisé était constitué des feuilles fraîches de *Kalanchoe crenata* (Andr) Haw (Fig. 1) récoltées à Bangangté durant les mois d'août et septembre 2012 au lever du jour, et identifiées à l'Herbier National du Cameroun.

Le matériel de laboratoire suivant a été utilisé : spectrophotomètre UV-Visible : CARY 1 E 100, plaque de silice F254, réactif de Folin-Ciocalteu (Dilué au 1/10), Na₂CO₃ (75 g/l d'eau distillée), acide gallique (50-250 µg/ml d'eau distillée).



Figure 1
Kalanchoe crenata (Andr) Haw de Bangangté

Les souches bactériennes testées étaient : *Staphylococcus aureus* QC 1626, *Klessiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* QC 76110, *Escherichia coli* ATCC25922 et *Citrobacter freundii*.

Méthodologie

Les feuilles de *Kalanchoe crenata* ont été récoltées au lever du jour. Elles ont été pesées, lavées, rincées à l'eau distillée, ramollies à la flamme puis broyées dans un robot mixeur. Le broyat obtenu a été filtré à l'aide d'une compresse stérile et du papier filtre Whatman n° 3. Le jus obtenu après filtration clarifiante a été testé et s'est révélé sans efficacité sur des souches bactériennes. En concentrant le jus à 50% puis à 75% de son volume initial, les solutions concentrées se sont révélées efficaces. Ce jus concentré a été alors séché par cryodessiccation.

Le rendement a été déterminé par la formule $\frac{P'}{P} \times 100$ (P représente la masse des feuilles utilisées et P' la masse de la poudre après lyophilisation).

Pour déterminer la concentration de *Kalanchoe crenata* (Andr) Haw efficace sur différents germes, nous avons préparé dans le soluté physiologique stérile des inoculats bactériens de densité optique équivalente à l'étalon 0,5 de l'échelle de MacFarland ($\approx 10^6$ - 10^8 UFC/ml) à partir des colonies prélevées d'une culture de 24 h.

Le milieu de culture était le bouillon de Mueller Hinton reparti dans des tubes fermés et stérilisés à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min.

Pour l'évaluation *in vitro* de l'activité antimicrobienne, une série de 5 dilutions correspondant aux concentrations de 64, 32, 16, 8, 4 mg de poudre par millilitre de bouillon a été effectuée. Pour chacune des dilutions, un volume de 10 µl de suspension bactérienne précédemment préparée (0,5 MacFarland) stérilement introduite dans le tube correspondant. Après une incubation de 18 à 24 heures à 37 °C, l'inhibition de croissance a été d'abord appréciée par l'absence de turbidité et l'absence de dépôt blanchâtre après centrifugation à 5000 trs/min pendant 5 min. La CMI était déterminée comme étant la plus faible concentration de l'extrait pour laquelle la turbidité et le dépôt n'étaient pas observés. Pour le contrôle, un tube contenant du bouillon simple a été préparé et utilisé comme témoin de stérilité du milieu alors que le second contenait du bouillon et l'extrait pour servir de contrôle pour la stérilité de la poudre. Pour les dosages, l'acide gallique a été choisi comme traceur, à cause de son pouvoir antibactérien. A 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (acides phosphotungstique et phosphomolybdique), nous avons ajouté 200 µl d'extrait préalablement dissout dans de l'eau distillée. Après homogénéisation, la solution ainsi préparée était incubée pendant 4 minutes à la température du laboratoire (25 °C). Puis 800 µl de solution de Na₂CO₃ y étaient ajoutés et l'ensemble homogénéisé, et incubé pendant 2 h à l'obscurité et à température ambiante. L'absorbance a été lue au spectrophotomètre à 765 nm. Les résultats étaient exprimés en concentration de polyphénols totaux obtenue à partir de la droite de



régression de la gamme d'étalonnage de l'acide gallique et exprimée en μg d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (μg EAG/mg).

Les tests de stabilité du produit reconstitué ont consisté d'une part à exprimer la teneur en polyphénols et d'autre part à tester l'activité en fonction du temps (soit 0 jour, 10 jours, 15 jours et 20 jours).

Sur le produit fini, nous avons procédé à quelques tests organoleptiques tels que : la couleur, l'odeur, la saveur et l'aspect visuel.

Le test d'hygroscopicité a été réalisé en mettant dans un flacon qui était par la suite hermétiquement fermé, une masse M_0 de poudre. Après 10 jours de conservation à la température de $25\text{ }^\circ\text{C}$, la mesure était faite dans le but de rechercher une éventuelle augmentation de la masse qui pourrait être due à une adsorption d'eau. Le pourcentage d'eau adsorbée a été déterminé par la formule : $\frac{M_1 - M_0}{M_1} \times 100$ où M_1 représente la masse de la poudre après conservation.

Le résultat obtenu a été interprété en fonction du tableau de la classification des poudres de Gabaude.

L'étude du vieillissement du produit concernait sa stabilité à la chaleur et à la lumière.

Pour apprécier l'influence de la température et de la lumière sur le produit, nous avons comparé le chromatogramme (CCM) de la poudre fraîchement préparée à celui d'un échantillon exposé à $40\text{ }^\circ\text{C}$ pendant 2 mois d'une part et à celui d'un échantillon exposé à la lumière du laboratoire pendant 2 mois d'autre part. En parallèle, nous avons effectué un dosage des polyphénols sur ces échantillons.

Sur le chromatogramme, l'apparition de spots nouveaux signifierait l'existence de produits de dégradation dus au vieillissement ou aux effets de la lumière.

Pour le test d'activité nous nous sommes limités au germe ayant la plus faible sensibilité. A 1 ml de la suspension reconstituée, nous avons introduit $100\ \mu\text{l}$ d'inoculum bactérien. L'ensemble a été incubé à $37\text{ }^\circ\text{C}$ pendant 18 à 24 heures.

Résultats

La plante *Kalanchoé crenata* récoltée à Bangangté a été identifiée à l'Herbier National du Cameroun sous le numéro 35196/HCN. Le rendement d'extraction était de 1,9 %.

Le tableau 1 ci-dessous présente le niveau d'activité de l'extrait de *Kalanchoe crenata* (Andr) Haw sur les microorganismes testés.

Tableau 1. Classification des poudres en termes d'hygroscopicité d'après Gabaude C [20].

Classes	Comportement
Très hygroscopique	accroissement de la teneur en eau > 15 %
Hygroscopique	accroissement de la teneur en eau de 2 à 5 %
Légèrement hygroscopique	accroissement de la teneur en eau de 0,2 à 2 %
Non hygroscopique	non hygroscopique accroissement de la teneur en eau < 0,2 %

Tableau 2. Concentration efficace du lyophilisat de *Kalanchoe crenata* (Andr) haw sur les souches bactériennes par la méthode de dilution en milieu liquide.

Concentration minimale Inhibitrice (mg /ml)	Souches bactériennes				
	4	8	16	32	64
Staphylococcus aureus	–	±	+++	+++	+++
Klebsiella pneumoneae	–	–	±	+++	+++
Proteus mirabilis	–	–	–	+++	+++
Pseudomonas aeruginosa	–	–	±	±	+++
Escherichia coli	–	–	±	+++	+++
Citrobacter freundii	±	+++	+++	+++	+++

(–) : Croissance bactérienne, (±) : Diminution de la croissance Bactérienne, (+++) : Inhibition de la croissance bactérienne



Ces résultats nous montrent que la concentration minimale inhibitrice de l'extrait sur *Citrobacter freundii* est de 8 mg/mL. A cette concentration, on note une diminution de la croissance du *Staphylococcus aureus* pour lequel l'inhibition complète est obtenue à 16 mg/ml. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoneae* et *Proteus mirabilis* ont été inhibés à 32 mg/ml. Quant à *Pseudomonas aeruginosa*, l'inhibition a été observée à 64 mg/ml.

Ainsi, l'activité de l'extrait sec de *Kalanchoe crenata* sur les germes croît avec l'augmentation de la concentration de l'extrait.

La courbe d'étalonnage de l'acide gallique a permis de déduire la concentration des polyphénols dans le jus brut. Il en ressort que pour 1mg de feuille de *Kalanchoe crenata*, nous avons une concentration en polyphénols de 0,88 µg d'équivalent d'acide gallique. Pour le lyophilisat, la concentration en polyphénols est de 6,33 µg EAG /mg de poudre de *Kalanchoe crenata*.

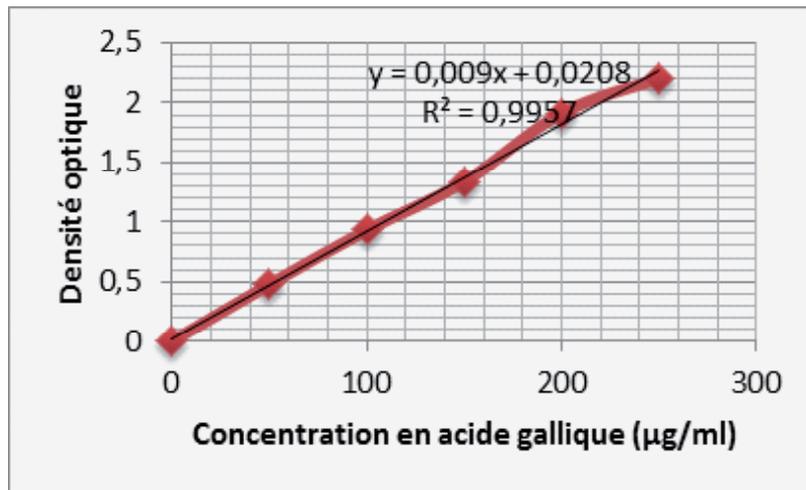


Figure 2
Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Le tableau 3 présente la correspondance entre la concentration efficace et la concentration minimale inhibitrice de *Kalanchoe crenata* (Andr) Haw sur différents germes.

Tableau 3. Concentration minimale inhibitrice de *Kalanchoe crenata* (andr) haw sur les différents germes.

	Souches bactériennes					
	<i>C. freundii</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>K. pneumoneae</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Concentration efficace (mg de poudre/ml)	8	16	32	32	32	64
CMI (µg EAG/ml)	50	100	200	200	200	400

Tableau 4. Teneur en polyphénols en fonction du temps.

Temps	Concentration en µg EAG/mg de poudre de <i>Kalanchoe crenata</i> (Andr) Haw
Jour 0	6,330
Jour 10	6,301
Jour 15	6,300
Jour 20	6,300

Vingt jours après reconstitution, la teneur en polyphénols ne diminue pas de façon significative.

Les tests d'activité ont été effectués sur le *Pseudomonas aeruginosa*, souche la moins sensible au produit. À la concentration 400 µg EAG par ml, la poudre de jus de *Kalanchoe crenata* (Andr) Haw demeure active sur le *Pseudomonas aeruginosa*.



Le produit final que nous appelons TANKEYOU® a été conditionné dans des flacons compte-gouttes en PP à raison de 4000 µg EAG par flacon. La poudre sera reconstituée avec 10 ml d'eau distillée au moment de l'emploi.

La notice porte les mentions de présentation (poudre et solvant pour instillation auriculaire), le principe actif en équivalent EAG (4000 µg), les propriétés pharmacologiques (antibactérien et anti-inflammatoire) et les indications thérapeutiques (otites bactériennes et infections dermiques à germes sensibles). Le médicament ne présente aucun effet indésirable connu.

Pour le traitement de l'otite, il est recommandé d'administrer 3 gouttes dans l'oreille 2 fois par jour.

Le produit doit être conservé à température ambiante.



Figure 3
Présentation du produit final

La poudre obtenue est fine, de couleur marron, piquante, de saveur amère. Après 10 jours de conservation à température ordinaire, 6 g de poudre ont une masse de 6,002 g, ce qui correspond à une hygroscopicité de 0,033 %. La poudre obtenue peut donc être classée comme non hygroscopique.

La teneur en polyphénols est de 6,33 µg d'équivalent d'acide gallique par mg de poudre.

La stabilité du produit est démontrée par chromatographie sur couche mince (Fig. 4).

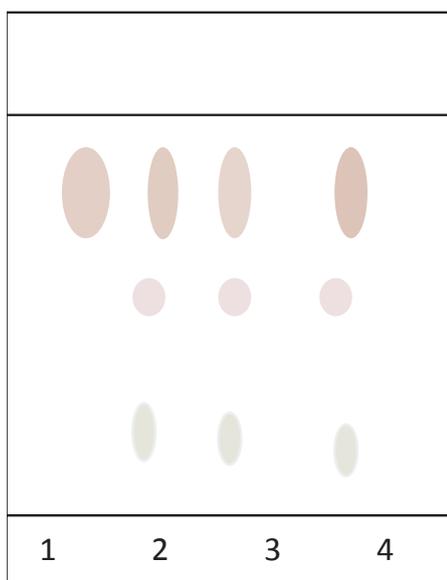


Figure 4
Chromatogramme de la poudre exposée à la lumière et à la chaleur.
1 = Dépôt de l'acide gallique, 2 = Dépôt de la poudre exposée à la lumière,
3 = Dépôt de la poudre fraîchement préparée, 4 = Dépôt de la poudre soumise à 40 °C



Le tableau 5 indique les rapports frontaux des spots obtenus dans diverses conditions.

Tableau 5. Rapports frontaux des différents échantillons de poudre.

Echantillon	Rf	Rf ₁	Rf ₂	Rf ₃
Acide gallique				0,45
Poudre fraîchement préparée		0,18	0,30	0,45
Poudre exposée à la lumière pendant 2 mois		0,18	0,30	0,45
Poudre exposée à 40°C pendant 2 mois		0,18	0,30	0,45

Nous constatons que les différentes taches apparues sur le chromatogramme sont identiques à celles observées avec la poudre fraîchement préparée. Elles ont les mêmes rapports frontaux. Ainsi donc, après deux mois d'exposition à la température (40 °C) ou à la lumière, il ne se forme pas de substance étrangère dans la poudre.

La teneur en polyphénols est similaire pour la poudre fraîchement préparée (6,330 µg EAG/mg) et celles conservées à la lumière ou à l'obscurité ou encore à 40 °C pendant 1 mois (6,299 µg EAG/mg).

Les tests de stabilité effectués sur le produit reconstitué ont montré une bonne stabilité sur 20 jours. Le produit peut ainsi être utilisé 15 jours après reconstitution.

Discussion

L'absence d'activité du jus de *Kalanchoe crenata* du mois d'août sur les bactéries est liée à la grande dilution des composés actifs à cause des fortes pluies de la période de récolte puisque le même jus concentré manifeste une activité antibactérienne. Ceci nous permet de déduire que le jus de *Kalanchoe crenata* obtenu de la plante récoltée en saison sèche (mois de janvier) serait plus concentré en principe actif.

C'est pourquoi, compte tenu des aléas d'une forme galénique liquide de concentration fixe (plus difficile à maîtriser sans conservateurs) nous avons opté pour une forme sèche, le lyophilisat.

L'étude de l'activité antimicrobienne de la poudre a montré que celle-ci est efficace sur *Staphylococcus aureus*, *Klessiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, confirmant ainsi les résultats déjà publiés dans la littérature [2, 9, 21, 22, 23, 24].

Pour suivre l'activité antibactérienne sur le plan chimique, nous avons choisi de doser les polyphénols dont l'activité antibactérienne est bien connue. Nous avons exprimé ces polyphénols en équivalents d'acide gallique (EAG) par mg de substance. En ce qui concerne le jus brut, la teneur en polyphénols était de 0,88 µg EAG/mg de feuille fraîche. La poudre finale obtenue titrait 6,33 µg EAG/mg de poudre. La lyophilisation du jus a donc permis une bonne concentration en substances actives (polyphénols).

Parmi les germes testés, *Citrobacter freundii* est le plus sensible alors que *Pseudomonas aeruginosa* est le moins sensible.

Le test d'activité effectué sur *Pseudomonas aeruginosa* en utilisant la solution obtenue après reconstitution de la poudre a présenté une inhibition 20 jours après reconstitution.

En définitive, le jus lyophilisé de *Kalanchoe crenata* (Andr) Haw est actif sur tous les germes testés. D'après ces résultats, cette poudre pourrait avoir une activité contre les otites d'origine bactériennes et donc susceptible d'être utilisée d'une façon rationnelle par les populations.

Notre produit est conditionné dans un flacon compte-gouttes en plastique hermétiquement fermé et accompagné d'une ampoule d'eau distillée pour reconstitution dans un conditionnement secondaire en carton. La poudre n'est pas hygroscopique et demeure stable même après exposition à la lumière et à la chaleur. Ces essais de stabilité à la chaleur et à la lumière entraînent dans le cadre des essais de vieillissement accéléré car le conditionnement est tel que, dans les conditions normales d'utilisation, ces facteurs n'ont aucun effet sur le produit.



Conclusion

À l'issue de ce travail, nous affirmons qu'il est possible de mettre à la disposition des malades et des praticiens de la santé un nouveau médicament traditionnel amélioré pour le traitement de l'otite bactérienne voire le traitement des blessures : la poudre à base de *Kalanchoe crenata* (Andr) Haw. Cette poudre serait d'utilisation simple, pour une durée de traitement facilement acceptable.

Références

1. Pousset JL. Place des médicaments traditionnels en Afrique. *Médecine Tropicale* 2006;66:606-09.
2. Aibinu IE, Odunayo RA, Tayo A, Toyin A, Tolu O. In vitro antimicrobial activity of crude extracts from plants *Bryophyllum pinnatum* and *Kalanchoe crenata*. *Afr. j. trad. cam.*2007;4 (3):338-44.
3. Dibong S D, Mpondo E, Ngoye A, Priso R J. Modalities of exploitation of medicinal plants in Douala's region. *Am J Food Nutr* 2011;1(2):67-73.
4. Diafouka AJP. Analyse des usages des plantes médicinales dans 4 régions de Congo-Brazzaville. Thèse de Doctorat d'Université libre de Bruxelles. Faculté des Sciences, Laboratoire de Botanique Systématique et de Phytosociologie. 1997: 431.
5. Bokdam J, Droogers A F. Contribution à l'étude ethnobotanique des *Wagenia* de Kisangani, Zaïre. *Meded Land bouwhogeschool* 1975:75.
6. Akendengue BAM Louis. Medicinal plants used by the Masango people in Gabon. *Journal of Ethnopharmacology* 1994;41:193-200.
7. Cabalion P, Waikedre J, Bontemps C, Degoy A, Fournet A, Patissou J. Substances naturelles des forêts sèches. 2005;(1)
8. Dibong S, Mpondo ME, Ngoye A, Kwin MF, Beti JL. Ethnobotanique et phytomédecine des plantes médicinales de Douala, Cameroun. *J Appl Biosci* 2011;37:2496-2507.
9. Foutse Y. Contribution à l'étude ethnopharmacologique dans le département du NDE (Cameroun). Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université Des Montagnes; 2007: 144-181.
10. Diafouka, AJP. Analyse des usages des plantes médicinales dans 4 régions de Congo-Brazzaville. Thèse de Doctorat d'Université libre de Bruxelles. Faculté des Sciences, Laboratoire de Botanique Systématique et de Phytosociologie 1997:431.
11. Bokdam J, Droogers AF. Contribution à l'étude ethnobotanique des *Wagenia* de Kisangani, Zaïre. *Meded Landbouwhogeschool* 1975;19:75.
12. Données statistiques des produits forestiers non-ligneux du Cameroun. [Consulté le 30-07-2012] consultable à l'url <http://www.fao.org/docrep/003/x6699f/x6699f02.htm>
13. Baerts, M J Lehmann. Guérisseurs et plantes médicinales de la région des crêtes Zaïre-Nil au Burundi. *Ann Sc Eco* 1989;(18):214.
14. Adjanohoun E, L Ake Assi. Contribution to ethnobotanical and floristic studies in Uganda. *PHARMEL* 1993; (2):430.
15. Jiofack T, Ayissi L, Fokunang C, Guedje, Kemeuze V. Ethnobotany and phytomedicine of the upper Nyong valley forest in Cameroon. *African Journal of Pharmacology* 2009; 3(4):144-50.
16. Adjanohoun, Ahyi M, Ake Assi L, Dramane K, Elewude J A, Fadoju S O et al. Contribution to ethnobotanical and floristic studies in Western Nigeria. *Pharmel* 1991;2:420.
17. Adenike K, Eretan O B. Purification and partial characterization of a lectin from the fresh leaves of *Kalanchoe crenata* (Andr.) Haw. *J Biochem Mol Biol* 2004;37(2):229-33.
18. Fezan HT, Guy MI, Kohue CC. N'G, Clejesson HBM. Études de quelques plantes thérapeutiques utilisées dans le traitement de l'hypertension artérielle et du diabète : deux maladies émergentes en Côte d'Ivoire. *Sciences & Nature* 2008;5(1):39-48.
19. Adjanohoun, E, L Ake Assi. Contribution au recensement des plantes médicinales de Côte d'Ivoire. *Nat Florist* 1979 ; 358
20. Gabaude C. De la poudre au comprimé : une stratégie de caractérisation pour un développement rationnel. Thèse de doctorat d'université, Limoges : Université de Limoges, 1999:400.
21. Foutse Y. Evaluation des activités antimicrobiennes et antioxydantes des extraits de *Kalanchoe crenata*, *Terminalia avicennioides*, *Sarcocephallus latifolius* *Spathodea campanulata* et *Sterospermum kunthianum*. 21. Thèse de Master of science en biochimie option pharmacologie ; Université de Dschang. 2010 : 42-23.
22. Lewise N C. Etude de la phytochimie et des Activités biologiques de deux plantes utilisées en médecine Traditionnelle gabonaise : *Terminalia catappal*. (combretaceae) et *Kalanchoe crenata* (andr.) haw. (crassulaceae). Thèse de doctorat en pharmacie, la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie, Bamako Mali ; 2007 Février : 154-56.
23. Dimo T, Fotio AL, Nguelefack TB, Asongalem EA, Kamtchouing P. Antiinflammatory activity of leaf extract of *Kalanchoe crenata* Andr. *Indian J. Pharmacol* 2006; (38):115-19.
24. Kablan B, Adiko J, Abrogoua M D P. Évaluation in vitro de l'activité antimicrobienne de *Kalanchoe crenata* et de *Manotes longiflora* utilisées dans les ophtalmies en Côte d'Ivoire. *Phytothérapie* ISSN 1624-8597. 2008; 16 (5):282-8.

Lien d'intérêt : aucun