

**RECHERCHES PRÉLIMINAIRES
SUR L'ACTION VIRICIDE ET ANTIVIRUS
DE QUELQUES PLANTES MÉDICINALES
DU CONGO-BRAZZAVILLE**

par A. A. SOULIMOV (*), A. BOUQUET (**), B. A. GLOUCHKO (*), I. P. FILATOV (*)
et A. FOURNET (**)(***)

La recherche de moyens non spécifiques de lutte contre les maladies infectieuses de l'homme et des animaux revêt une grande importance en l'absence de moyens spécifiques de protection. Au cours de recherche de ce type on s'est aperçu que des végétaux supérieurs, de même qu'ils étaient doués de propriétés bactériostatiques ou antibiotiques, pouvaient aussi avoir une action viricide ou antivirus nette.

C'est ainsi que W. CUTTING, E. FURUSAWA et coll. [4] en étudiant les extraits aqueux de 120 espèces végétales, ont montré que certains d'entre eux agissaient, *in vivo*, sur les virus de la chorioméningite, de l'herpès, de la variole et sur l'adenovirus type 12 — BALBAR et coll. [1], à partir des extraits de 620 plantes utilisées en médecine populaire, en Indé ont obtenu des résultats positifs contre les virus de la maladie de Newcastle et de la variole aviaire. Au cours d'un travail analogue portant sur 106 plantes de la République Populaire de Bulgarie, S. DOUNDANOV et P. ANDRONOV [5] ont établi certaines différences dans leur action contre les virus des maladies de Newcastle, d'Aujeszky, de l'herpès et de la variole aviaire ainsi que leur inefficacité contre le virus Koksaki B 6.

Dans le cadre de l'étude de la Pharmacopée congolaise effectuée depuis plusieurs années par l'ORSTOM, il nous a paru intéressant de rechercher

(*) Laboratoire Vétérinaire Scientifique (U. R. S. S.) à Brazzaville B. P. 235 à Brazzaville, République populaire du Congo.

(**) Laboratoire de Matière Médicale, ORSTOM, Centre de Brazzaville, B. P. 181, Brazzaville, République Populaire du Congo.

(***) Manuscrit reçu le 18 avril 1975.

TABLEAU 1

Influence des extraits sur l'activité d'hémoagglutination du virus de la maladie Newcastle

1	2	3	4	5	Extrait aqueux		Extrait alcoolique	
					Essai	Témoin	Essai	Témoin
					X ± m		X ± m	
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.	PAPILIONACÉE	<i>M. congolensis</i>	racine tige feuilles	4	192 ± 38 5 ± 03 112 ± 16	282 ± 63	24 ± 5 3,5 ± 05 128 ± 0	9,6 ± 1,6
2.		<i>M. Barteri</i>	racine tige feuilles	4	160 ± 32 224 ± 32 192 ± 28	282 ± 63	112 ± 16 28 ± 4,3 128 ± 0	9,6 ± 1,6
3.		<i>M. eetveldeana</i>	racine tige	4	256 ± 70 256 ± 70	282 ± 63	36 ± 10 55 ± 8,2	9,6 ± 1,6
4.		<i>M. versicolor</i>	racine tige	3	205 ± 46 128 ± 0	512 ± 0	213 ± 43 256 ± 0	10 ± 2

5.	OLACACÉE	<i>Strombosia grandifolia</i> Hook. f.	racine tige	3	427 ± 74 128 ± 0	512 ± 0	427 ± 74 80 ± 16	10 ± 2
6.		<i>Olax uschersoniana</i>	racine tige	3	11 ± 2,4 11 ± 2,4	512 ± 0	6,6 ± 1,3 11 ± 2,4	10 ± 2
7.		<i>Olax</i> sp.	racine tige	4	2,7 ± 0,6 11 ± 24	512 ± 0	2 ± 0 48 ± 9	10 ± 2
8.		<i>Olax latifolia</i> Engl.	racine tige	4	16 ± 0 5 ± 0,3	256 ± 0	47 ± 9,2 14 ± 2	24 ± 4,6
9.	MIMOSACÉE	<i>Piptadeniastrum africanum</i>	racine tige	4	128 ± 0 112 ± 0	256 ± 0	256 ± 0 256 ± 0	24 ± 4,6
10.		<i>Pentaclethra eetveldeana</i>	racine tige	4	512 ± 0 512 ± 0	512 ± 0	320 ± 64 512 ± 0	24 ± 4,6
11.	RUBIACÉE	<i>Porterandia cladantha</i>	racine tige	4	80 ± 16 80 ± 16	256 ± 0	4 ± 0 5 ± 0,3	24 ± 4,6
12.		<i>Brenania brieyi</i>	racine tige	4	213 ± 43 256 ± 0	512 ± 0	128 ± 0 80 ± 16	10 ± 2
13.	SCYTOPÉTALACÉE	<i>Brazzaeia congolensis</i>	racine tige	3	107 ± 22 128 ± 0	512 ± 0	320 ± 64 112 ± 16	10 ± 2
14.	RHAMNACÉE	<i>Maesopsis eminii</i>	racine tige feuilles	4	67 ± 18 6 ± 1,2 166 ± 38	256 ± 0	5,5 ± 8,2 160 ± 32 64 ± 18	9,6 ± 1,6

parmi les espèces utilisées en médecine traditionnelle au Congo [2] des plantes possédant une telle action.

Notre choix a porté sur les espèces suivantes, pour lesquelles les tests chimiques [3] laissaient supposer la présence de saponosides, ou qui nous avaient été indiquées pour leurs propriétés piscicides [2].

Mimosacées : *Pentaclethra eetveldeana* de Wild. et Th. Dur.
Piptadeniastrum africanum Bren.

Olacacées : *Olax latifolia* Engl.
Olax aschersoniana
Olax op (Herbier P. Sita N° 3350)
Strombosia grandifolia Hook. f.

Papilionacées : *Milletia barteri* (Benth.) Dunn
Milletia congolensis de Wild. et Th. Dur.
Milletia eetveldeana (de Wild.) Hauman
Milletia versicolor Welw. ex Bak.

Rhamnacées : *Maesopsis eminii* Engl.

Rubiacees : *Porterandia cladantha* (K. Schum.) Keay
Brenania brieyi Petit

Scytopétalacées : *Brazzaeia congolensis* Baill.

Pour chaque espèce les essais ont été effectués sur les extraits aqueux et alcooliques des feuilles, des écorces de tronc et de racines.

Ces extraits ont été testés sur le virus de la maladie de Newcastle, isolé lors de l'épizootie de la ferme d'Etat de Dolisie (déc. 1972).

Ce virus est conservé soit sur culture de fibroblastes d'embryon de poulet (F. E. P.), soit sur embryons de poulet.

Nous avons étudié successivement l'action viricide des différents extraits végétaux (Tableau 1), ainsi que la variation de cette activité en fonction du temps (Tableau 2).

— L'influence des extraits sur la survie des cultures de fibroblastes d'embryon de poulet (F. E. P.) (Tableau 3), ainsi que sur les embryons de poulet (3-2).

— L'action antiviral de ces mêmes extraits (Tableau 4).

Un témoin est effectué chaque fois en remplaçant les extraits par une égale quantité d'eau distillée ou d'alcool à 90°.

L'action viricide est mesurée par l'activité hémagglutinogène au cours d'une réaction d'hémoagglutination (H. A.) avec une suspension au 1/200^e d'érythrocytes de poulet. La toxicité des extraits est suivie par observation microscopique, 3 jours de suite, des modifications de la couche monocellulaire pour les cultures de F. E. P. ou de la mort des embryons des poulets constatée par ovoscopie.

— L'activité antiviral est évaluée d'après la survie des embryons. Une réaction d'H. A. est effectuée avec le liquide allantoïdien des embryons morts.

TABLEAU 2

Influence sur l'activité d'hémoagglutination du virus Newcastle en fonction du temps de contact

Plante	Partie de plante	Extrait aqueux				Extrait alcoolique			
		Le temps du contact en minutes							
		5	15	30	60	5	15	30	60
		X ± m				X ± m			
<i>Olax aschersoniana</i>	racine	13 ± 2,3	8 ± 0	6,6 ± 1,3	6,6 ± 1,3	8,8 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0
	tige	53 ± 10	27 ± 5,4	16 ± 0	13 ± 2,3	107 ± 21	53 ± 10	13 ± 2,3	8 ± 0
<i>Olax sp.</i>	racine	53 ± 10	6,6 ± 1,3	3,3 ± 0,2	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0
	tige	107 ± 21	27 ± 5,4	13 ± 2,3	16 ± 0	213 ± 43	107 ± 21	128 ± 0	64 ± 0
<i>Olax latifolia</i>	tige	32 ± 0	16 ± 0	6,6 ± 3	4 ± 0	non étudié			
<i>Porterandia cladantha</i>	racine	non étudié				8 ± 0	6,6 ± 1,3	8 ± 0	5,3 ± 1,3
	tige	non étudié				8 ± 0	8 ± 0	6,6 ± 1,3	6,6 ± 1,3
<i>Brenania</i>	racine	256 ± 0	213 ± 43	—	213 ± 43	256 ± 0	107 ± 21	128 ± 0	107 ± 21
	tige	213 ± 43	256 ± 0	213 ± 43	213 ± 43	107 ± 21	64 ± 0	64 ± 0	64 ± 0
<i>M. congolensis</i>	racine	112 ± 16	112 ± 16	112 ± 16	128 ± 0	53 ± 10	10 ± 2	8 ± 0	8 ± 0
	tige	14 ± 2	13 ± 2,7	7 ± 0,3	7 ± 0,3	10 ± 2	8 ± 0	8 ± 0	2,5 ± 0,5
	feuilles	128 ± 0	112 ± 16	112 ± 16	128 ± 0	256 ± 0	128 ± 0	80 ± 16	80 ± 16
Contrôle		512 ± 0	256 ± 0	256 ± 0	256 ± 0	32 ± 0	13 ± 2,3	10,2 ± 0	10,2 ± 0

TABLEAU 3

Influence des extraits des plantes sur la survie des cultures cellulaires F. E. P.

Plante	Extrait	Partie de plante	Dilution	Résultat	
				Essai 1	Essai 2
1. <i>M. barteri</i>	alcool	tige	1 : 50	+	+
			1 : 150	+	+
			1 : 200	—	—
2. <i>M. congolensis</i>	alcool	racine	1 : 50	+	+
			1 : 100	—	—
		tige	1 : 50	+	+
			1 : 100	—	—
3. <i>M. congolensis</i>	eau	tige	1 : 50	—	—
			1 : 150	—	—
4. <i>Olax latifolia</i>	eau	tige	1 : 50	+	+
			1 : 100	—	—
5. <i>Porterandia cladanta</i>	alcool	racine	1 : 100	—	—
			1 : 150	—	—
			1 : 200	—	—
		tige	1 : 100	+	+
			1 : 150	—	—
			1 : 200	—	—
6. <i>M. versicolor</i>	alcool	racine	1 : 50	+	+
			1 : 100	—	—
			1 : 150	—	—
		tige	1 : 50	+	+
			1 : 100	—	—
			1 : 150	—	—
7. <i>Olax aschersoniana</i>	alcool	racine	1 : 50	+	+
			1 : 100	—	—
			1 : 150	—	—
		tige	1 : 50	+	+
			1 : 100	+	+
			1 : 150	—	—
8. <i>Brazzaea congolensis</i>	alcool	racine	1 : 50	+	+
			1 : 100	—	—
			1 : 150	—	—
		tige	1 : 50	+	+
			1 : 100	—	—
			1 : 150	—	—
9. <i>Olax Sp.</i>	alcool	racine	1 : 50	+	+
			1 : 100	—	—
			1 : 150	—	—
		tige	1 : 50	+	+
			1 : 100	—	—
			1 : 150	—	—

Désignation : + extrait toxique ;
— extrait non toxique.

TABLEAU 4

Action antiviral des extraits in vivo

	Plante	Partie de plante	Extrait	Essai 1				Essai 2				Essai 3				% moyen de survie
				nombre d'embryons	mort	survie	% de survie	nombre d'embryons	mort	survie	% de survie	nombre d'embryons	mort	survie	% de survie	
1.	<i>M. congolensis</i>	racine tige feuilles.	alcoolique	8	6	2	25	8	5	3	37,5	10	6	4	40	30,8
				8	5	3	37,5	8	6	2	25	10	7	3	30	30,8
				8	8	0	0	8	7	1	12,5	10	8	2	20	10
2.	<i>M. eetveldeana</i>	racine tige	alcoolique	8	6	2	25	8	6	2	25	10	7	3	37,5	28,5
				8	7	1	12,5	8	8	0	0	10	10	0	0	4,1
3.	<i>M. versicolor</i>	racine tige	alcoolique	10	10	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
				10	10	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4.	<i>Olox latifolia</i>	tige	aqueux	10	3	7	70	10	4	6	60	—	—	—	—	65
5.	<i>Porterandia cladanta</i>	racine tige	alcoolique	10	4	6	60	10	5	5	50	—	—	—	—	55
				10	6	4	40	10	5	5	50	—	—	—	—	45
6.	<i>Olox aschersoniana</i>	racine tige	alcoolique	12	7	5	41,5	10	6	4	40	8	5	3	37,5	43
				12	8	4	33,3	10	6	4	40	8	5	3	37,5	40,2
7.	<i>Olox aschersoniana</i>	racine tige	aqueux	12	9	3	25	10	7	3	30	8	5	3	37,5	30,8
				12	9	3	25	10	7	3	30	8	6	2	25	27
8.	<i>Olox</i> sp. Herbar N. 3350	racine	alcoolique	12	12	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	
		racine	aqueux	12	12	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Extraits végétaux :

a) Extrait aqueux : infusion de 10 g de drogue sèche pulvérisée dans 100 ml d'eau distillée. Après refroidissement, filtration au buchner et, expression des marcs sous vide. Réajustement du filtrat à 100 ml.

b) Extrait alcoolique : ébullition sous réfrigérant ascendant pendant 20 mn de 10 g de drogue sèche pulvérisée dans 100 ml d'alcool éthylique à 90°. Après refroidissement, filtration sur buchner et, expression des marcs sous vide. Réajustement du filtrat à 100 ml.

Virus de Newcastle :

Les cultures sur œufs embryonnés ont une activité infectieuse du liquide allantoïdien de Log. DL 50 ; 8,5-8,66 (*), taux d'agglutination variant entre 1 : 256 et 1 : 1.024.

L'activité infectieuse du virus cultivé sur fibroblastes Log TCD (***) 50 : 8,0-8,33. Le titre d'HA variant entre 1 : 32 et 1 : 64.

Mesure de l'activité viricide :

Obtenue en mélangeant à parties égales (1 ml) extrait végétal et liquide de culture du virus, ou liquide allantoïdien. Le pH est ajusté à 7, 4-7, 6. Contact 1 h - ou temps variable dans le cas d'une mesure du temps minimum d'activité.

Un témoin est préparé en remplaçant l'extrait végétal par une même quantité d'eau distillée ou d'alcool à 90°.

L'action est mesurée par une réaction d'hémoagglutination (H. A.) avec une suspension à 1 pour 200 d'érythrocytes de poules.

Culture de tissus :

Culture en tube de fibroblastes d'embryon de poulet sur milieu de Hauks contenant 10 % d'hydrolysate de lactalbumine Difco.

Mesure de la toxicité sur les F. E. P. :

Le liquide de culture est remplacé par le même milieu contenant des doses croissantes d'extraits végétaux. Dans les témoins les extraits sont remplacés par une égale quantité d'eau ou d'alcool à 90°. L'action des extraits est appréciée par les modifications de la couche monocellulaire observée au microscope 3 jours de suite.

Influence sur les embryons de poulet :

Les lots d'œufs embryonnés de 9 à 10 jours reçoivent une injection de 0,1-0,2 ml d'extrait dans la cavité allantoïdienne-observation pendant 3 jours par ovoscopie.

Action antiviral :

Injection dans la cavité allantoïdienne des œufs embryonnés des extraits, puis après 30/40 mn, inoculation avec le virus de la maladie de Newcastle (Dose 100-100) (DIO).

Témoin : Inoculation du virus seul.

Contrôle par la survie des embryons et par Réaction d'H. A. avec liquide allantoïdien.

RÉSULTATS

1. *Action viricide.*

Les résultats des essais sont présentés dans le tableau 1. Ils mettent en évidence : l'activité viricide nette des extraits de tige de *Milletia congolensis*.

(*) 10^{8,5-8,66} DIO 50 (Dose infectant 50 % des œufs embryonnés).

(**) 10^{8,0-8,33} DICC 50/ml (Dose infectant 50 % des cultures cellulaires).

En effet par rapport au témoin, on constate que l'activité d'H. A. est presque totalement inhibée (5 (U. H. A.) (*) pour l'extrait aqueux et 8,5 pour l'extrait alcoolique). Par contre, les extraits aqueux et alcooliques de feuilles et les extraits aqueux de racines n'ont presque aucune activité. Les extraits alcooliques de racines possèdent une activité faible.

Les extraits aqueux des autres *Milletia* sont pratiquement sans activité. Les extraits alcooliques des tiges de *M. barteri*, de racines et de tiges de *M. eetveldeana* sont faiblement actifs.

Parmi les Olacacées étudiées, seuls les *Olax* ont une activité nette ; en particulier ceux d'*Olax* sp. (racine et tige) et d'*Olax latifolia* (tige).

Les deux Mimosacées (*Piptadeniastrum africanum* et *Pentaclethra eetveldeana*) et la Scytopétalacée testées sont sans activités. Parmi les Rubiacées étudiées, nous constatons que les extraits aqueux de racines et de tiges de *Porterandia cladantha* n'ont qu'une faible activité viricide et que les extraits alcooliques sont nettement plus actifs.

Nous avons ensuite comparé l'activité des extraits aqueux et alcooliques de *Milletia congolensis*, *M. barteri* et *M. eetveldeana* sur l'inhibition du virus de la maladie de Newcastle, en utilisant le virus en culture sur F. E. P. Les résultats sont identiques à ceux obtenus avec le liquide allantoïdien contenant le virus.

Les extraits de *M. congolensis* sont nettement les plus actifs et diminuent considérablement l'activité d'hémoagglutination de ces virus.

Nous avons étudié ensuite pour ces extraits les plus actifs, leur action en fonction du temps de contact (Tableau 2).

Pour les *Olax*, cette action est très nette au bout de 5 mn, elle atteint son maximum après 15 mn, puis reste stationnaire.

L'action des extraits alcooliques de tiges et de racines de *Brenania* est effective au bout de 5 mn et varie peu avec le temps de contact. Celle des extraits de tige de *Milletia congolensis* est un peu plus lente et atteint son maximum entre 15 et 30 mn.

2. Influence des extraits sur la survie des cultures F. E. P.

Les résultats sont exprimés dans le tableau 3. On constate que tous les extraits alcooliques sont toxiques à la dilution 1/50 — après 24 h de contact.

Seuls les extraits alcooliques de tiges d'*Olax aschersoniana* et de *M. Barteri* conservent leur toxicité à des dilutions supérieures (1/100 pour *Olax*, 1/150 pour *M. Barteri*).

Les extraits aqueux, sauf ceux de tige d'*Olax latifolia* ne sont pas toxiques à la dilution 1/50.

Au cours de cette expérience, les tubes témoins ne présentent aucune modification de la couche monocellulaire après 72 h d'observation.

(*) Unité d'hémoagglutination.

3. Influence des extraits sur la survie des embryons de poulet.

Les extraits aqueux introduits dans la cavité allantoïdienne des œufs embryonnés ne sont pas toxiques. L'extrait alcoolique de tige de *M. congolensis* à la dose de 0,2 ml n'est pas toxique. Les autres extraits testés provoquent, à la même dose, une perte partielle des embryons dans les 24 ou 48 h qui suivent l'inoculation.

4. Action antiviral des extraits in vivo.

Les résultats sont exprimés dans ce tableau 4 : seuls les extraits aqueux d'*Olex latifolia* et alcoolique de racines de *Porterandia cladantha* sont actifs, puisqu'on enregistre respectivement 65 et 55 % de survie des embryons.

M. congolensis, *Olex aschersoniana* sont faiblement actifs (respectivement 30,8 et 42 % de survie). Il est à signaler que les extraits de feuilles de *M. congolensis* sont 3 fois moins actifs que ceux de tiges ou de racines et que ceux de *M. versicolor* et d'*Olex* sp. sont sans action.

CONCLUSION

Nous avons étudié l'action viricide et antiviral sur le virus de la maladie de Newcastle des extraits aqueux et alcooliques des différentes parties végétatives de 14 plantes utilisées dans la Pharmacopée congolaise contre les abcès, la furonculose, la bronchite et la pneumonie, etc...

Nous avons trouvé que parmi les espèces étudiées, 6 réduisaient nettement l'activité d'H. A. du virus de la maladie de Newcastle.

L'activité viricide la plus importante était obtenue avec les extraits aqueux et alcooliques de tiges de *Milletia congolensis*, les extraits aqueux de racine et de tige d'*Olex* sp., *O. latifolia* et *Maesopsis eminii*.

Nous avons constaté au cours de ces essais :

- pour une même plante, des écarts importants dans l'activité des différentes parties végétatives (feuilles, tiges, racines),
- que l'activité d'un extrait pouvait varier avec le temps de contact.

Des essais comparatifs ont établi qu'il n'y a pas de différence entre l'action des extraits des Papilionacées sur l'activité d'H. A. du virus de la maladie de Newcastle et sur celle du liquide allantoïdien.

Au cours d'une autre série d'expériences, nous avons recherché l'action antiviral que pouvait avoir les extraits possédant une activité viricide. Des extraits de racine et de tige d'*Olex latifolia* introduits dans la cavité allantoïdienne d'œufs embryonnés, 35 à 40 mn avant l'inoculation de virus à la dose 100-1.000 DIO ont amené 27-65 % de survie par rapport au témoin. *Olex* sp. malgré son activité viricide, n'a pas d'action antiviral. L'extrait alcoolique de tige de *Porterandia cladantha* donne 44-55 % de survie. Les extraits alcooliques de racines et de tiges de *Milletia congolensis*, *M. eetvel-*

deana sont moins actifs (28-30 % de survie). Ceux de *M. versicolor* sont sans activité.

Les expériences effectuées sur diverses plantes utilisées en médecine populaire au Congo nous ont permis d'établir que *Olax latifolia*, *Milletia congolensis* et *Porterandia cladantha* possédaient une activité viricide et antiviral nette.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BALBAR (O. P.), CHOWIDHURY (B. L.), SINGH (M. P.), KHAN (S.) et BAYPAI (S.). — *Indian J. Exp. Biol.*, 1970, **8**, 304.
- [2] BOUQUET (A.). — Féticheurs et Médecines traditionnelles du Congo (Brazzaville). Mémoire ORSTOM n° 36. ORSTOM, Paris, 1969.
- [3] BOUQUET (A.). — *Travaux et Documents ORSTOM n° 13*. — ORSTOM, Paris, 1972.
- [4] CUTTING (W.), FURUSAWA (E.), FURUSAWA (G.) et WOO (Y. K.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1970, **120**, 330.
- [5] DOUNGOROV (S.) et ANDRONOV (P.). — Vtori kongrès mikrobiologuia tch. 3, Sofia, 1967 g.
- [6] FURUSAWA (E.) et CUTTING (W.). — *Proc. Soc. Exp. Biol and Med.*, 1966, **122**, 280.