

EFFETS INHIBITEURS DE QUELQUES EXTRAITS BRUTS ET SEMI PURIFIÉS DE PLANTES INDIGÈNES FRANÇAISES SUR LA MULTIPLICATION DE L'HERPESVIRUS HUMAIN 1 ET DU POLIOVIRUS HUMAIN 2 EN CULTURE CELLULAIRE

A.G. SUGANDA, M. AMOROS, L. GIRRE,*

*Laboratoire de Pharmacognosie et de Mycologie, Faculté de Pharmacie,
Avenue Léon-Bernard, 35043 Rennes Cédex, France*

et B. FAUCONNIER

*Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Faculté de Médecine,
Avenue Léon-Bernard, 35043 Rennes Cédex, France*

ABSTRACT.—Within a valorization program of natural regional resources, 50 ethanolic extracts of 41 indigenous plants have been subjected to chemical tests and antiviral screening.

Four plants: *Bryonia dioica*, *Anthyllis vulneraria*, *Matricaria chamomilla*, and *M. inodora* inhibit the growth of poliovirus. Furthermore, three (*A. vulneraria*, *M. chamomilla*, and *M. inodora*) have an antiherpetic effect.

De nombreuses plantes ont déjà fait l'objet d'un tri antiviral, le choix de ces végétaux étant souvent basé sur leur utilisation en médecine populaire. Une des plus anciennes études démontrant le potentiel antiviral des substances d'origine végétale a été faite par Green en 1949 (1), qui a pu inhiber la multiplication du virus grippal A par l'administration d'extrait de thé.

Plus récemment, Dorsett et coll. (2) ont décrit l'activité contre le virus grippal et le virus de l'herpès humain du gossypol et l'apogossypol extraits de la graine du coton. Après avoir montré que des flavonoïdes possèdent une action antivirale vis-à-vis des virus de l'herpès humain, Beladi et coll. ont trouvé en 1977 (3) que c'est le procyanidol qui possède l'action antiherpétique la plus forte; il est suivi par le pelargonidol, le quercétol et l'apigénol.

La même année, Ussery et coll. (4) ont montré que certaines protéines du *Phytolacca americana* inhibent la multiplication du virus poliomyélitique humain, tandis que Ehresmann et coll. (5) étudiant l'action antivirale de 28 espèces d'algues marines, découvrent que dix espèces de Rhodophytes sont actives sur le virus de l'herpès humain type 1 et 2.

Benn en 1980 (6) a recherché également l'action inhibitrice de 96 extraits végétaux sur la multiplication du virus de l'herpès humain type 1 et du virus poliomyélitique humain type 3. *Vincetoxicum officinalis* serait actif sur le virus de l'herpès humain type 1; *Centaurea aspera*, *Saxifraga hypnoides*, *Brunella grandiflora* et *Vincetoxicum officinalis* inhiberaient le virus poliomyélitique humain type 3.

Enfin, en 1981, Takechi et Tanaka (7) ont confirmé l'action antiherpétique de l'eugéniine, extraite des boutons floraux du *Syzygium aromaticum*.

En ce qui nous concerne, nos premiers travaux, publiés en 1977, ont décrit l'action antipoliomyélitique de *Cheiranthus cheiri* et d'*Anagallis arvensis*, ainsi que l'action antiherpétique de *Castanea sativa*, de *Chelidonium majus*, de *Cheiranthus cheiri*, d'*Ulex europaeus*, et d'*Anagallis arvensis* (8). En 1979, nous avons approfondi l'analyse de l'*Anagallis arvensis*, actif sur le virus de l'herpès humain type 1 et le virus poliomyélitique humain type 2 (9), et, en 1982, dans le cadre d'un programme de valorisation des ressources régionales naturelles, l'étude des propriétés antivirales de plantes indigènes se poursuit au laboratoire de Pharmacognosie de Rennes.

MATERIEL ET METHODES

MATÉRIEL VÉGÉTAL.—41 espèces sont étudiées (tableau 1). Dès la récolte, une alcoolature stabilisée est préparée selon le protocole décrit précédemment (8).

TABLEAU 1. Dose maximale non toxique et détermination de l'activité antiherpétique et antipoliomyélitique d'extraits éthanoliques de plantes par inhibition de l'effet cytopathogène.

Famille	Espèce	Organe étudié	D.M.N.T. (mg)	Activité de la D.M.N.T. sur	
				Herpès Virus	Polio Virus
Betulacées	<i>Betulus nigra</i>	P.E.	0,312	—	—
Borraginacées	<i>Borrago officinalis</i>	P.E.	0,156	—	—
Caprifoliacées	<i>Sambucus nigra</i>	P.E.	5	—	—
Caryophyllacées	<i>Lychnis dioica</i>	P.E.	0,625	—	—
	<i>Lychnis flos-cuculi</i>	P.E.	0,156	—	—
	<i>Silene nutans</i>	P.E.	0,156	—	—
Chenopodiacées	<i>Chenopodium album</i>	P.E.	5	—	—
	<i>Chenopodium polyspermun</i>	R.	0,156	—	—
	<i>Chenopodium polyspermun</i>	F. + T.	0,156	—	—
Composées	<i>Achillea ptarmica</i>	P.E.	1,25	—	—
	<i>Crepis taraxacifolia</i>	P.E.	2,5	—	—
	<i>Matricaria chamomilla</i>	P.E.	5	+	+
	<i>Matricaria inodora</i>	P.E.	2,5	+	+
	<i>Senecio vulgaris</i>	P.E.	1,25	—	—
	<i>Sonchus arvensis</i>	P.E.	0,625	—	—
Convolvulacées	<i>Convolvulus arvensis</i>	P.E.	1,25	—	—
Crucifères	<i>Sinapis arvensis</i>	P.E.	1,25	—	—
Cucurbitacées	<i>Bryonia dioica</i>	P.A.	5	—	+
Equisetacées	<i>Equisetum arvensis</i>	P.E.	1,25	—	—
Euphorbiacées	<i>Mercurialis perennis</i>	P.E.	1,25	—	—
Fagacées	<i>Quercus ruber</i>	F.	0,156	—	—
	<i>Quercus ruber</i>	B.	0,625	—	—
Geraniacées	<i>Geranium dissectum</i>	P.E.	2,5	—	—
Labiées	<i>Brunella vulgaris</i>	P.E.	0,625	—	—
Légumineuses-	<i>Anthyllis vulneraria</i>	P.E.	2,5	+	+
Papilionacées	<i>Cytisus laburnum</i>	F.	2,5	—	—
	<i>Cytisus laburnum</i>	Fl.	1,25	—	—
	<i>Cytisus laburnum</i>	T.	1,25	—	—
	<i>Lotus corniculatus</i>	P.E.	0,625	—	—
Oenotheracées	<i>Epilobium hirsutum</i>	P.E.	0,156	—	—
Ombellifères	<i>Bupleurum fruticosum</i>	F. + T.	0,156	—	—
Papavéracées	<i>Papaver rhoeas</i>	P.E.	5	—	—
Plantaginacées	<i>Plantago major</i>	P.E.	0,156	—	—
Polygonacées	<i>Rumex crispus</i>	P.E.	2,5	—	—
Polypodiacées	<i>Pteridium aquilinum</i>	P.E.	2,5	—	—
	<i>Pteridium aquilinum</i>	Rh.	2,5	—	—
Renonculacées	<i>Ranunculus repens</i>	P.E.	0,156	—	—
	<i>Ranunculus acris</i>	P.E.	0,039	—	—
	<i>Ficaria verna</i>	P.E.	0,625	—	—
Résédacés	<i>Reseda lutea</i>	P.E.	0,156	—	—
Rosacées	<i>Crataegus oxyacantha</i>	F.	0,312	—	—
	<i>Crataegus oxyacantha</i>	Fl.	0,312	—	—
	<i>Crataegus oxyacantha</i>	T.	0,156	—	—
	<i>Filipendula ulmaria</i>	P.E.	0,156	—	—
	<i>Filipendula ulmaria</i>	F.	0,125	—	—
	<i>Filipendula ulmaria</i>	T.	0,125	—	—
	<i>Rosa canina</i>	P.E.	0,312	—	—
	<i>Geum rivale</i>	P.E.	1,25	—	—
Salicacées	<i>Populus nigra</i>	F.	2,5	—	—
Scrofulariacées	<i>Linaria cymbalaria</i>	P.E.	0,625	—	—

D.M.N.T. = Dose maximale non toxique; P.E. = Plante entière; R = Racines; F = Feuilles; T = Tiges; B = Bois; Fl. = Fleurs; Rh. = Rhizome; P.A. = Partie aérienne.

— aucun effet antiviral.

+ effet antiviral positif sur 10 DI 50/ml et 1 DI 50/ml, après trois jours d'incubation.

Pour les essais virologiques, une fraction aliquote est évaporée sous vide et le résidu, repris par l'eau distillée bouillante, est stérilisé par filtration sur filtre Millex 0,45 mcm; 1 ml du filtrat correspondant à 1 g de plante fraîche.

Quand une espèce s'avère intéressante, l'alcoolature stabilisée est fractionnée de la manière suivante: 250 ml d'extrait éthanolique sont évaporés à sec et le résidu repris par 100 ml d'eau bidistillée bouillante. Cette solution aqueuse est filtrée deux fois sur papier pour éliminer les particules insolubles, puis épuisée successivement en ampoule à décanter par l'éther éthylique, l'acétate d'éthyle, et le *n*-butanol. Les extraits organiques sont évaporés à siccité sous pression réduite et les résidus repris par l'eau bidistillée bouillante (il n'y a pas de problème d'insolubilité puisqu'il s'agit d'une extraction sélective de composés hydrosolubles). Ces solutions sont stérilisées par filtration sur filtre Millex 0,45 mcm. La solution aqueuse résiduelle est filtrée directement sur filtre Millex 0,45 mcm. Les solutions aqueuses stériles obtenues ont une concentration de 1 g/ml par rapport à la plante fraîche.

Dans le tableau 2 qui regroupe les résultats de l'action antivirale de ces extraits purifiés, ils sont mentionnés respectivement sous les noms: Ether, acétate d'éthyle, butanol, eau.

TABLEAU 2. Dose maximale non toxique et détermination de l'activité antiherpétique et antipoliomyélitique d'extraits végétaux purifiés par inhibition de l'effet cytopathogène.

Extrait	D.M.N.T. mg	Activité sur	
		Polio virus	Herpès virus
<i>Matricaria chamomilla</i>			
Ether	5	—	—
Acétate d'éthyle	2,5	+	+
Butanol	1,25	+	+
Eau	1,25	+	+
<i>Matricaria inodora</i>			
Ether	5	—	—
Acétate d'éthyle	2,5	+	+
Butanol	2,5	+	+
Eau	2,5	+	+
<i>Anthyllis vulneraria</i>			
Ether	5	+	—
Acétate d'éthyle	2,5	+	+
Butanol	2,5	+	+
Eau	1,25	+	+
<i>Bryonia dioica</i>			
Ether	5	—	—
Acétate d'éthyle	2,5	—	—
Butanol	2,5	+	—
Eau	2,5	+	—

D.M.N.T. = Dose maximale non toxique

+ = activité inhibitrice positive

— = pas d'inhibition

SOUCHES DE VIRUS.—Les essais sont effectués avec deux souches de virus: le virus de l'herpès humain type 1 titrant 10^6 DI₅₀ par ml sur cellules Véro; le virus poliomyélitique humain type 2 (Sabin) titrant 10^6 DI₅₀ par ml sur cellules Véro.

CULTURE CELLULAIRE.—Les cellules utilisées sont des cellules de rein de singe (*Cercopithecus aethiops*) en culture continue, lignée de cellules Véro qui sont entretenues sur milieu nutritif MEM (Milieu de Eagle en solution de Earle) additionné de 10% de sérum de veau et d'antibiotiques: pénicilline G: 1 M UI/litre, gentamycine: 80 mg/litre.

EVALUATION DE LA TOXICITÉ DES EXTRAITS DE PLANTE SUR LES CELLULES VÉRO.—Les essais virologiques sont effectués sur des plaques à microtitrages de 96 cupules à fond plat.

Une suspension cellulaire à 400.000 cellules/ml est distribuée à raison de 0,1 ml par cupule.

Après 24 h, lorsque les cellules forment un tapis continu, on ajoute dans chaque trou 0,05 ml de dilution d'extrait de plante et 0,05 ml de milieu MEM additionné de sérum de veau et d'antibiotiques.

Les dilutions des extraits sont préparées selon une progression géométrique de raison 1/2 dans le

milieu MEM (+ sérum de veau et antibiotiques), la quantité maximale ajoutée aux cellules correspondant à 10 mg de plante fraîche. Sur une plaque à microtitrages, on détermine ainsi la toxicité de 12 plantes et pour chacune d'elles, la toxicité de 8 concentrations.

Après cinq jours d'incubation à 37°C, la toxicité des extraits est évaluée par examen des cellules au microscope. On retient la première concentration qui n'altère pas les cellules: c'est la dose maximale non toxique.

Les résultats sont mentionnés dans le tableau 1 (extraits bruts) et le tableau 2 (extraits actifs semi-purifiés).

EVALUATION DE LA TOXICITÉ DES SOLVANTS SUR LES CELLULES VÉRO ET SUR LA MULTIPLICATION DES VIRUS.—*n*-Butanol (50ml), d'acétate d'éthyle et d'éther éthylique sont évaporés à sec, puis le résidu de chaque solvant est repris par 2 ml d'eau bidistillée. On obtient ainsi la "solution à tester."

La suspension cellulaire utilisée pour l'évaluation de la toxicité des extraits de plante (40.000 cellules Véro dans 0,1 ml) est d'abord incubée à 37° pendant 24 h.

Toxicité des solvants sur les cellules véro.—Le deuxième jour, on ajoute 0,05 ml de la "solution à tester" et 0,05 ml du milieu MEM (+ sérum de veau et antibiotiques).

Un témoin est également préparé avec 0,05 ml d'eau bidistillée stérile et 0,05 ml du milieu cité ci-dessus. Après cinq jours d'incubation à 37°, la toxicité est évaluée selon les critères présentés précédemment.

Aucun des solvants ne s'est révélé toxique, tous les examens étant négatifs (12 essais par solvant).

Toxicité des solvants sur la multiplication des virus.—Le deuxième jour, on ajoute 0,05 ml de la "solution à tester" (pour l'essai) et 0,05 ml d'eau bidistillée stérile (pour le témoin virus).

Un témoin est également préparé avec 0,05 ml d'eau bidistillée stérile et 0,05 ml du milieu cité ci-dessus. Le troisième jour d'incubation à 37°, on ajoute à l'essai et au témoin virus 0,05 ml de diverses suspensions de virus à 1 ID₅₀, 10 ID₅₀ et 100 ID₅₀.

Après cinq jours d'incubation à 37°, la toxicité est évaluée selon les critères présentés précédemment. Aucun des solvants n'inhibe la multiplication des virus, tous les essais étant négatifs: les cellules traitées par le virus sont mortes, les cellules témoins vivantes (neuf essais par solvant).

DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ ANTIVIRALE DES EXTRAITS DE PLANTES.—*Par inhibition de l'effet cytopathogène:* Pour la détermination de l'effet cytopathogène, une suspension cellulaire à 400.000 cellules par ml est distribuée comme précédemment sur une plaque à microtitrages à raison de 0,1 ml par cupule, et portée 24 h à 37°.

Essai: Les cupules "essai" sont additionnées de 0,05 ml d'extrait de plante à la dose maximale non toxique et portées à nouveau à 37° pendant 24 h. 100 DI₅₀ de virus, sous un volume de 0,05 ml sont ensuite adjointes.

Témoin plante: La suspension virale est remplacée par 0,05 ml de milieu MEM.

Témoin virus: L'extrait de plante est remplacé par 0,05 ml de milieu MEM.

Témoin cellules: Les cupules contiennent 40.000 cellules Véro et 0,2 ml de milieu de culture.

Après trois jours d'incubation à 37°, le tapis cellulaire est examiné au microscope et l'effet cytopathogène noté de la façon suivante: — effet cytopathogène équivalent à celui du témoin-virus (100% de cellules mortes); + inhibition de l'effet cytopathogène (au minimum 75% de cellules vivantes).

Les résultats sont résumés dans le tableau 1 (extraits bruts) et le tableau 2 (extraits actifs semi-purifiés).

Par réduction du nombre de plages: Ces titrages sont réalisés en boîte à culture de 25 cm² contenant 2.500.000 cellules Véro. Chaque essai est effectué en triple exemplaire avec les extraits provoquant une inhibition de l'effet cytopathogène en plaque à microtitrages.

Essai: Le milieu d'entretien est additionné pendant 24 h de l'extrait de plante à la dose maximale non toxique. Puis ce milieu est éliminé et le virus inoculé à raison de 100 U.F.P. (unités formant plage) sous un volume de 0,2 ml. Après agitation douce une heure à température ambiante, le tapis cellulaire est recouvert d'une solution V/V de gélose à 2% et de milieu nutritif à double concentration dans lequel est dissous l'extrait de plante. Les boîtes sont reportées à 37° pendant trois jours. Les plages sont révélées par coulage d'une nouvelle couche de gélose additionnée de 2% de rouge neutre. La lecture est effectuée après 24 h.

Témoins: Des témoins virus, plante, cellules sont également préparés. Les résultats sont résumés dans le tableau 3.

TRI PRÉLIMINAIRE DES CONSTITUANTS CHIMIQUES DES EXTRAITS BRUTS RECONNUS ACTIFS.— On utilise les méthodes classiques de tri chimique sur les extraits des espèces actives (10, 11).

RESULTATS

EVALUATION DE LA TOXICITÉ DES EXTRAITS DE PLANTES SUR LES CELLULES VÉRO.—Le tableau 1 indique que certains extraits éthanoliques bruts sont nettement

TABLEAU 3. Détermination de l'activité antiherpétique et antipoliomyélitique d'extraits végétaux purifiés par réduction du nombre de plaques.

Plantes	Doses non toxiques	Pourcentage de diminution du nombre de plaques	
		Herpès virus	Polio virus
<i>Matricaria chamomilla</i>	300 mg	100%	56%
<i>Matricaria inodora</i>	150 mg	100%	100%
<i>Anthyllis vulneraria</i>	150 mg	100%	27%
<i>Bryonia dioïca</i>	300 mg		100%

toxiques, tels que ceux de *Borrago officinalis*, *Lychnis flos-cuculi*, *Silene nutans*, *Chenopodium polyspermum*, *Quercus ruber* (feuilles), *Epilobium hirsutum*, *Bupleurum fruticosum*, *Plantago major*, *Reseda lutea*, *Crataegus oxyacantha* (tiges), *Filipendula ulmaria*, *Ranunculus repens* et surtout *Ranunculus acris*.

D'autres, par contre, sont utilisables dès la dilution au 1/40^e, soit à la dose de 5 mg; ce sont ceux de *Sambucus nigra*, *Chenopodium album*, *Matricaria chamomilla*, *Bryonia dioïca* (feuilles et tiges) et *Papaver rhoeas*.

En ce qui concerne les extraits purifiés à partir des extraits bruts actifs, le tableau 2 montre que tous les extraits étherés sont utilisables dès la dose de 5 mg tandis que les extraits à l'acétate d'éthyle et les extraits butanoliques ne sont utilisables qu'à la dose maximale de 2,5 mg, (sauf celui du *Matricaria chamomilla* dont la dose maximale utilisable est 1,25 mg). Les extraits aqueux se montrent les plus toxiques, deux ayant une dose maximale utilisable de 2,5 mg (*Matricaria inodora* et *Bryonia dioïca*) et deux ne pouvant être utilisés qu'à la dose maximale de 1,25 mg (*Matricaria chamomilla* et *Anthyllis vulneraria*).

DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ ANTIVIRALE DES EXTRAITS DE PLANTES.—*Par inhibition de l'effet cytopathogène:* Le tableau 1 indique que quatre extraits éthanoliques bruts sont actifs envers le virus poliomyélitique utilisé: 2 à la dose maximale non toxique de 5 mg (*Bryonia dioïca* et *Matricaria chamomilla*); 2 à la dose de 2,5 mg (*Anthyllis vulneraria* et *Matricaria inodora*).

Ce tableau montre également que les extraits éthanoliques bruts de *Matricaria chamomilla*, *Matricaria inodora* et *Anthyllis vulneraria* inhibent l'effet cytopathogène du virus herpétique.

En ce qui concerne les extraits purifiés à partir des extraits bruts actifs, le tableau 2 met en évidence l'inactivité des extraits étherés. Les extraits purifiés les plus actifs, aussi bien sur le virus poliomyélitique que sur le virus de l'herpès, sont la solution butanolique et la solution aqueuse résiduelle du *Matricaria chamomilla*, ainsi que la solution aqueuse résiduelle de l'*Anthyllis vulneraria*.

Par réduction du nombre de plaques: Cette méthode a été utilisée pour mesurer de façon plus précise l'activité antivirale des extraits éthanoliques de *Matricaria chamomilla*, *Matricaria inodora*, *Anthyllis vulneraria* et *Bryonia dioïca*.

Une plante: *Matricaria inodora* est particulièrement intéressante, la réduction du nombre de plaques par rapport au témoin virus étant de 100% aussi bien pour le virus de l'herpès que pour le virus poliomyélitique.

Matricaria chamomilla et *Anthyllis vulneraria* sont également très actives contre le virus de l'herpès, l'inhibition du virus poliomyélitique étant cette fois plus faible.

Bryonia dioïca est très active sur le virus poliomyélitique (100% de réduction du nombre de plaques). Le test n'a pas été effectué avec le virus de l'herpès, les essais en microplaque étant négatifs.

TRI PRÉLIMINAIRE DES CONSTITUANTS CHIMIQUES DES EXTRAITS BRUTS RECONNUS ACTIFS.—Nous avons noté la présence de tanins galliquers chez les deux *Matricaires* et de flavonoïdes chez les quatre espèces actives. De plus, *Anthyllis vulneraria* a montré une réaction positive au test de Lieberman-Burchard et un indice de mousse qui encourage la recherche et l'analyse de saponosides.

Actuellement, les différents extraits purifiés ayant un degré d'activité intéressant sont soumis à un fractionnement approfondi afin d'en extraire et d'en étudier les principes actifs.

DISCUSSION

La technique utilisée pour le tri antiviral: inhibition de l'effet cytopathogène en plaque à microtitrages est intéressante car elle est facile à mettre en oeuvre, rapide et assez bien reproductible. Mais si elle met bien en évidence l'action antivirale d'un extrait, elle ne permet pas d'expliquer le mécanisme de l'inhibition.

Il pourrait s'agir d'une action virulicide: inactivation ou destruction du virus quand celui-ci est introduit dans les cupules contenant l'extrait de plante. Cette hypothèse ne peut convenir pour expliquer la réduction du nombre de plages, l'extrait de plantes étant rejeté avant inoculation du virus.

Les extraits pourraient aussi agir en modifiant la structure de surface de la cellule, en se fixant sur les récepteurs cellulaires, empêchant ainsi la pénétration du virus, donc sa réplication. Ce mécanisme peut intervenir dans les deux modes de titrage.

On peut également penser que les extraits, ayant pénétré à l'intérieur des cellules, inhibent, par un mécanisme, encore à élucider, une étape de la réplication virale.

L'étude du mécanisme d'action est actuellement en cours.

L'intérêt du titrage par plaques est de mesurer plus précisément l'importance de l'inhibition virale. Les titrages complémentaires seront effectués pour déterminer la DE_{50} (dose efficace permettant de réduire de 50% le nombre de plages).

A notre connaissance, l'action antivirale de *Matricaria inodora*, *Matricaria chamomilla*, *Anthyllis vulneraria* et *Bryonia dioica* n'a pas été signalée par d'autres auteurs.

Cependant, Chi-Kit Wat et coll. (12) ont décrit récemment l'activité phototoxique et antibiotique (contre *Saccharomyces cerevisiae*) d'extrait éthanolique de fleurs de *Matricaria chamomilla*.

L'action antifongique (envers *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* et *Candida albicans*) des principes actifs de *Matricaria chamomilla* et, notamment de l' α -bisabolol avait aussi été démontrée par Szalontai et coll. (13). Il ne nous semble pas que l'action antivirale soit liée à ce composé puisque notre extrait éthéré est inactif. Par contre, les extraits butanoliques, actifs, pourraient contenir des flavonoïdes, notamment des hétérosides d'apigénol et de luteolol, dont la présence dans *Matricaria chamomilla* et *Matricaria inodora* a été décrite par Hoerhammer (14). De même, Gonnet (15) a indiqué la présence d'hétérosides de quercétol et d'isorhamnétol chez *Anthyllis vulneraria*, ces composés pouvant également être présents dans notre extrait butanolique actif.

REMERCIEMENTS

Nous sommes heureux, à l'occasion de cette publication, de remercier très vivement la Fondation Langlois qui, par sa contribution financière, nous permet de maintenir notre effort de recherche et d'envisager favorablement la poursuite de notre programme scientifique de valorisation des ressources régionales naturelles.

Nous remercions également M.F. Fromont pour la dactylographie de cette publication.

BIBLIOGRAPHIE

1. R.H. Green, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **71** (1), 84 (1949).

2. P.H. Dorsett, E.E. Kerstine, L.J. Powers, *J. Pharm. Sci.*, **64** (6), 1073 (1975).
3. J. Beladi, R. Pusztai, I. Mucsi, M. Bakay, et M. Gabor, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **284**, 358 (1977).
4. M.A. Ussery, J.D. Irvin, et B. Hordesty, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **284**, 431 (1977).
5. D.W. Ehresmann, E.F. Deig, M.T. Hatch, L.H. Di Salvo, et N.A. Vendros, *J. Phycol.*, **13** (1), 37 (1977).
6. S. Benn, "Action inhibitrice *in vitro* sur la réplication de l'Herpès simplex et du Polio type III par 96 extraits végétaux," Thèse de Médecine, Angers, France, 1980.
7. M. Takechi et Y. Tanaka, *Planta Med.*, **42**, 69 (1981).
8. M. Amoros, B. Fauconnier et L. Girre, *Ann. Pharm. Fr.*, **35** (9-10), 271 (1977).
9. M. Amoros, B. Fauconnier et L. Girre, *Plant. Med. Phytother.*, **13** (2), 122 (1979).
10. A. Bouquet, "Plantes Médicinales du Congo-Brazzaville," Travaux et Documents de l'ORSTOM, 1972.
11. R. Paris et A. Nothis, *Plant. Med. et Phytother.*, **3** (4), 279 (1969).
12. C.K. Wat, T. Johns, et G.H.N. Towers, *J. Ethnopharmacol.*, **2**, 279 (1980).
13. M. Szalontai, G. Verzar-Petri, et E. Florian, *Acta Pharm. Hung.*, **46**, 232 (1976).
14. L. Hoerhammer, *Congr. Sci. Farm., Conference Communication: 21st*, Pisa, 578 (1961).
15. J.F. Gonnet, *Phytochem.*, **14** (3), 823 (1975).

Received 11 August 1982