

Microbouturage in vitro de, *Phyllanthus odontadenius* Müll. Arg.

BAKETANA K. P. A.¹, BULUBULU F.¹, NDOMPETELO Z. V^{2*}.

Paper History

Received:

July 29, 2018

Revised:

November 4, 2018

Accepted:

December 18, 2018

Published:

March 27, 2019

Keywords:

Microbouturage, in vitro, Phyllanthus.

ABSTRACT

In vitro microbutting of *Phyllanthus odontadenius* Müll. Arg.

Phyllanthus odontadenius, a medicinal plant belonging to the Euphorbiaceae family, is used in traditional Congolese medicine for the treatment of malaria and others associated symptoms. Nodal fragments of this species were cultured on the basal medium, Murashige and Skoog (MS) without growth regulators, supplemented with naphthalene acetic acid (NAA) and -benzylaminopurine (BAP) (1: 4) or NAA / BAP (1: 4) + gibberellic acid (GA₃, 10 μ l) + adenine sulfate (40 mg / l) to determine the best organogenesis in vitro. It follows from the results obtained that vitroplants were obtained only on MS medium without growth regulators. The success rate after thirty days cultures was 21.7%.

¹Université Pédagogique Nationale, Faculté des Sciences, Département de Biologie, B.P; 8815, Kinshasa I;

²Institut Supérieur d'Etude Agronomique de Zomfi, Territoire de Madimba, Kongo Central.

* To whom correspondence should be addressed: rogerzuluvevele@gmail.com

INTRODUCTION

La pauvreté en Afrique subsaharienne et la dégradation du tissu socio-économique engendrent l'inaccessibilité des populations autochtones aux soins de santé primaire. Les médicaments pour lutter contre certaines maladies comme le VIH/SIDA, le paludisme et la tuberculose, sont soit onéreux soit deviennent inefficaces suite à l'apparition rapide de souches pathogènes pharmaco-résistantes aux médicaments de synthèse [GUIGUENDE, 1991 ; LE BRAS et SOMON, 1987].

Il est bien connu que l'essentiel de la pharmacopée dérive des plantes ou des produits des extraits des plantes et que 75% des principes actifs contenus dans les médicaments dérivent des plantes [TOURTE, 2002]. Cependant, l'exploitation incontrôlée des forêts et l'urbanisation, avec leur incidence fâcheuse sur les potentialités de la pharmacopée, peuvent être considérées comme une menace sur la biodiversité [TOURTE, 2002].

Les plantes du genre *Phyllanthus* sont utilisées en République démocratique du Congo (RDC) et dans plusieurs régions du monde pour le traitement de nombreuses maladies [KERHARO, 1974 ; OGATA et al, 1992 ; TONA et al, 1999 ; LUYINDULA et al, 2004]. En RDC, *Phyllanthus odontadenius* est utilisé pour le traitement de la malaria [LUYINDULA et al, 2018].

Néanmoins *Phyllanthus odontadenius* est une herbacée saisonnière ; le développement d'un médicament à partir des extraits ou métabolites actifs de cette plante

rencontre ainsi des limites auxquelles on peut épingler l'insuffisance d'une biomasse permanente et le risque de la disparition de cette espèce suite aux prélèvements successifs par les populations et aux activités humaines. En plus, on pourrait rajouter la contrainte liée à la germination des graines de *Phyllanthus spp.* [UNANDER et al, 1995 ; GEHLOT et KASERA, 2012]. En effet, les graines de *Phyllanthus* germent difficilement après récolte. Pour lever la dormance, certains auteurs trempent les graines dans une solution de régulateur de croissance, notamment l'acide gibbérellique (GA₃) à la concentration de 2 mg/L [JIMENEZ et al., 2007 ; KIKAKEDIMAU et al., 2014]. Ceci constitue un handicap dans la collection du matériel de propagation [UNADER et al, 1991]. Face à toutes ces contraintes, une des solutions est de recourir aux techniques de culture in vitro pour la propagation de *Phyllanthus odontadenius*.

Actuellement, les méthodes de culture in vitro sont de plus en plus employées [GEHLOT et KASERA, 2012; UGANDHAR, 2014] pour assurer la propagation clonale des génotypes élites afin de satisfaire les besoins en agriculture et horticulture ; elles permettent également :

- La production en masse de plantes uniformes et phylogénétique permanente indépendamment des saisons ;
- La conservation des génotypes dans des conditions idéales de protection contre les intempéries, les agressions des ravageurs et agents pathogènes ;

- o La multiplication accélérée et la propagation de plantes dont la sexualité est défailante (cas de certains hybrides) [HAICOUR, 2002 ; TOURTE, 2002].

En dépit de ces études, la régénération de *P. odontadenius* par la technique de micro-propagation n'est pas encore totalement maîtrisée. La stratégie à adopter consiste à maîtriser d'abord le protocole de régénération in vitro de cette espèce.

La présente étude vise donc la régénération in vitro de *P. odontadenius* par la technique de microbouturage in vitro en vue de mettre en place un protocole de microbouturage de cette espèce.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé pour la culture in vitro est constitué de fragments prélevés des nœuds auxiliaires des tiges [UGANDHAR, 2014] de plantes de *Phyllanthus odontadenius* Il s'agit d'une herbe annuelle glabre, érigée ou ascendante, atteignant 1 m de haut. Il est très ramifié avec des feuilles sur les branches latérales de la tige, donnant l'apparence de feuilles pennées atteignant 90 cm de hauteur, se reproduisant à partir de graines. La tige est brunâtre, glabre, ronde, légèrement ligneuse à la base, ramifiée horizontalement, pentagonale et verdâtre au sommet. Les feuilles sont grandes au sommet et vers le pétiole, alternes, oblongues, arrondies à la base, obtuses à l'apex, longues de 6 à 15 mm et larges de 5 à 7 mm. Les rameaux sont aplatis et ailés avec des stipules rouges distinctes atteignant 2 mm de long, non visibles. Les fleurs sont monoïques et l'inflorescence est constituée de fleurs mâles 2-3 réunies à l'aisselle inférieure des branches, les femelles solitaires à l'aisselle supérieure et plus grandes.



Figure 1| *Phyllanthus odontadenius* (IPNI, J. Bot. 2 : 331. 1864 (IK)

Les sépales sont au nombre de 6, oblongs-linéaires, ne renferment pas complètement le fruit. Le fruit est une capsule ronde, verdâtre et de 1,7 à 2 mm de diamètre. Les fleurs sont

vert blanchâtre, petites sur les pédicelles courts [DANIEL et al., 2015], (Figure1).

Les plantes ont été récoltées sur le site de l'Université de Kinshasa, à 416 m d'altitudes, Lat. S : 04°25'12,2" et Long EO : 15°18'37,8". Les plantes de cette espèce ont été au préalable identifiées au Laboratoire de Botanique systématique et Ecologie végétale, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Kinshasa [KIKAKEDIMAU et al., 2014].

Les milieux de culture

a. Composition des milieux de culture

Trois milieux de culture à base des solutions de MURASHIGE et SKOOG [1962] ont été utilisés pour le microbouturage in vitro de *Phyllanthus odontadenius* :

- o Milieu de base de Murashige et Skoog (MS) : Milieu M1 ;
- o Milieu MS + acide naphthalène acétique (ANA) / 6-benzylaminopurine (BAP) (1 :4) : Milieu M2 ;
- o Milieu MS + ANA/BAP (1 :4) + acide gibbérellique (GA3, 10 μ 1) + adénine sulfate (40 mg/1) : Milieu M3.

b. Confection des solutions mères

Les solutions-mères ont été préparées selon les modes opératoires ci-après [CIDES, 1999] :

1. Solution-mère des macroéléments 20 fois concentrés : SM I

On verse approximativement 600 ml d'eau distillée dans un bécher de 1 litre et on laisse dissoudre chacun des sels indiqués au Tableau 1, en chauffant légèrement au besoin. La solution obtenue est transférée dans un flacon volumétrique de 1 litre et complétée à 1 litre avec de l'eau distillée. Cette solution est ensuite transférée dans un flacon hermétique et conservée au réfrigérateur.

2. Solution-mère des micro-éléments 100 fois concentrés : SM II

On verse approximativement 600 ml d'eau distillée dans un bécher de 1 litre et on laisse dissoudre chacun des sels indiqués au Tableau 1. La solution obtenue est transférée dans un flacon volumétrique de 1 litre et complétée à 1 litre avec de l'eau distillée. On place cette solution dans un flacon hermétique qu'on garde au réfrigérateur.

3. Solution-mère du chélate de fer 100 fois concentrés : SM III

On verse approximativement 600 ml d'eau distillée dans un bécher de 1 litre et on ajoute quelques gouttes de NaOH (1N). On porte cette solution en ébullition. Après refroidissement on dissout le Na₂EDTA puis on ajoute lentement le FeSO₄ · 7 H₂O jusqu'à dissolution. La solution obtenue est transférée dans un flacon volumétrique de 1 litre et

complétée à 1 litre avec de l'eau distillée. Cette solution est placée dans un flacon ambré (ou recouvert d'un papier d'aluminium) et gardée à température de la pièce.

4. Solution-mère des substances vitaminiques 100 fois concentrés : SM IV

On verse approximativement 70 ml d'eau distillée dans un bécher de 100 ml auquel on laisse dissoudre chacune des vitamines indiquées au **Tableau 1**. La solution est ensuite transférée dans un flacon volumétrique de 100 ml et complétée à 100 ml avec de l'eau distillée. On le place ensuite au réfrigérateur dans un flacon hermétique.

Tableau 1 | Composition des solutions mères

10	Composés	Concentrations des solutions mères (mg/l)	Concentration du milieu final (mg/l)
SMI	NH ₄ NO ₃	33.000	1.650
	KNO ₃	38.000	1.900
	CaCl ₂ .2H ₂ O	8.000	440
	MgSO ₄ .7H ₂ O	7.400	370.6
	KH ₂ PO ₄	3.400	170
SMII	KI	166	0.83
	H ₃ BO ₃	1.240	6.2
	MnSO ₄ .4H ₂ O	4.460	22.3
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1.720	8.6
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	50	0.25
	CuSO ₄ .2H ₂ O	5	0.025
	CoCl ₂ .6H ₂ O	5	0.025
SM III	FeSO ₄ .7H ₂ O	5.500	27.85
	NaDTA.2H ₂ O	7.460	37.25
SM IV	Myo-inositol	20.000	100
	Acide nicotinique	100	0.5
	Pyridoxine-HCl	100	0.5
	Thiamine-HCl	100	0.5
	Glycine	400	2.0

c. Préparation des milieux de culture

Dans un bûcher de 2 litres, ont été versés 50 mL de SMI et 10 mL de chacune des autres solutions-mères respectives. Le volume a été amené à 800 mL avec de l'eau distillée stérile. A cette solution ont été ajoutés 30 g de sucrose, 100 mg de myoinositol et 2 mL de la solution hormonale appropriée, ensuite le volume total a été porté à 1000 mL. Après avoir ajusté, sous agitation magnétique, le pH à 5,7 avec quelques gouttes de NaOH 0,1N, 8 g d'Agar y ont été ajoutés. Après dissolution d'Agar au four à micro-ondes pendant 7 minutes, le milieu est réparti dans des tubes à essai de culture en verre (2,69 x 14, cm) dans des conditions aseptiques. Ces tubes sont ensuite coiffés d'un bouchon transparent et autoclavés à 121°C pendant 15 minutes à la pression d'1 bar (autoclave automatique SANOClav).

Stérilisation d'explants et mise en culture

Les manipulations ont été effectuées sous une hotte à flux laminaire (**MICROFLOW n°51424/2 en inox - Biehler**) préalablement stérilisées aux UV et désinfectée à l'alcool 70°. En effet, les fragments de *Phyllanthus odontadenius* ont d'abord été trempés dans l'alcool éthylique 70° pendant une minute puis dans du chlorure de mercure 0,125% pendant 3 minutes [LUYINDULA et al, 2006]. A l'aide d'une pince stérile, ces fragments ont été prélevés et rincés avec de l'eau distillée 7 fois de suite. Après le rinçage, les deux extrémités des fragments nécrosées par le chlorure de mercure ont été éliminées à l'aide d'un scalpel stérile.

Trente explants par milieu ont été cultivés. Les explants d'environ 1,5 cm ont été placés verticalement dans des tubes contenant du milieu de culture, la partie basale étant enfoncée dans le milieu gélosé pour initier le microbouturage in vitro. Les tubes ont été rebouchés avant d'être placés dans le phytotron (Etuve réfrigérée LMS Ltd) à 27°C±0,1 sous un régime photopériode de 16 heures de lumière contre 8 heures d'obscurité.

Les observations effectuées ont porté sur le nombre d'explants ayant repris, proliféré en pousse feuillée, brunis contaminés après la mise en culture. Les variables pour le microbouturage in vitro été mesurées à partir des formules ci-après :

$$\text{Taux de reprise (\%)} = \frac{\text{nombre d'explants repris}}{\text{Nbre. d'explants ensemencés}} \times 100$$

$$\text{Taux de caulogenèse (\%)} = \frac{\text{nombre d'explants régénérés}}{\text{Nbre. d'explants ensemencés}} \times 100$$

$$\text{Taux de rhizogenèse (\%)} = \frac{\text{nombre d'explants avec racine}}{\text{Nbre. d'explants ensemencés}} \times 100$$

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Résultats

Différents types de réponse des explants ont été observés après culture sur les trois types de milieu.

- Après 7 jours de culture, le taux de reprise était de 60,9% sur le milieu MS, 44% sur le milieu M2 et 46,5% sur le milieu M3 (**Figure 2**). La reprise est cependant intervenue avec 2 jours de retard sur le milieu M3
- Après 15 jours, on a observé la formation de tiges feuillées sur les trois milieux de culture (**Figure 3a**). Par ailleurs, des cals ont été formés sur le milieu M2 contenant le BAP et l'ANA (**Figure 3b**). Des cals verdâtres pour certains et blanchâtres pour d'autres. Le taux de caulogenèse était respectivement de 47,87% sur le milieu M1, 44% sur le milieu M2 et 25,6% sur le milieu M3 ; alors que le taux de callogène était de 44% sur le milieu M2 (**Figure 4**).

Taux de reprise
(%)

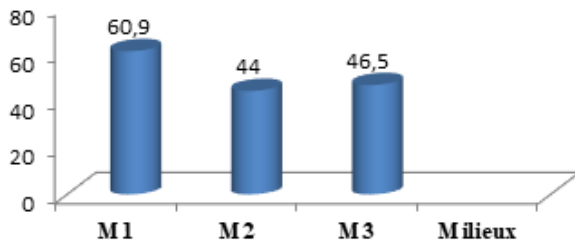


Figure 2 | Effet de la composition du milieu de culture sur la reprise de *P. odontadenius* après 7 jours de culture (M1 = MS ; M2 = MS + AN A/BAP ; M3 = MS + ANA/BAP + GA3 + A)



Figure 3 | a : Tige feuillée ; b : Cals de *P. odontadenius*

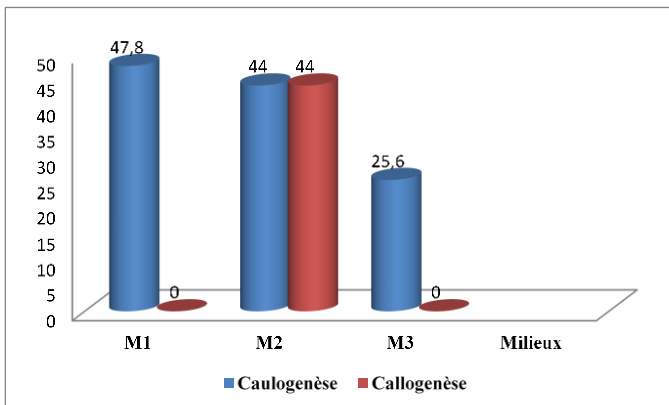


Figure 4 | Effet de la composition du milieu de culture sur la caulogénèse de *P. odontadenius*

- Par ailleurs, on n'a observé la formation des racines que sur les tiges feuillées qui se sont développées sur le milieu MS (Figure 5). Après 21 jours de culture le taux de rhizogénèse était de 26% (Figure 6). La disposition des rameaux sur la Figure 5 est la même que celle sur la Figure 1.
- 17 jours après la culture sur milieu MS, 26,9% de vitroplants ont été produits. Néanmoins ce pourcentage a diminué 30 jours après, avec un taux de survie de vitroplants de 21,74% (Figure 7).



Figure 5 | Plantule de *P. odontadenius* avec racines

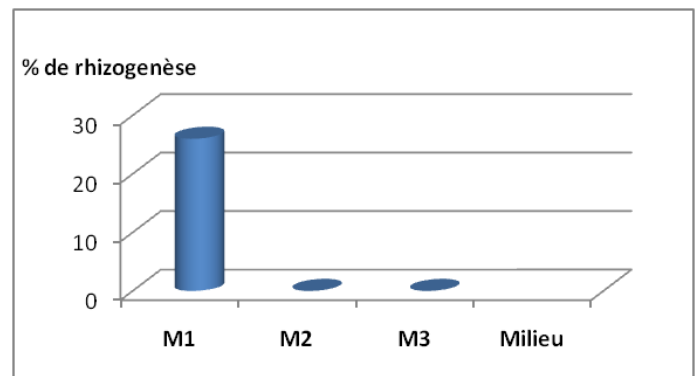


Figure 6 | Taux de rhizogénèse de *P. odontadenius* sur le milieu MS après 21 jours de culture

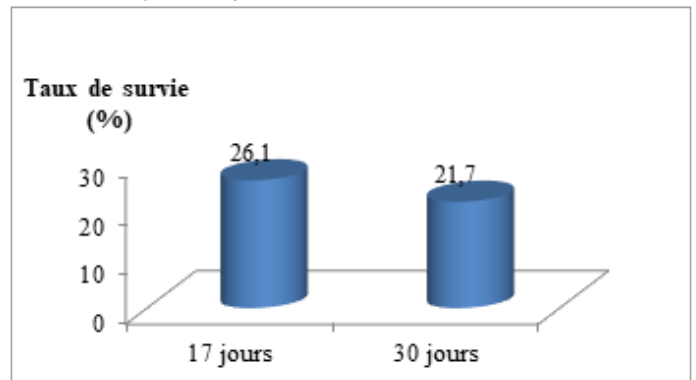


Figure 7 | Taux de survie de vitroplants de *P. odontadenius* obtenu sur le milieu MS

Ces vitroplants obtenus sur le milieu MS avaient une taille moyenne de 1,97cm et en moyenne 5,8 feuilles et 1 racine par plantule après 17 jours de culture. 30 jours après, la taille moyenne était de 2,7 cm, avec un nombre moyen de racines de 3,8 (Figure 8).

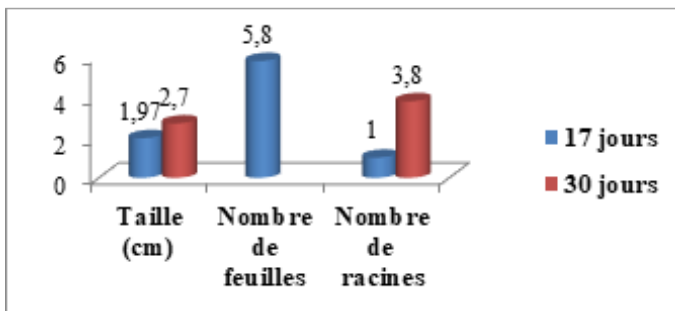


Figure 8 | Taille moyenne des vitroplants et nombre moyen de feuilles et racines produites après 17 et 30 jours de culture sur le milieu MS

Discussion

La présente étude avait comme objectif l'établissement d'un protocole souhaitable de microbouturage *in vitro* de *P. odontadenius* pour sa micropropagation. L'organogenèse était évaluée en fonction des régulateurs de croissance utilisés dans le milieu de base MS.

L'analyse des résultats obtenus montre que la culture des fragments nodaux des tiges de *P. odontadenius* a mis en évidence diverses réponses en fonction de la présence ou non des phytohormones présentes dans le milieu de culture de base de Murashige et Skoog.

En effet, l'aptitude organogène des explants dépend de plusieurs facteurs, notamment du stimulus hormonal apporté par le milieu nutritif. Aussi l'interaction entre la cytokinine et l'auxine joue un rôle régulateur significatif dans la régénération des pousses et des racines *in vitro*. Dans cette étude, les pousses feuillées ont été obtenues dans les trois milieux. Le taux de callogenèse était cependant faible dans le milieu M3.

Malgré la présence de l'auxine (ANA), l'induction des racines n'a pas pu être initiée dans les milieux avec régulateurs de croissance (M2 et M3). D'autres facteurs autres que les auxines pourraient influencer l'induction des racines chez *P. odontadenius*. Par ailleurs, hormis les contaminations observées dans quelques tubes (17% dans le milieu M1, 4% dans le milieu M2 et 27% dans le milieu M3) après 15 jours de culture, les pousses feuillées sur les milieux M2 et M3 furent nécrosées.

En plus de la caulogenèse, on a noté l'induction des cals sur le milieu avec la combinaison BAP/ANA (milieu M2). Les résultats similaires ont été obtenus par BANSIMBA et al. [2015] sur le manioc. L'équilibre hormonal entre l'auxine et la cytokinine a eu une grande influence sur la callogenèse.

Le milieu MS [MURASHIGE, 1974] contenant des macroéléments, des microéléments ainsi que des adjuvants (vitamines) en dose variables, dispose des éléments nécessaires pour initier le débourrement d'explants.

En outre des tiges feuillées et bien pourvues des bourgeons s'enracinent assez facilement dans un milieu dépourvu de régulateur de croissance. Les jeunes feuilles et les bourgeons étant des sites naturels de production d'auxine, à l'image des boutures traditionnelles, ces jeunes

plantules s'enracinent d'elles-mêmes [CIDES, 1999]. Seul le milieu MS a permis la production des plantules complètes (tiges feuillées et racines). Ces résultats confirment ceux obtenus par CATAPAN et al., [2001] selon lesquels l'enracinement s'est produit spontanément chez les espèces de *Phyllanthus* sans l'ajout d'aucun régulateur de croissance.

CONCLUSION

La technique de l'organogenèse directe (microbouturage *in vitro*) constitue une approche efficace pour régénérer un fragment de plante. Les résultats obtenus dans la présente étude viennent de montrer que l'organogenèse est fonction du génotype, de l'explant cultivé et de la composition du milieu de culture.

Après un mois de culture sur milieu MS sans régulateurs de croissance, 21,7% de vitroplants ont été produits. Ces plantules avaient une taille moyenne de 2,7 cm et 3,8 racines en moyenne. Les repiquages des fragments nodaux des vitroplants obtenus par microbouturage *in vitro* vont permettre ainsi de maximiser les chances de micropropagation de *P. odontadenius*.

RÉSUMÉ

Phyllanthus odontadenius est une plante médicinale appartenant à la famille des Euphorbiacées et utilisée en médecine traditionnelle congolaise pour le traitement de la malaria et certains symptômes associés. Les fragments nodaux de cette espèce ont été cultivés sur le milieu de base de Murashige et Skoog (M.S.) sans régulateurs de croissance, additionné de l'acide naphthalène acétique (ANA) et 6- benzylaminopurine (B.A.P.) (1 :4) ou de ANA/BAP (1 :4) + acide gibbérellique (GA3, 10 μ l) + adénine sulfate (40 mg/1) pour déterminer la meilleure organogenèse *in vitro*. Il découle des résultats obtenus que les vitroplants n'ont été obtenus que sur le milieu MS sans régulateurs de croissance. Le taux de réussite, trente jours après culture, était de 21,7%.

Mots Clés

Microbouturage, in vitro, Phyllanthus.

REFERENCES

- BANSIMBA M.J.R., DIAMUINI N. A., BULUBULU F., MBAYA N. A., LUYINDULA N. S. [2015]. *In vitro* meristem-tip culture and regeneration approaches in Congolese cassava accessions (Manihot esculenta Crantz var. Boma and Mpelo Nlongi). International Journal of Biological Research, 73. 1-13
- CATAPAN E., OTUKI M.F., VIANA A.M. [2001]. *In vitro* culture of *Phyllanthus stipulates* (Euphorbiaceae). Rev. bras. Bot., 24, 1, <http://dx.doi.org/10.1590/50100-84042001000&00003>.
- CIDES [1999]. Micropropagation pour l'entreprise sericole. Cahier de références techniques. 44 p.
- DANIEL A.A, BIO L.N., CHIEDOZIE J.U., CLEMENT U.O. [2015]. Identification of the Genus *Phyllanthus* (Family Phyllanthaceae) in Southern Nigeria Using Comparative Systematic Morphological and Anatomical Studies of the Vegetative Organs, Journal of Plant Sciences, 3, 3, 137-149.

- GEHLOT M., KASERA P.K.** [2012]. Improvement of seed germination behaviour in *Phyllanthus amarus* by acid and mechanical scarification pretreatments. *ecoprnt* 19: 1-5.
- GUIGUENDE T.R., BAUDON D., ROUX J.** [1991]. Etude de la sensibilité des *Plasmodium falciparum* à la chloroquine en zone de savane de Haute Volta à paludisme hypérendémique. Utilisation des tests in vitro. Mise en évidence d'une souche résistante in vitro. *Bull. Soc.Path. Ex*, 77, 658-665.
- HAÏCOUR R.** [2002]. Biotechnologies végétales. Techniques de laboratoire, c Lavoisier, Ed. Tec et Doc, paris. 305 P.
- JIMENEZ M., ALVARENGA S., ALAN E.** [2007]. Establecimiento del Protocolo de Micropropagación para la Planta Medicinal *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae). *Tecnología en Marcha*, 20-2.
- KERHAO J.** [1974]. La pharmacopée sénégalaise traditionnelle. Plantes médicinales et toxiques. Editions Vigot et frères (427-435 p).
- KIKAKEDIMAU N. R., LUYINDULA N. S., SINO V., LUKOKI L. F., MBEMBA F.T., MUTABEL H. D., CIMANGA K. R. and DIAMUNI N. A.** [2014]. Effects of Gamma Irradiation on Seeds Germination, Plantlets Growth and In vitro Antimalarial Activities of *Phyllanthus odontadenius* Müll Arg. *American Journal of Experimental Agriculture* 4,11, 1435-1457
- LE BRAS J., SOMON F.** [1987]. Evolution de la chimiosensibilité du paludisme en 1986. *Bull. Epid. Hebdomadaire*, 22, 85-87.
- LUYINDULA N., DIAMUNI N., KIKAKEDIMAU N., MWAMBI N., NYEMBO K., MONIZI M.** [2006]. Amélioration de la productivité en métabolites secondaires par gamma irradiation et culture in vitro des tissus de *Phyllanthus odontadenius*. (Euphorbiacée). *Rév. Cong. E des Sc. Nucléaires*, 23, 1/2.
- LUYINDULA N., TONA L., LUKEMBISA S., TSAKALA M., MESIA K., MUSUAMBA M.** [2004]. In vitro antiplasmodial activity of callus extracts from fresh apical stems of *Phyllanthus niruri* L (Euphorbiaceae): Part 1. *Phar. Biol*, 42,7,1-7.
- LUYINDULA N., KIKAKEDIMAU N., SINO V., ROUVIER F., MBEMBE F., CIMANGA K.** [2018]. Improvement of secondary metabolites from *Phyllanthus odontadenius* against malaria by mutagenesis, *Journal of Pharmaceutical Research*, 21, 2,1-14.
- MARGARA J.** [1978]. Mise au point d'une gamme de milieux pour les conditions de culture in vitro. *C. R. Acad. Sci.*, 654-661 p.
- MURASHIGE T.** [1974]. The impact of tissue culture on agriculture in thorne, T.A. (éd); *Frontiers of plants tissues*, Calgary, Canada; University of Calgary Press. (1526 pp).
- MURASHIGE T., SKOOG F.** [1962]. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15,3, 473-497.
- OGATA T., HIGUCHI H., MOCHIDA S., MATSUMOTO H., KATO A., ENDO T., KAJI A., KAJI H.** [1992]. HIV-1 reverse transcriptase inhibitor from *Phyllanthus odontadenius*. *AIDS Research and Human Retrovirus* 8, 1937-1944.
- TONA L., CIMANGA R.K., MESSIA K., MUSUAMBA C.T., DE BRUYNE T., APERS S., HERNANS N., VAN MIERT S., PIETERS L., TOTTE J., VLIETINCK A.J.** [2004]. In vitro antiplasmodial activity of extracts and fractions from seven medicinal plants used in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology* 93, 27-32.
- TONA L., NGIMBI N., TSAKALA M., MESSIA K., CIMANGA K., APERS S., DE BRUYNE T., PETERD L., TOTTE J., VLIETINCK A.J.** [1999]. Antimalarial activity of 20 crude extracts from nine African medicinal plants used in Kinshasa, Congo; *J. Ethnopharmacol*; 93,27-32.
- TOURTE Y.** [2002]. Génie génétique et biotechnologies : concepts, méthodes et applications agronomiques. 2ème édition, Biotech. Info, Dunod, Paris, 214 p.
- TOURTE Y., BORDONNEAU M., HENRY M., TOURTE C.** [2005]. Le monde des végétaux : organisation, physiologie et génomique. Dunod, Paris 384p.
- UGANDHAR T.** [2014]. An efficient protocol for in vitro propagation of *Phyllanthus odontadenius*. - A valuable medicinal plant. *J Pharmacovigilance*, 2 :5.
- UNANDER D.W., WEBSTER G.L., BLUMBERG B.S.** [1995]. Usage and bioassays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). IV. Clustering of antiviral uses and other effects. *J. Ethnopharmacology*, 45, 1, 1-18.
- UNANDER, D. W., WEBSTER G.L., BLUMBERG B.S.** [1991]. Uses and bioassays in *Phyllanthus odontadenius* (euphorbiaceae): a compilation II. The subgenus *Phyllanthus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 34. 97-133.



This work is in open access, licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>