HAL
open science

Caractérisation chimique et biologique de trois huiles essentielles répulsives issues de la biodiversité régionale contre l'alphavirus du Ross River

Miora Ralambondrainy

To cite this version:

Miora Ralambondrainy. Caractérisation chimique et biologique de trois huiles essentielles répulsives issues de la biodiversité régionale contre l'alphavirus du Ross River. Médecine humaine et pathologie. Université de la Réunion, 2017. Français. NNT : 2017LARE0018 . tel-01910886

HAL Id: tel-01910886

https://theses.hal.science/tel-01910886

Submitted on 2 Nov 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de La Réunion

THESE

Présentée pour l'obtention du diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LA REUNION

Spécialité : chimie des substances naturelles

Présentée par

Miora RALAMBONDRAINY

Caractérisation chimique et biologique de trois huiles essentielles répulsives issues de la biodiversité régionale contre l'alphavirus Ross River

Soutenance prévue le 27 septembre 2017 devant le jury composé de :

Pr Geneviève DIJOUX-FRANCA	Université de Lyon I	Rapporteur
Dr Chaker El KALAMOUNI	Université de La Réunion	Co-encadrant de thèse
Pr Pascale GUIRAUD	Université de La Réunion	Examinateur
Dr-HDR Véronique MONTERO	Université de Montpellier	Rapporteur
Dr-HDR Pierre ROQUES	Université Paris-Saclay	Co-directeur de thèse
Dr-HDR Jimmy SELAMBAROM	Université de La Réunion	Directeur de thèse

Cette thèse a reçu le soutien financier de la Région Réunion et de l'Union européenne (Fonds Social Européen).

Avant-propos

Cette thèse a été réalisée au sein de l'Ecole Doctorale Sciences Technologies Santé de l'Université de la Réunion (ED 542) et financée par une Allocation Régionale de Recherche par la Région Réunion. Les recherches ont été menées grâce au soutien financier de la Région Réunion et de l'Union Européenne (Fonds Social Européen).

Ce travail a débuté en décembre 2013 au sein du Groupe de recherche sur l'immunopathologie des maladies infectieuses (GRI) dirigé par le Pr Philippe GASQUE. En 2015, le GRI a intégré l'UMR PIMIT (Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, Université de la Réunion, CNRS 9192, INSERM U1187, IRD 249) dirigée par le Dr Patrick MAVINGUI. Cette UMR est implantée sur la plateforme de Recherche CYROI (Sainte-Clotilde, La Réunion).

Ces travaux de recherche ont été réalisés à partir de plantes généreusement mises à disposition par la CAHEB (Coopérative Agricole des Huiles essentielles de Bourbon).

Table des matières

AVANT-PROPOS 3

REMERCIEMENTS 4

ABREVIATIONS 10

LISTE DES FIGURES 12

LISTES DES TABLEAUX 14

TABLE DES MATIERES 4

RESUME 15

ABSTRACT 16

INTRODUCTION GÉNÉRALE 17

PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 19

I - LE VIRUS DU ROSS RIVER 20

I.1 - Arbovirus du Ross River 20

I.1.1 - Les arboviroses 20

I.1.2 - Impact des arboviroses 21

I.1.3 - Les alphavirus 21

I.2 - Vecteurs et modes de transmission 23

I.2.1 - Les vecteurs 23

I.2.2 - Les réservoirs 24

I.2.3 - Cycles de transmission du virus 24

I.3 - Epidémiologie 25

I.3.1 - Premières épidémies du RRV 25

I.1.1 - Distribution du virus en Australie 26

I.3.2 - Distribution du virus dans le Pacifique 27

I.4 - Physiopathologie 27

I.4.1 - Symptômes et manifestations cliniques 27

I.4.2 - Immunologie chez le modèle de la souris et les patients humains 27

I.5 - Biologie du virus 29

II - LA LUTTE CONTRE LE VIRUS DU ROSS RIVER 31

II.1 - Les répulsifs 32

II.1.1 - Les répulsifs cutanés 32

II.1.2 - Les répulsifs synthétiques 32

II.1.3 - Les répulsifs naturels 34

II.1.1 - Mécanismes d'action 37

II.1.2 - Avantages et limites des répulsifs synthétiques et naturels 38

II.2 - Vaccins 39

II.3 - Les antiviraux 40

III - LES HUILES ESSENTIELLES REPULSIVES 44

III.1 - *Cymbopogon citratus* 44

III.1.1 - Composition de l'huile essentielle 45

III.1.2 - Ethnopharmacologie 46

III.2 - *Pelargonium graveolens* 49

III.2.1 - Composition de l'huile essentielle 49

III.2.2 - Ethnopharmacologie 51

III.3 - *Vetiveria zizanioides* 52

III.3.1 - Composition de l'huile essentielle 53

III.3.2 - Ethnopharmacologie 54

PARTIE 2 : RESULTATS 56

I - CARACTERISATION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES 57

I.1 - *Cymbopogon citratus* 58

I.2 - *Pelargonium graveolens* 60

I.3 - *Vetiveria zizanioides* 60

II - CARACTERISATION BIOLOGIQUE 68

II.1 - Cytotoxicité 68

II.1.1 - Protocole optimisé pour les huiles essentielles 68

II.1.2 - Comparaison des tests colorimétriques courants de cytotoxicité 69

II.2 - Activité antivirale 71

II.2.1 - Permissivité des lignées cellulaires au virus du Ross River (RRV-T48) 72
II.2.1 - Mise au point d'un modèle d'étude pour le suivi de la réplication virale 74
II.2.2 - Effet cytoprotecteur des huiles essentielles 77
II.2.3 - Effet des huiles essentielles sur l'entrée du virus 79
II.2.4 - Effet des huiles essentielles sur la réplication virale 80
II.3 - Activité immuno-modulatoire 85
II.3.1 - Quantification des cytokines pro-inflammatoires et expression de leurs gènes 85
II.3.2 - Investigation des voies de l'inflammation impliquées lors d'une infection au RRV 87
PARTIE 3 : DISCUSSION 88
I - RENDEMENT DES HUILES ESSENTIELLES 89
II - PROFIL CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES 91
III - TOLERANCE CELLULAIRE DES HUILES ESSENTIELLES 100
IV - MECANISME D'ACTION ANTIVIRALE 102
V - MODULATION INDUITE DE L'IMMUNITE CUTANEE 104
PARTIE 4 : MATERIEL ET METHODES 108
1. MATERIEL VEGETAL 109
2. PREPARATION DES HUILES ESSENTIELLES 109
3. FRACTIONNEMENT DE L'HUILE ESSENTIELLE DE CITRONNELLE 109
4. CARACTERISATION CHIMIQUE 109
5. CULTURE CELLULAIRE 111
6. TEST MTT 111
7. TEST CRISTAL VIOLET 111
8. COLORATION AU BLEU DE TRYPAN 112
9. VIRUS 112
10. TITRAGE PAR PLAGES DE LYSE 113
11. IMMUNOFLUORESCENCE 113
12. FLUORESCENCE 114
13. BIOLUMINESCENCE 114

14. TRAITEMENT DES CLONES MOLECULAIRES AUX UV 114

15. EFFET CYTOPATHIQUE DES HUILES ESSENTIELLES 114

16. ACTIVITE VIRUCIDE DES HUILES ESSENTIELLES SUR RRV-T48 115

17. DETERMINATION DE L'EFFET DES HUILES ESSENTIELLES SUR L'ENTREE DU VIRUS 115

18. TEMPS D'ADDITION – DIFFERENTS SCENARIOS 116

19. DOSAGE DES CYTOKINES PAR QRT-PCR 116

20. QUANTIFICATION DES CYTOKINES PAR ELISA 117

21. SYSTEME DE GENE RAPPORTEUR POUR LA VOIE NF-KB 117

22. ANALYSE STATISTIQUE 118

BIBLIOGRAPHIE 120

ANNEXES 138

Remerciements

J'adresse mes remerciements au Pr Philippe GASQUE et au Dr Patrick MAVINGUI (DR CNRS) pour m'avoir accueillie au sein de leurs équipes, respectivement le Groupe de Recherche sur l'Immunopathologie des maladies infectieuses (GRI) puis dans l'unité mixte de recherche Processus Infectieux en Milieu insulaire (PIMIT).

Je remercie mon directeur de thèse, le Dr-HDR Jimmy SÉLAMBAROM, pour son investissement dans la réalisation de cette thèse. Merci en particulier pour les conseils avisés et les relectures approfondies de mes travaux au cours de ces années.

J'adresse aussi ma reconnaissance à mon co-directeur de thèse, le Dr-HDR Pierre ROQUES d'avoir rendu possible cette thèse. Merci de m'avoir accordé ta confiance pour cette thèse ainsi que pour les recommandations judicieuses.

Je tiens également à remercier mon co-encadrant de thèse, le Dr Chaker EL-KALAMOUNI pour son investissement tout au long de ce travail. Merci pour ta patience pendant ces années et pour tout ce que tu m'as transmis. Merci aussi d'avoir partagé avec moi les venues au laboratoire aux heures non conventionnelles.

Mes remerciements s'adressent également aux membres du jury de thèse. Pr Geneviève DIJOUX-FRANCA et Dr Véronique MONTERO merci d'avoir accepté d'évaluer mon travail et merci à Pr Pascale GUIRAUD d'avoir bien voulu être examinateur. Merci également au Pr Marie-Paule GONTHIER, au Dr Marjolaine ROCHE et au Dr. Thierry TALOU d'avoir participé à mon comité de suivi de thèse.

J'aimerai vivement remercier le Dr Marie WATSON et Laurent JANCY de la société Extraits de Bourbon et la CAHEB, pour avoir fourni gracieusement les plantes ainsi que votre matériel pour l'hydrodistillation des huiles essentielles. Merci de m'avoir laissé embaumer vos locaux. I would also like to thanks Renata BARANAUSKIENÈ and her laboratory for all the essential oil analysis and her availability to answer my questions.

Je remercie également les membres de l'unité PIMIT, dont l'équipe I2T pour toutes les discussions, les conseils, et l'aide apportée, tant scientifique que pratique. Merci au Pr Philippe DESPRÈS, et pas que pour le chocolat, au Dr. Wildriss VIRANAICKEN pour toute son aide technique, le Dr-HDR Gilles GADEA (CR INSERM), merci de m'avoir fait apprendre à aimer les PCR, le Dr Marjolaine ROCHE merci pour ta bonne humeur et d'avoir contribué à ce que je me sente bien de cette équipe, le Dr-HDR Pascale KREJBICH et tous les autres membres qui sont passés par le CYROI (Jean Jacques, Camille, Célestine, Pablo, Hervé, Erwan, …). Merci au Dr. Célestine ATYAMÉ pour son aide précieuse dans la relecture.

J’adresse mes plus grands remerciements à mes (premiers) compagnons de bureau, Etienne, Brice, Julien, Yann, Leon. Merci d’avoir été là pendant ces quelques années et pour tous ces souvenirs inoubliables. Vos encouragements m’ont été très précieux. Je n’oublie pas ceux arrivés plus tard, mais tout aussi sympas Elodie, Colette, Audrey, Sandra, Léa, Aude, et les plus récents encore Jonathan T, Wissal, Arnaud, Alexia, Jonathan S, Noura. Merci d’avoir bien voulu participer à la bonne ambiance du bureau, et merci pour vos contributions nourrissantes.

Je remercie aussi les autres thésards, jeunes docteurs et autres personnes rencontrées sur la plateforme du CYROI, Aurélie, Réhan, Anne-Claire, Florence, Céline, Latufa, Angélique A, Angélique G, Nico, Manu, Pierre, Jessica, Claire B., Imade, Johan… et la liste ne s’arrête pas là. Merci à tous d’avoir contribué à ce que ce soit une joie de venir au laboratoire.

Merci à Esther pour la motivation et tes encouragements dans cette même galère. Enfin je devrais dire Dr Esther ;) Je remercie également ma « famille élargie » (Natu, Audrey, Jonathan, Jean-Yves, Chebi, Isa, Fanette, François, Denis, Flo, Alexia …) d’avoir été à mes côtés chaque semaine. Merci pour vos prières, et de m’avoir suivie dans cette aventure jusqu’au bout.

Enfin, j’aimerai remercier ma famille : mes parents, mes frères et sœurs, merci pour votre soutien au quotidien, votre amour et votre aide pratique qui m’a permis de me concentrer sur ma thèse. Merci à mon frère Sam de m’avoir encouragée à me lancer dans cette aventure. Mes derniers remerciements vont à Celui par qui j’ai la vie et l’espérance.

Abréviations

ADN	Acide 2-désoxyribonucléique
ADN db	Acide 2-désoxyribonucléique double brin
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
AMM	Autorisation de mise sur le marché
AP1	Activator protein 1
ARN	Acide ribonucléique
ARN db	Acide ribonucléique double brin
ARNm	Acide ribonucléique messager
ARN sb	Acide ribonucléique simple brin
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATCC	American Type Culture Collection
BEI	Ethylèneimine binaire
BFV	Virus de la forêt de Barmah
BSA	Albumine de sérum bovin
BT	Bleu de trypan
CC	*Cymbopogon citratus*
CC_{10}	Concentration cytotoxique à 10 %
CC_{50}	Concentration cytotoxique à 50 %
$CCID_{50}$	50 % Cell culture infectious dose
CCM	Chromatographie sur couche mince
CD4+	Lymphocytes T auxiliaires
CD8+	Lymphocytes T cytotoxiques
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate
CHIKV	Virus du Chikungunya
CMC	Carboxyméthlycellulose
COV	Composé organique volatil
CV	Cristal violet
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DEET	*N,N*-diéthyl-*m*-toluamide
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
E2	Protéine de l'enveloppe
E.coli	*Escherichia coli*
EEEV	Virus de l'encéphalite équine de l'Est
EGTA	Acide éthylène glycol tétra-acétique
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FMV	Virus Fort Morgan
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GC-FID	Chromatographie gazeuse à détecteur à ionisation de flamme
GC-MS	Chromatographie gazeuse – spectrométrie de masse
GC-TOF	Chromatographie gazeuse – spectrométrie de masse à temps de vol
GFP	Protéine fluorescente verte
HRP	Enzyme peroxydase
HSV-1	Virus Herpès simplex de type 1

IFIT	IFN-induced protein with tetraticopeptide repeats
IFN	Interféron
IgG	Immunoglobuline G
IgM	Immunoglobuline M
IL	Interleukine
IR3535	N-acétyl-N-butyl-β-alaninate d'éthyle
ISG	Interferon stimulated genes
KI	Indice de rétention de Kovats
LPS	Lipopolysaccharide
MCP-1	Monocyte chimoattractant protein 1
MEM	Modified Eagle's medium
MID	Middleburg
MOI	Multiplicité de l'infection
MTT	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide
n.d.	Non déterminé
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NDUV	Virus de Ndumu
NO	Monoxyde d'azote
nsP	Protéine non structurale
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAMPS	Pathogen Associated Molecular Patterns
PCR	Amplification en chaîne par polymérase
PFA	Paraformaldéhyde
PFU	Plaque-forming unit
PBS	Tampon phosphate salin
PG	*Pelargonium graveolens*
PMDRBO	p-menthane-3,8-diol
PRRS	Pattern-Recognition Receptors
psi	Livre-force par pouce carré
qPCR	Amplification en chaîne par polymérase quantitative
RE	Réticulum endoplasmique
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RRV	Virus Ross River
RT-PCR	Amplification en chaîne par polymérase à transcription inverse
SDS	Laurylsulfate de sodium
SEAP	Phosphatase alcaline secrétée
SFV	Virus de la forêt de Semliki
TLR	Toll-like receptors
TMB	Tétraméthylbenzidine
TNF-α	Facteur de nécrose tumorale
USEPA	US environmental protection agency
UV	Ultraviolet
VEE	Encéphalite équine vénézuélienne
VZ	*Vetiveria zizanioides*
WEEV	Virus de l'encéphalite équine de l'ouest

Liste des figures

Figure 1 Classification de Baltimore des virus selon leur type de génome. 22
Figure 2 Arbre phylogénétique des alphavirus.. 23
Figure 3. Cycles de transmission du virus du Ross River. 25
Figure 4 Taux de signalement d'infection au virus Ross River entre 2013 et 2014 en Australie. 27
Figure 5 Structure d'un alphavirus avec sa capside et les protéines de l'enveloppe E1 et E2 (ViralZone) 29
Figure 6 Cycle de réplication d'un alphavirus d'après (Dupuis-Maguiraga et al., 2011) 30
Figure 7 Structure des principales molécules répulsives synthétiques 33
Figure 8 Structure de la peau. 38
Figure 9 Plante Cymbopogon citratus avec de longues feuilles. 45
Figure 10 Composés majoritaires de l'huile essentielle de Cymbopogon citratus. 45
Figure 11 Inflorescences de Pelargonium graveolens 49
Figure 12 Composés majoritaires de l'huile essentielle P. graveolens. 50
Figure 13 Racines et partie aérienne de Vetiveria zizanioides 52
Figure 14. Constituants majoritaires de l'huile essentielle de C. citratus. 58
Figure 15 Chromatogrammes de l'huile essentielle de citronnelle ou de ses fractions. 59
Figure 16. Constituants majoritaires de l'huile essentielle de géranium. 60
Figure 17 Constituants majoritaires de l'huile essentielle de vétiver.. 61
Figure 18 Viabilité cellulaire (HaCaT) lors d'un traitement par l'huile essentielle de citronnelle. 69
Figure 19 Viabilité cellulaire lors d'un traitement par l'huile essentielle de citronnelle.. 70
Figure 20 Viabilité cellulaire des cellules HaCaT lors d'un traitement par l'huile essentielle de citronnelle totale ou de sa fraction oxygénée. 71
Figure 21 Cellules SK-MEL28 infectées ou non par RRV-T48... 72
Figure 22 Cellules HS633T infectées ou non par RRV-T48.. 73
Figure 23 Cellules MRC-5 infectées ou non par RRV-T48.. 74
Figure 24 Mesure de la fluorescence de cellules HEK293T infectées par RRV-GFP. 75
Figure 25 Cellules MRC-5 (A) et HEK293 (B) GFP positives après infection par RRV-GFP à différentes MOI à 24 h et 48 h pi. 76
Figure 26 Activité luciférase des cellules épithéliales A549 (A) et HEK293 (B) infectées par RRV-renLuc à différentes MOI au cours du temps. 76
Figure 27 Validation du clone moléculaire RRV-renLuc. 77
Figure 28 Détermination de la cytotoxicité des huiles essentielles sur les cellules HEK293T.. 78
Figure 29 Viabilité des cellules HEK293T infectées par RRV-T48 (MOI de 2).. 79
Figure 30 Infectivité résiduelle de RRV-T48. 80
Figure 31 Produits de RT PCR déposés sur gel d'agarose. 80
Figure 32 Chronologie des différents traitements par l'huile essentielle sur les cellules HEK293T infectées par RRV-renLuc. 81

Figure 33 Activité antivirale de la chloroquine et des huiles essentielles de citronnelle, géranium et vétiver sur le virus Ross River. *82*
Figure 34 Inhibition de la réplication de RRV-renLuc (MOI de 2) selon différents traitements par l'huile essentielle.. ..... *84*
Figure 35 Inhibition de la réplication de RRV-renLuc (MOI de 2) par la fraction oxygénée de l'huile essentielle de géranium. *85*
Figure 36 Expression relative des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires. *86*
Figure 37 Production d'IL-6 dans les cellules HEK293T lors de l'infection par RRV-renLuc à 8 et 24 h post-infection. *86*
Figure 38 Voie de signalisation NF-κB lors de l'infection des cellules HEK Blue™ NF-κB par RRV-renLuc. *87*
Figure 39. Composés monoterpènes et sesquiterpènes majoritaires dans les huiles essentielles de citronnelle, géranium et vétiver. *92*

Listes des tableaux

Tableau 1 Huiles essentielles à activité répulsive *34*
Tableau 2 Antiviraux testés contre des alphavirus (études à partir de 2015) *42*
Tableau 3 Composition de l'huile essentielle de Cymbopogon citratus *46*
Tableau 4 Usages traditionnels de Cymbopogon citratus *47*
Tableau 5 Composition de l'huile essentielle obtenue à partir des feuilles de Pelargonium graveolens *50*
Tableau 6 Composition chimique de l'huile essentielle obtenue à partir des racines de Vetiveria zizanioides *53*
Tableau 7 Composition chimique de l'huile essentielle C. citratus (feuilles) de La Réunion.. ..... *62*
Tableau 8 Composition chimique de l'huile essentielle de P. graveolens (feuilles) de La Réunion. *63*
Tableau 9 Composition chimique de l'huile essentielle V. zizanioides (racines) de La Réunion. *65*
Tableau 10 Valeurs CC_{50} (µg/mL) lors d'un traitement par l'huile essentielle de citronnelle. *71*
Tableau 11 Valeurs de cytotoxicité des huiles essentielles sur les cellules HEK293T *78*
Tableau 12 Composition chimique de l'huile essentielle de C. citratus (feuilles) de la Réunion.. ..... *94*
Tableau 13 Composition chimique de l'huile essentielle de P. graveolens (feuilles) de La Réunion. *96*
Tableau 14 Composition chimique de l'huile essentielle de V. zizanioides (racines) de la Réunion.. ..... *98*
Tableau 15 Principales caractéristiques des huiles essentielles *101*
Tableau 16 Amorces utilisées *115*
Tableau 17 Amorces utilisées pour le dosage des cytokines par qRT-PCR *117*

Résumé

Les huiles essentielles de citronnelle (*Cymbopogon citratus*), de géranium (*Pelargonium graveolens*) et de vétiver (*Vetiveria zizanioides*) sont utilisées partout dans le monde pour leur activité répulsive contre les principaux vecteurs (moustiques, tiques) de maladies infectieuses chez l'Homme (paludisme, chikungunya, dengue…). L'application cutanée de ces produits naturels pour éviter le contact avec un vecteur n'avait pas été encore envisagée comme moyen de limiter les premiers stades de l'infection par l'agent pathogène transmis par le vecteur.

Pour vérifier cette hypothèse, les travaux ont été consacrés à la mise en place d'un cadre structuré pour la réévaluation chimique et biologique des trois huiles essentielles isolées à partir de plantes fournies par une coopérative locale (CAHEB, La Réunion) sur le modèle du virus Ross River (alphavirus) de la même famille que le virus Chikungunya. Le virus Ross River est endémique de l'Australie et conduit chaque année à des épidémies. L'infection chez l'Homme par de multiples vecteurs compétents se manifeste généralement par des douleurs articulaires.

La caractérisation chimique des huiles essentielles avec une technique de haute résolution (GC×GC/TOF-MS, Kaunas University of Technology, Lituanie) a permis d'établir leur profil chémotypique précis pour caractériser la production réunionnaise. La caractérisation biologique *in vitro* des huiles essentielles a été menée avec des doses non cytotoxiques, déterminées via un protocole optimisé en raison de leur volatilité sur des lignées cellulaires représentatives d'une application cutanée (kératinocytes, mélanocytes et fibroblastes). Il a été montré que la tolérance vis-à-vis de l'huile essentielle ne nécessite pas de traitement supplémentaire (composition réduite en hydrocarbures). L'activité antivirale des trois huiles essentielles a été ensuite comparée sur une lignée de cellules épithéliales humaines (HEK293T) suffisamment permissives au virus et à l'aide de différentes techniques immuno-virologiques. L'utilisation de marqueurs spécifiques (clones moléculaires du virus avec des gènes rapporteurs, CEA de Saclay) a permis d'établir l'inhibition de la réplication virale en fonction des conditions d'application des huiles essentielles de géranium et citronnelle (dose ; exposition précoce, concomitante ou tardive avec le virus). Enfin, il a été montré que les huiles essentielles étudiées permettaient de réduire la réponse pro-inflammatoire induite par l'infection virale.

Ces résultats suggèrent l'intérêt prolongé sur la peau d'une huile essentielle répulsive dans les premiers stades d'une infection par un vecteur. A ce titre, l'étude comparative établit la haute valeur ajoutée de l'huile essentielle de géranium et oriente la recherche de nouveaux anti-infectieux naturels vers des complexes riches en monoterpènes.

Mots clés : huiles essentielles ; répulsifs naturels cutanés ; *Cymbopogon citratus* ; *Pelargonium graveolens* ; *Vetiveria zizanioides* : virus Ross River ; alphavirus ; activité antivirale ; activité anti-inflammatoire

Abstract

Essential oils of citronella (*Cymbopogon citratus*), geranium (*Pelargonium graveolens*) and vetiver (*Vetiveria zizanioides*) are used worldwide as topical repellent against the main vectors (mosquitoes, ticks) of human infectious diseases (Malaria, chikungunya, dengue…). Skin treatment with these natural products, initially to avoid contact with the vector had not yet been considered as a way to disrupt the early stages of infection when the repelling action fails.

To check this hypothesis, a structured framework has been performed for the chemical and biological re-evaluation of the three essential oils. The latter was obtained from plants provided by a local cooperative (CAHEB, La Reunion) and was tested against Ross River virus (alphavirus) that belongs to the same family of Chikungunya virus. Ross River virus is endemic from Australia and leads annually to disease outbreaks. Human infection, by multiple competent vectors, usually causes joint pain.

Analysis of essential oils using a high-resolution technique (GC × GC / TOF-MS, Kaunas University of Technology, Lithuania) resulted in a more accurate chemotypical profile of the local production. The *in vitro* study of essential oils was carried out on acceptable doses determined by an improved protocol that takes into account their volatility and on typical cell lines of a cutaneous application (keratinocytes, melanocytes and fibroblasts). In particular, we showed that further treatment of the essential oil (reduced composition in hydrocarbons) do not provide any advantage for their tolerance. The antiviral effect of the three essential oils was then compared on an epithelial cell line (HEK293T) sufficiently permissive to the virus and using various immuno-virological assays. The use of specific markers (molecular clones of the virus, Saclay CEA) allowed to establish the inhibition of viral replication depending of the conditions of geranium and citronella essential oils application (dose, early, concomitant or late exposure to the virus). Finally, essential oils have been shown to reduce the pro-inflammatory response induced by viral infection.

These results suggest the great interest of an essential oil topical repellent in the early stages of a vector infection. The comparative study established the high value of geranium essential oil and gave future direction to the discovery of new anti-infectious solutions from monoterpenes-rich natural complexes.

Key words: essential oils; natural skin repellents; *Cymbopogon citratus*; *Pelargonium graveolens*; *Vetiveria zizanioides*; Ross River Virus; alphavirus; antiviral activity.

Introduction générale

Par sa position en zone tropicale, La Réunion est concernée par des maladies à transmission vectorielle. Ces dernières sont dues à des microorganismes pathogènes tels que les virus, les bactéries ou les parasites et impliquent le plus souvent les arthropodes hématophages comme vecteurs. Plusieurs espèces de moustiques présentes sur l'île sont capables de transmettre des arbovirus à l'Homme et ont été responsables d'épidémies. Le risque de ces maladies au-delà de la zone concernée est amplifié par la mondialisation des échanges. La prévention des arboviroses est ainsi devenue plus qu'un enjeu régional et s'inscrit désormais dans une problématique de santé publique à l'échelle planétaire. L'enjeu est d'autant plus important qu'on observe depuis ces dernières décennies une recrudescence de virus émergents ou ré-émergents (Jones et al., 2008). Plusieurs de ces virus existent parfois depuis de nombreuses années sans incidence sur la santé humaine. Ils deviennent pathogènes chez l'Homme et responsables d'épidémies suite à des modifications et adaptations du virus à son environnement.

La problématique des arboviroses a été renouvelée avec la crise causée par l'alphavirus du Chikungunya à La Réunion en 2005-2006 (Staikowsky et al., 2008). Près d'un tiers de la population a été touché et la maladie associée s'est propagée aux autres îles de l'océan Indien, en Asie, ainsi qu'au continent américain. Cette épidémie a eu des répercussions économiques et sanitaires importantes. Dans la zone de l'océan Indien, le virus Ross River est responsable chaque année d'une épidémie en Australie et se distingue particulièrement dans la famille des alphavirus. En effet, ce virus est capable de se répliquer dans un large spectre d'hôtes vertébrés et de vecteurs. Ces multiples combinaisons hôtes-vecteurs rend difficile la prévision des épidémies.

Dans le contexte des arboviroses, la recherche des deux principaux moyens dirigés spécifiquement contre le virus s'est considérablement développée (Kaur and Chu, 2013) (Abdelnabi et al., 2015). Il y a d'une part les antiviraux qui ciblent les enzymes virales impliquées dans la réplication mais ils n'interviennent qu'une fois l'organisme infecté Il y a d'autre part les vaccins qui consistent à introduire un agent extérieur non pathogène afin de susciter une réaction immunitaire spécifique contre le virus. L'immunité acquise permet alors une stimulation rapide du système immunitaire en présence du virus. Les antiviraux, comme les vaccins, se caractérisent par une action systémique et sont reconnus avec des efficacités variables. Leur mise au point reste toujours confrontée à leur sélectivité pour le virus et la tolérance pour l'organisme hôte.

La prévention des arboviroses repose également sur des moyens moins spécifiques du virus, comme les répulsifs dirigés contre le vecteur pour éviter son contact avec l'hôte. Les répulsifs les plus

courants sont utilisés en application cutanée, parmi lesquels on peut distinguer les répulsifs d'origine synthétique des répulsifs d'origine naturelle et notamment les huiles essentielles. Contrairement aux antiviraux et aux vaccins, les répulsifs peuvent être librement utilisés et constituent jusqu'ici un moyen de protection personnelle contre les piqûres du vecteur. Pourtant, leur application sur la peau et l'absorption cutanée des composés lipophiles créent une zone de contact avec l'arbovirus avant que celui-ci ne progresse dans l'ensemble de l'organisme. On peut alors considérer ce site anatomique pour les premiers stades de l'infection lorsque le virus est introduit par la piqûre d'un moustique vecteur. Le traitement de cette interface par les huiles essentielles en mesure préventive d'une transmission vectorielle n'a jamais été considéré jusqu'ici comme un moyen de contrôler les premiers stades de l'infection virale.

Dans ce contexte, cette étude vise à évaluer les capacités anti-infectieuses de trois huiles essentielles répulsives contre l'alphavirus Ross River. L'évaluation a porté sur les huiles essentielles de *Cymbopogon citratus*, *Pelargonium graveolens* et *Vetiveria zizanioides* qui présentent un intérêt économique pour La Réunion (Lawrence, 2009). Aujourd'hui, ces huiles sont produites artisanalement pour un marché essentiellement limité au secteur de la cosmétique. L'objectif de cette étude est donc de valoriser ces trois huiles essentielles répulsives pour des activités supplémentaires qu'elles pourraient présenter contre l'infection par le virus Ross River.

L'étude combine ainsi la caractérisation chimique des mélanges complexes que forment les huiles essentielles et leur évaluation biologique par la recherche et la mise au point d'un modèle cellulaire permettant de suivre les premiers stades de l'infection avec des indicateurs qui se rapportent à la réplication virale e à une réponse immunitaire. Ces travaux sont présentés en trois parties :

- la première partie se rapporte à une analyse bibliographique pour un état des lieux sur l'arbovirus Ross River ainsi que les stratégies et moyens d'intervention disponibles contre les arboviroses ;
- une deuxième partie décrit les résultats de la démarche expérimentale mise en œuvre pour la réévaluation des huiles essentielles avec leur composition mieux résolue ;
- la troisième partie concentre une discussion des résultats au regard du cadre structuré qui a été mis au point pour la réévaluation des huiles essentielles répulsives.

PARTIE 1 : Arbovirus Ross River et substances naturelles

I - Le virus Ross River

La fièvre Ross River est une maladie infectieuse due à un virus transmis par un vecteur hématophage comme le moustique. Le virus Ross River est caractérisé par une grande combinaison d'hôtes (hommes, moustiques, marsupiaux) et de vecteurs potentiels (*Aedes, Anopheles*, *Culex*, …) qui implique une vigilance particulière aussi bien dans la dynamique vectorielle surveillance que dans la prévention de la maladie infectieuse associée.

Les moyens de prévention face aux maladies infectieuses ont conduit à s'intéresser de plus en plus à l'étude approfondie du virus et de son mode de transmission. Les progrès réalisés sur la biologie des arbovirus a permis d'ouvrir des nouvelles stratégies d'intervention pour la prévention de la maladie qu'ils causent.

I.1 - Arbovirus Ross River

I.1.1 - Les arboviroses

Les arboviroses sont définies comme des maladies infectieuses dues à des arbovirus (pour la contraction d'*arthropod-borne virus*). Les arbovirus sont donc associés par définition aux insectes et autres arthropodes qui forment les « vecteurs » et assurent la transmission du virus aux vertébrés. La transmission est donc le fait des arthropodes suceurs de sang comme les moustiques, les tiques ou encore les phlébotomes. Les infections peuvent être « terminales » lorsque le vertébré qui développe ou pas une maladie ne peut transmettre l'agent pathogène. Les arbovirus ayant un impact en termes de santé publique sont pour la plupart impliqués dans un cycle d'amplification où le vertébré infecté va être la source d'infection de vecteurs naïfs qui, à leur tour, vont répliquer le virus et propager l'infection à un autre vertébré naïf lors d'un repas de sang. Il y a alors un cycle épidémique.

Par la dynamique des vecteurs, les arbovirus constituent la classe majeure des maladies émergentes ou ré-émergentes dans le monde (Jones et al., 2008). Ces dernières se rapportent soit à des nouveaux virus qui peuvent toucher l'espèce humaine, soit à des virus responsables de maladies déjà connues mais dont l'origine virale n'était pas connue, soit à des virus responsables de maladies animales et qui infectent désormais l'homme.

Les arboviroses sont devenues un problème de santé publique à l'échelle planétaire, leur expansion étant favorisée notamment par l'intensification des échanges économiques et sociaux. D'après

l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), elles provoquent plus d'un million de décès chaque année ("WHO | Fact sheets,").

I.1.2 - Impact des arboviroses

Les arbovirus appartiennent à plusieurs familles virales : *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Reoviridae* et *Bunyaviridae*. Aujourd'hui, la dengue (flavivirus) concerne plus de 2,5 milliards de personnes dans plus de 100 pays. Le virus du Chikungunya (alphavirus) a été responsable en 2005-2006 d'une épidémie localisée dans l'océan Indien avec 35 % de la population de La Réunion touchée par la fièvre du Chikungunya (Bala Murugan and Sathishkumar, 2016), puis il a été identifié dans près de 40 pays. Le flavivirus Zika est lui aussi responsable d'épidémies dans plusieurs pays (Polynésie française, Brésil, Colombie) et avait été décrété comme une urgence de santé publique de portée internationale par l'OMS de février à novembre 2016. En France, un plan anti-dissémination du Chikungunya, de la Dengue et de Zika a été alors mis en place par le ministère en charge des affaires sociales et de la santé. Les arboviroses les plus importantes, du fait de leur fréquence ou de leur récente émergence ou réémergence, sont issues des familles *Flaviviridae* (Zika, dengue, fièvre jaune) et *Togaviridae* (Chikungunya, maladie du West Nile).

I.1.3 - Les alphavirus

La famille des *Togaviridae* comprend entre autres, le genre alphavirus (Jose, Snyder, and Kuhn 2009). Cliniquement, les alphavirus peuvent être de l'Ancien Monde et associés à des éruptions cutanées et arthralgies ou du Nouveau Monde et associés à des encéphalites. Selon la classification de Baltimore, les alphavirus appartiennent au groupe IV. Cette classification répartit les virus selon leur mode de synthèse des ARN messagers et donc selon le type d'acide nucléique du génome viral (ADN ou ARN, simple ou double brin). Les alphavirus du groupe IV correspondent donc à des virus à ARN simple brin à polarité positive (Figure 1).

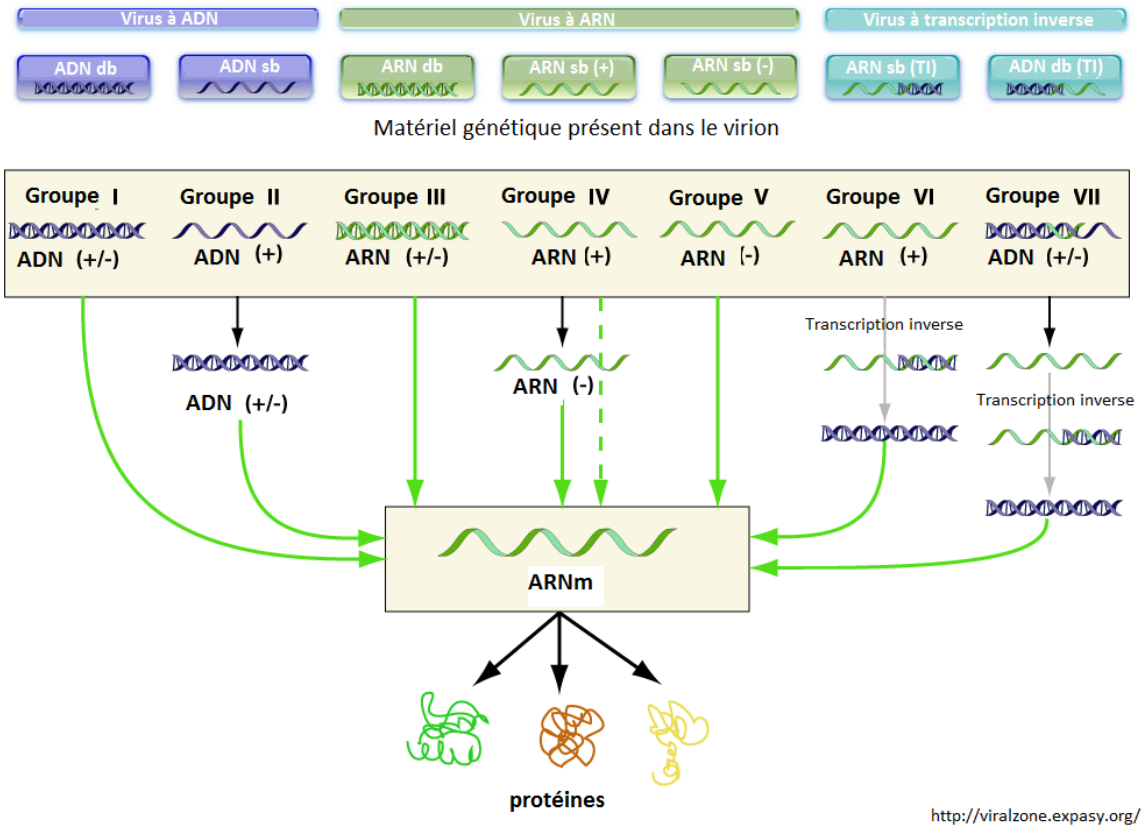


Figure 1 Classification de Baltimore des virus selon leur type de génome.

Pour les alphavirus, on compte sept complexes antigéniques (Figure 2) avec le virus de la forêt de Barmah (BFV), le virus de l'encéphalite équine de l'Est (EEEV), le virus Middelburg (MIDV), le virus Ndumu (NDUV), le virus de la forêt de Semliki (SFV), le virus de l'encéphalite équine vénézuélienne (VEEV) et le virus de l'encéphalite équine de l'ouest (WEEV) (Strauss and Strauss, 1994).

Le virus Ross River (RRV) est un alphavirus dit de l'Ancien Monde et qui appartient au complexe antigénique du virus de la forêt Semliki (Figure 2). Le virus Ross River est endémique de l'Australie et a été identifié la première fois en 1958 sur des moustiques dans le nord-est du pays (Doherty et al., 1963). Le premier isolat clinique date de 1972. Le virus est actif dans toutes les régions d'Australie mais différentes souches ont été identifiées selon les régions et la virulence de ces souches varie sur les souris et les moustiques (Richard C. Russell, 2002).

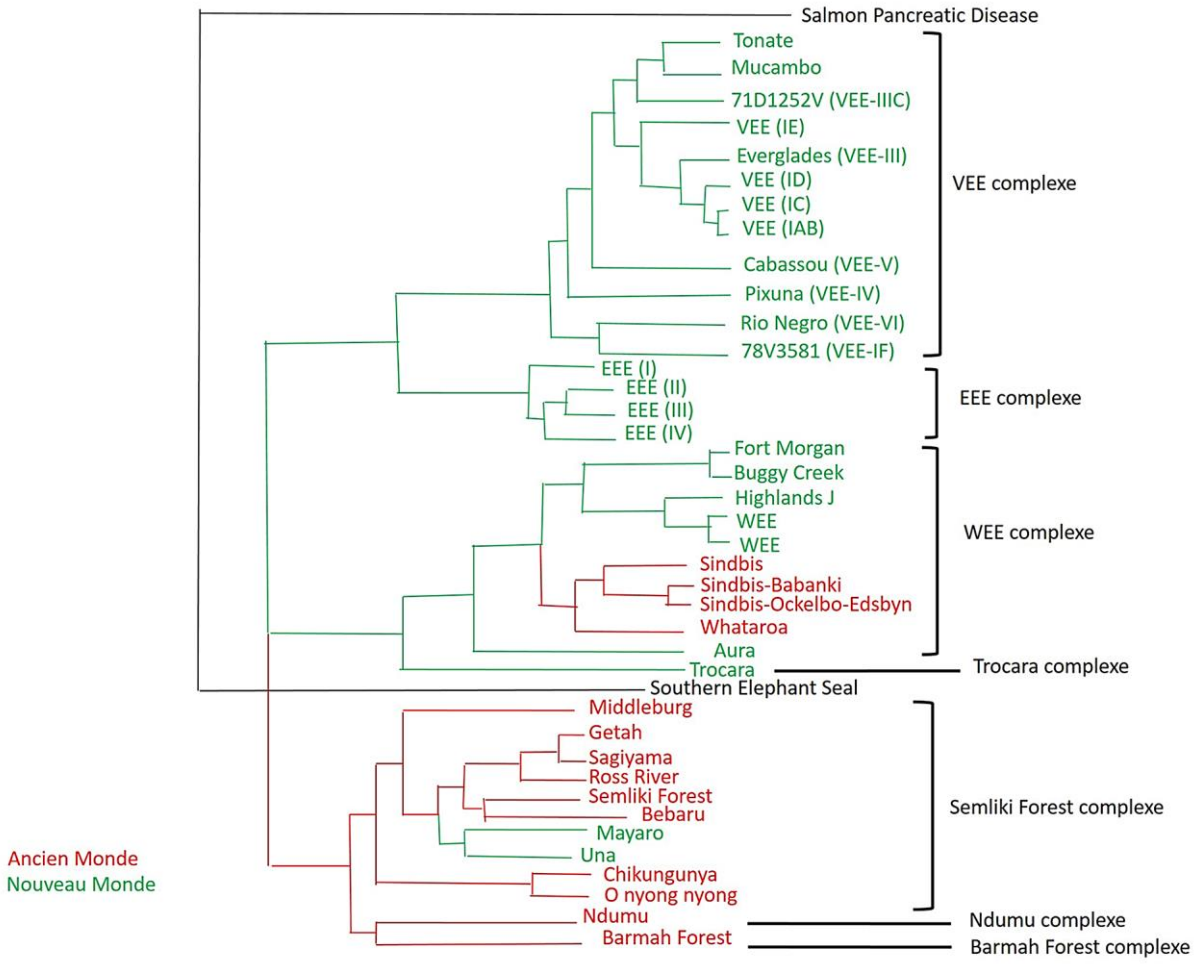


Figure 2 Arbre phylogénétique des alphavirus. Ce dernier est obtenu à partir des gènes codants pour les protéines structurales E2, 6 K et E1 (Weaver et al., 2012).

I.2 - Vecteurs et modes de transmission

I.2.1 - Les vecteurs

Comme pour tous les arbovirus, le virus associé à la fièvre Ross River est transmis par un arthropode hématophage. De nombreuses espèces de moustiques semblent être impliquées dans la transmission du virus. En effet, le virus Ross River a pu être isolé à partir de 42 espèces de moustiques et 10 de ces espèces sont réputées capables de transmettre le virus dans les conditions du laboratoire (compétence vectorielle). Ces espèces appartiennent aux genres *Aedes*, *Anopheles*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Culiseta*, *Mansonia* et *Tripteroides*. Cette grande diversité d'espèce de moustiques est corrélée à différents environnements de l'Australie (urbain, rural, arrière-pays, côte) (Richard C. Russell, 2002).

Les principaux vecteurs identifiés sont *Aedes vigilax*, *Aedes camptorhynchus*, *Culex annulirostris*, d'après plusieurs études se basant sur le nombre d'isolats du virus Ross River, l'infection et la

transmission du virus en conditions de laboratoires ainsi que l'abondance de ces espèces et de leurs isolats lors des épidémies (Mackenzie et al., 1994 ; Harley et al., 2001). Les premiers isolats ont été réalisés sur les moustiques *Aedes vigilax* (Doherty et al., 1963). Toutefois les moustiques des genres *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* sont susceptibles d'être infectés et sont capables de transmettre le virus. Or, ce sont des espèces retrouvées dans de nombreux pays tempérés et tropicaux. Bien que le virus Ross river n'a pu être isolé des moustiques sauvages *Aedes aegypti*, ils ont été retrouvés en abondance lors d'épidémies de la fièvre du virus Ross River (Richard C. Russell, 2002 ; Claflin and Webb, 2015).

I.2.2 - Les réservoirs

En plus des vecteurs que sont les moustiques, les espèces réservoirs jouent un rôle dans le cycle de transmission du virus. Pour le virus Ross River, les réservoirs identifiés sont principalement des macropodes qui ne migrent pas, comme les kangourous et les wallabies (Old and Deane, 2005). Cette identification se base sur des tests sérologiques et des études en laboratoire. Ainsi, le virus Ross River a été isolé des wallabies agiles *Macropus agilis* et l'étude de la prévalence des anticorps au virus Ross River suggère un taux important d'infection (Doherty et al., 1971).

Toutefois ces macropodes ne sont pas trouvés en milieu urbain. D'autres animaux doivent donc être impliqués du fait des épidémies citadines, comme peut-être les opossums d'Australie dans lesquels du virus Ross River a été détecté (Vale et al., 1991). Les chevaux peuvent aussi être infectés par le virus Ross River et pourraient jouer un rôle d'hôtes amplificateurs ou avoir un rôle dans les épidémies en zone péri-urbaine (Mackenzie et al., 1994 ; Dhama et al., 2014 ; Barton and Bielefeldt-Ohmann, 2017). D'autres réservoirs ont été également envisagés comme les rongeurs de l'espèce *Pseudomys novaehollandiae* (Harley et al., 2001 ; Richard C. Russell, 2002).

I.2.3 - Cycles de transmission du virus

Le virus Ross River est maintenu dans la nature selon un cycle enzootique sylvatique, c'est-à-dire que la maladie associée au virus est présente de manière régulière en milieu rural chez les animaux mais avec un taux d'incidence stable. Ce cycle inclue des hôtes vertébrés tels que les macropodes et les vecteurs que sont les moustiques zoophiles (qui piquent préférentiellement les animaux) (Figure 3). Le cycle épidémique concerne l'infection chez l'Homme où le virus est pathogène. Les moustiques sont considérés comme des hôtes d'amplification car l'infection y est persistante. Ce sont les femelles hématophages qui transmettent le virus lors d'un repas sanguin. En piquant l'individu contaminé, le moustique prélève du sang contenant le virus. Ce dernier va ensuite se répliquer chez le moustique ; il y a accumulation des virions au niveau des glandes salivaires et le moustique transmet le virus à un

nouvel hôte lors d'un repas sanguin via la salive (Strauss and Strauss, 1994). Il ne semblerait pas y avoir de transmission d'humain à humain (Harley et al., 2001).

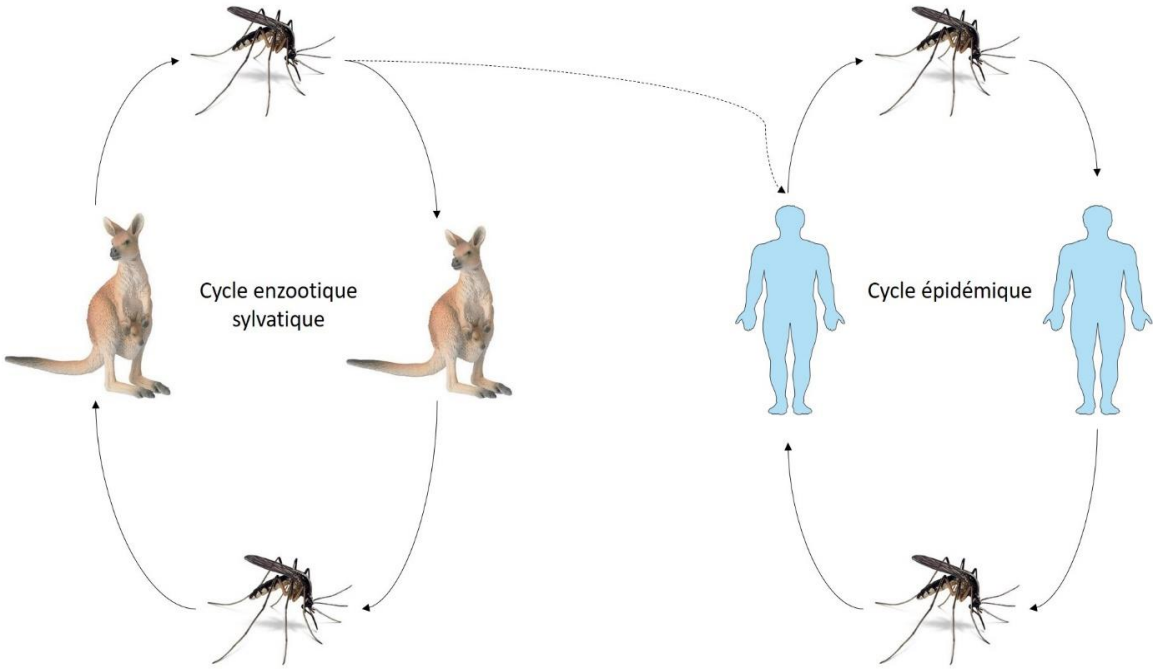


Figure 3. Cycles de transmission du virus Ross River.

La salive du moustique aurait un effet sur la potentialisation de l'infection par un arbovirus. En effet, de nombreuses molécules sont présentes dans la salive avec des propriétés anti-hémostatiques, anti-inflammatoires ou encore avec des capacités immuno-modulatoires. Elles pourraient avoir un rôle dans la transmission du virus à l'hôte, en altérant la réponse antivirale de cet hôte (Schneider and Higgs, 2008 ; Wichit et al., 2016).

I.3 - Epidémiologie

I.3.1 - Premières épidémies du RRV

Le virus Ross River est endémique de l'Australie et est responsable en moyenne de 5000 cas par an. La première épidémie a été reportée en 1928 au sud-est de l'Australie (New South Wales) sans qu'elle soit alors directement identifiée comme étant due au virus Ross River. Les symptômes décrits sont principalement des douleurs articulaires et des éruptions cutanées (Harley et al., 2001). En 1956, une épidémie dans la Murray Valley au sud de l'Australie avait causé les mêmes symptômes et il a été mis en évidence par sérologie que cette épidémie était due à un virus du même genre que le Chikungunya (Shope and Anderson, 1960).

Ce virus a été isolé pour la première fois à partir d'un moustique *Aedes vigilax* en 1959 à Townsville

au niveau de la Ross River, d'où le nom de la souche isolée : RRV-T48 (T pour Townsville et 48 pour le numéro de l'échantillon de moustique). En 1985, le virus est isolé d'un patient australien atteint de polyarthrite (Aaskov et al., 1985 ; Barber et al., 2009).

I.1.1 - Distribution du virus en Australie

Le virus Ross River est géographiquement distribué sur l'ensemble de l'Australie et continue d'être responsable d'épidémies annuelles (Figure 4). Un signalement d'un cas est fait lorsqu'il y a au moins un résultat positif au test pour les immunoglobulines (IgM). Le nord de l'Australie où règne un climat de région tropicale reste la partie la plus touchée. Ainsi, un des territoires qui subit le plus d'épidémies du virus Ross River est le Queensland au nord de l'Australie (Barber, Denholm, and Spelman 2009).

Le virus Ross River ainsi que le virus de la forêt Barmah (un flavivirus) sont responsables de 72 % des infections dues aux arboviroses en Australie. Le rapport annuel 2013-2014 du comité australien National Arbovirus and Malaria Advisory Committee (NAMAC) fait état de 4 569 cas d'infection au virus Ross River, ce qui représente un ratio de 19,5 pour 100 000 habitants.

On compte un nombre plus important de cas entre février et mai chaque année (Knope et al., 2016), ce qui correspond à la saison humide pour la région nord de l'Australie qui est sous climat tropical. Pour le sud de l'Australie, où le climat est tempéré, l'activité épidémique est corrélée aux épisodes pluvieux tels que les précipitations estivales et automnales ou encore les inondations dues aux marées lors de la saison chaude (Richard C. Russell, 2002). En effet, l'environnement humide est favorable à la reproduction des moustiques, ce qui renforce leur activité et facilite la transmission du virus.

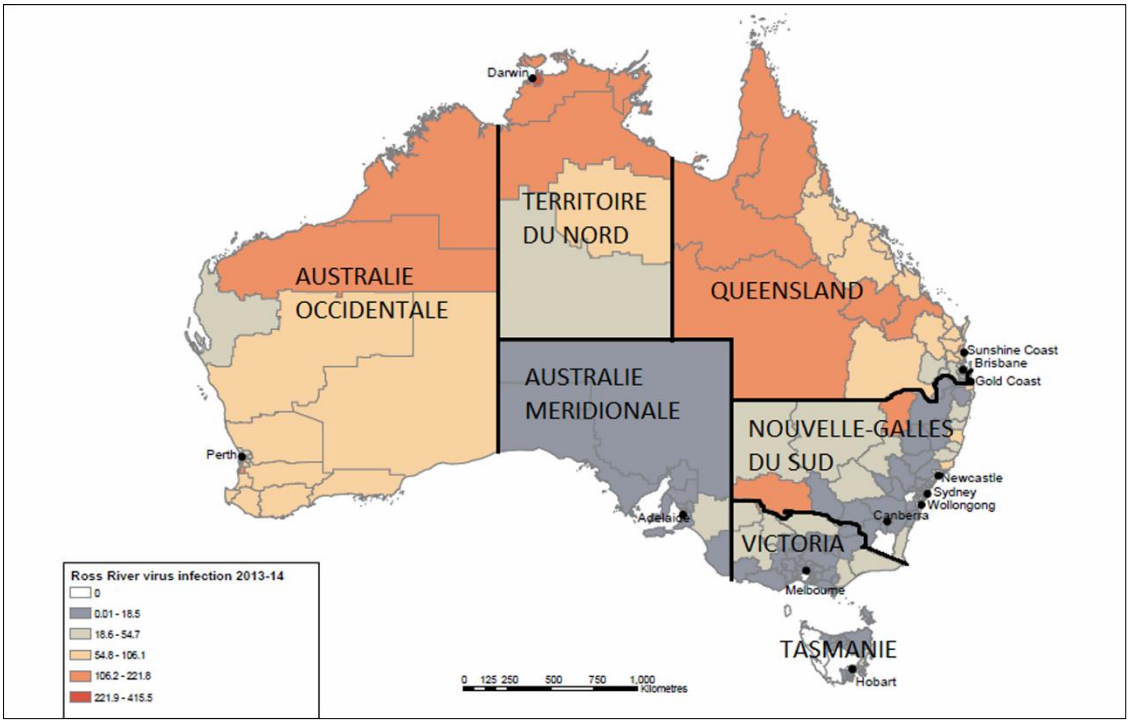


Figure 4 Taux de signalement d'infection au virus Ross River entre 2013 et 2014 en Australie. Le taux des signalements est calculé à partir des données de l'Australian Bureau of Statistics (ABS). Adapté de (Knope et al., 2016).

I.3.2 - Distribution du virus dans le Pacifique

Le virus Ross River a été responsable entre 1979 et 1980 d'une importante épidémie étendue à la région du Pacifique. Les îles Fidji, Samoa, les îles Cook et la Nouvelle Calédonie ont été alors touchées. Plus de 60 000 personnes ont été concernées par cette épidémie (Harley et al., 2001 ; Richard C. Russell, 2002). Il n'y a pas eu de nouvelles épidémies dans ces régions même si quelques cas ont été rapportés depuis dans les îles Fidji (Pröll et al., 1999 ; Klapsing et al., 2005).

Cependant, une circulation silencieuse du virus Ross River en Polynésie française a été mise en évidence récemment. En effet, une étude de la séroprévalence entre 2011 et 2013, par test ELISA mesurant les anticorps immunoglobulines spécifiques du virus Ross River sur 593 donneurs de sang polynésiens a montré qu'un tiers de cet échantillon est séropositif au virus (Aubry et al., 2015).

I.4 - Physiopathologie

I.4.1 - Symptômes et manifestations cliniques

Les symptômes les plus souvent observés sont des douleurs articulaires, de la fièvre, des éruptions cutanées de courtes durées, mais aussi la fatigue ; ils affectent généralement des adultes âgés entre 25 et 44 ans. Peu d'enfants semblent touchés et développer des signes cliniques. La période d'incubation du virus est comprise entre 7 et 9 jours (Barber et al., 2009).

Les douleurs articulaires sont les symptômes les plus caractéristiques et sont retrouvées chez plus de 95 % des patients. Elles peuvent persister pendant des mois (Harley et al., 2001 ; Richard C. Russell, 2002 ; Barber et al., 2009). Les articulations concernées sont celles des genoux, des poignets, des chevilles mais aussi celles des phalanges (métacarpo-phalangiennes) (Harley et al., 2002). D'autres symptômes tels que l'anorexie, les nausées et une diminution de la libido sont aussi rapportés chez certains patients en phase aigüe. Les manifestations chroniques décrites sont l'arthralgie, la fatigue et la dépression et peuvent persister plusieurs mois, voire plusieurs années après l'infection au virus Ross River (Barber et al., 2009 ; Harley et al., 2002 ; Condon and Rouse, 1995).

L'infection par le virus Ross River peut parfois conduire à des complications comme l'encéphalite mise en évidence par sérologie chez une patiente qui ne présentait pas les symptômes classiques de douleurs articulaires et d'éruptions cutanées (Lucas and Qiao, 1999).

I.4.2 - Immunologie chez le modèle de la souris et les patients humains

D'après un modèle de souris infectées par le virus Ross River, les premières cibles anatomiques lors de l'infection au virus sont les os, les articulations et les tissus musculaires squelettiques des membres postérieurs (Dhama et al., 2014 ; Morrison 2006). Chez les patients atteints de la maladie associée à l'infection par le virus Ross River, ce dernier serait capable de persister dans les articulations synoviales (Way, Lidbury, and Banyer 2002 ; Rulli et al. 2005). La polyarthrite serait ainsi due à une inflammation et à la production du virus dans les macrophages présents dans le liquide synovial (Rulli et al., 2007 ; Soden et al., 2000 ; Suhrbier and La Linn, 2004).

Lors d'une infection des cellules par le virus, une réponse immunitaire innée et spécifique est mise en place afin de détecter et tenter d'éliminer les virus pathogènes. Elle fait intervenir les cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques, les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) ou encore les lymphocytes T auxiliaires (CD4+). Pour des patients atteints de polyarthrite due à l'infection au virus Ross River, un nombre important de lymphocytes T auxiliaires CD4+ a été retrouvé dans les cellules mononucléaires du liquide synovial et les lymphocytes T CD8+ au niveau de la peau (Rulli et al. 2005). Les antigènes viraux sur les cellules mononuclées sont détectables les premiers jours suivant l'infection (Richard C. Russell 2002).

La réponse immunitaire fait suite à la détection du virus par les cellules grâce à des récepteurs cellulaires appelés Pattern-Recognition Receptors (PRRS). Parmi ces récepteurs, les TLR3 et TLR7 (*Toll-like receptors)* sont impliqués dans la détection des alphavirus (Kawai and Akira, 2010). Ces récepteurs détectent les PAMPs (*Pathogen Associated molecular Patterns*), motifs moléculaires associés aux pathogènes, ce qui entraîne l'activation de diverses voies de signalisation cellulaire comme la voie du facteur de transcription NF-κB et la voie interféron (IFN) (Mogensen, 2009). Le facteur de transcription NF-κB contrôle de nombreux gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires qui servent de signaux d'alarme dans la communication cellulaire. Les processus associés à ce facteur de transcription sont divers et incluent les réponses immunitaires et inflammatoires, la croissance cellulaire ainsi que la mort cellulaire.

Ainsi, lors des infections par des alphavirus, les cytokines MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein* 1), IL-6, IL-8, TNF-α et IFN-γ sont retrouvés aussi bien *in vitro* que dans des modèles animaux ou encore chez les patients en phase aigüe ou chronique (Assunção-Miranda et al., 2013 ; Herrero et al., 2011). Plus particulièrement, l'étude *in vitro* de fibroblastes et de macrophages infectés par RRV montre une augmentation de l'expression des cytokines MCP-1 et IL-8 (Mateo et al., 2000). La cytokine IFN-γ a été détectée dans le liquide synovial de patients atteints de la maladie due au virus Ross river (Rulli et al. 2005). D'après une étude *in vitro*, le virus Ross River régulerait la réponse interféron et l'expression des gènes antiviraux ISG (*Interferon Stimulated Genes*) à 48 h post-infection dans des

mélanocytes (Assi et al., 2015).

I.5 - Biologie du virus

Le virus Ross River possède une structure régulière sphérique à symétrie cubique, avec un diamètre de 65-70 nm. Il est composé d'une nucléocapside isocahédrale et d'une enveloppe contenant 80 épis, chaque épi étant un trimère des sous-unités glycoprotéiques E1 et E2 intégrées dans la double couche lipidique (Figure 5) (Harley et al., 2001).

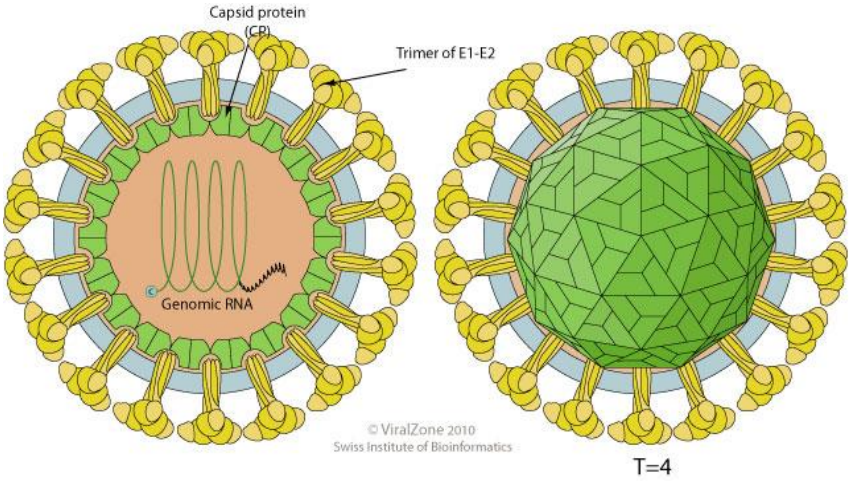


Figure 5 Structure d'un alphavirus avec sa capside et les protéines de l'enveloppe E1 et E2 (ViralZone)

En tant que virus de la famille *Togaviridae*, le virus Ross River possède un ARN simple brin positif, d'une taille de 11,8 kb. Cet ARN monocaténaire linéaire peut jouer le rôle de l'ARNm. Cet ARN code pour quatre protéines non structurales (nsP1, nsP2, nSP3 et nsP4) ainsi que pour les protéines structurales de la capside et de l'enveloppe (E1, E2 et E3). La glycoprotéine E3 n'est pas intégrée dans le virion (Harley et al., 2001).

Le cycle de réplication du virus consiste en plusieurs étapes (Figure 6):

- les particules infectieuses pénètrent dans la cellule par internalisation et la capside est décomposée, libérant ainsi l'ARN viral et les protéines de la capside ;
- les enzymes de l'hôte effectuent ensuite la réplication du génome viral et l'ARN génomique est traduit afin de synthétiser les protéines non structurales ;
- les protéines non structurales vont former des complexes de réplication nécessaires à la réplication et la synthèse de l'ARN subgénomique, codant pour les protéines structurales virales ;
- les protéines structurales virales sont ensuite synthétisées puis maturées dans le réticulum endoplasmique de la cellule hôte ;

- les génomes viraux et les protéines de la capside s'auto-assemblent pour former de nouvelles particules virales ;
- ces dernières bourgeonnent au niveau de la membrane de la cellule hôte et peuvent infecter de nouvelles cellules (Strauss and Strauss 1994).

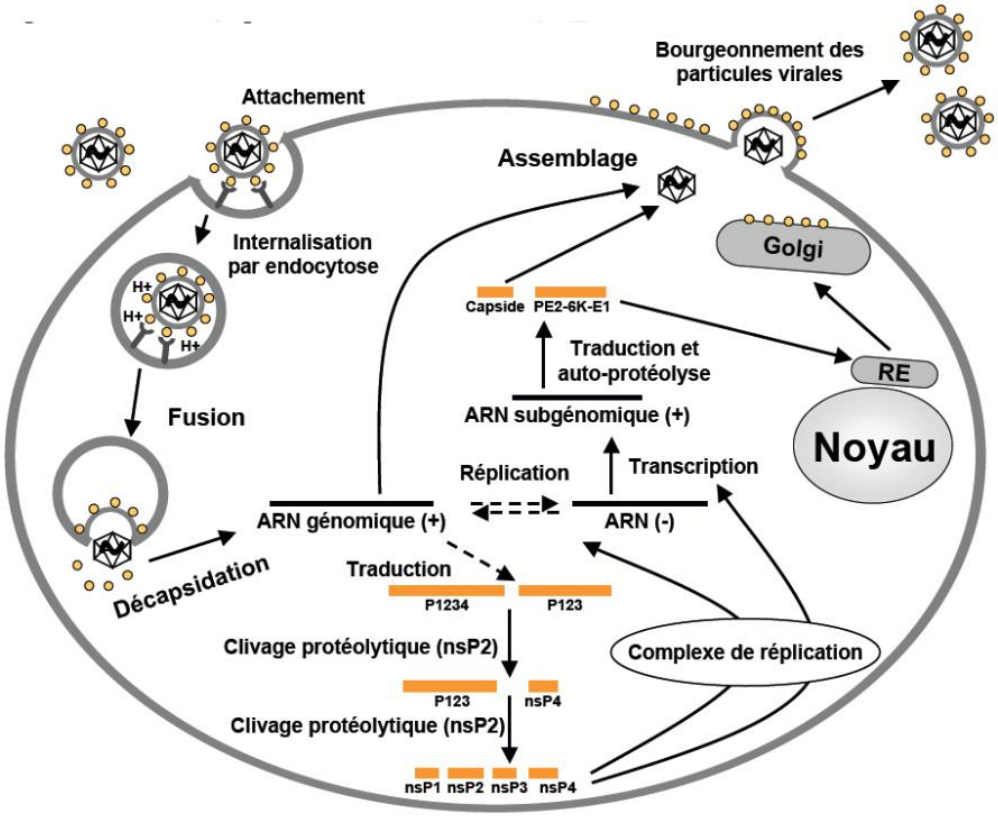


Figure 6 Cycle de réplication d'un alphavirus d'après (Dupuis-Maguiraga et al., 2011)

Ainsi, les stratégies antivirales contre le virus Ross River peuvent s'appuyer sur son cycle de vie. Les données bien établies sur son cycle de réplication peuvent permettre de préciser le mécanisme d'action des agents antiviraux ou leur action sélective sur une des étapes du cycle.

II - La lutte contre le virus Ross River

Les stratégies d'intervention face aux arboviroses correspondent principalement à la prévention avant l'installation d'une épidémie et à son contrôle une fois établie, selon son ampleur et sa propagation. Classiquement, l'Organisation Mondiale de la Santé définit quatre niveaux de prévention :

- la prévention primaire qui vise à empêcher l'apparition de nouveaux cas dans une population saine et qui est donc applicable à l'ensemble de la population ;
- la prévention secondaire qui consiste en tous les actes destinés à diminuer la prévalence d'une maladie et est applicable à un individu à haut risque ;
- la prévention tertiaire qui se rapporte à tous les actes destinés à diminuer la prévalence des cas chroniques et la rechute d'un patient pour lequel la maladie a déjà été présente ;
- la prévention quaternaire correspondant aux soins palliatifs.

La prévention primaire reste à ce jour la stratégie la plus efficace contre les arboviroses. Elle comprend, entre autre, la lutte vectorielle ainsi que la protection individuelle. La lutte anti-vectorielle consiste à réduire ou éliminer la densité de la population de moustiques et ainsi réduire le risque d'infection. La protection personnelle consiste à limiter les surfaces d'exposition et/ou les contacts hôte-vecteur par des répulsifs, afin de réduire l'incidence des infections.

La vaccination est davantage ciblée sur l'hôte que le vecteur et fait partie des mesures collectives qui peuvent être prises en prévention primaire. Elle aura pour effet de stimuler les défenses du système immunitaire de l'hôte afin d'empêcher la propagation du virus.

Les antiviraux constituent une autre stratégie d'intervention, par leur effet délétère sur les étapes nécessaires à l'entrée et/ou la réplication du virus dans les cellules. La multiplication virale étant inhibée, le virus se dissémine moins dans l'organisme et cela réduit aussi les risques de contamination à d'autres individus.

II.1 - Les répulsifs

II.1.1 - Les répulsifs cutanés

Les répulsifs sont utilisés depuis longtemps pour la prévention des maladies vectorielles. Ils ont pour but d'empêcher la piqûre des vecteurs hématophages sur les hôtes. Ils ne sont pas spécifiques aux arboviroses mais ont une efficacité variable selon le vecteur.

Il existe différents types de répulsifs :

- les répulsifs physiques, essentiellement les ultrasons ;
- les répulsifs oraux, qui sont principalement des vitamines du groupe B (vitamine B ou thiamine) ;
- les répulsifs de contact et odorants, qui peuvent être d'origine synthétique ou naturelle.

L'efficacité des répulsifs physiques et oraux a été remise en cause (Ives and Paskewitz, 2005 ; Croft, 2010) et les répulsifs de contact et odorants restent les mieux tolérés à ce jour. Les répulsifs sont de compositions chimiques plus ou moins complexes (molécules simples ou mélanges) qui altèrent le comportement du vecteur en le détournant de sa cible. Certains empêchent la piqûre de manière mécanique comme la formulation Avon Skin-So-Soft®, qui utilise un film huileux piégeant les moustiques (Magnon et al., 1991).

Les molécules répulsives ainsi que leurs différentes formulations sont désormais soumises à une règlementation européenne stricte pour leur mise à disposition sur le marché. Cette règlementation intègre des aspects sanitaires et environnementaux (Journal officiel de l'Union européenne, 2012, sec. L 167/1). Elle concerne aussi bien les répulsifs d'origine synthétique que ceux d'origine naturelle.

II.1.2 - Les répulsifs synthétiques

L'utilisation de répulsifs contre les insectes remonte à l'Antiquité, avec l'utilisation de feux, fumées ou encore par application de boue et l'usage de certaines plantes. Ce n'est qu'au début du XXème siècle que des répulsifs à base de molécules synthétiques ont été développés avec le diméthyle phtalate en 1929, puis Indalone® en 1937 (Brown and Hebert, 1997) et Rutgers 612 en 1939 (Peterson and Coats, 2001).

La recherche d'une protection efficace pour les soldats américains lors de la Seconde Guerre mondiale a permis d'identifier le DEET (*N,N*-diéthyl-*m*-toluamide) (Figure 7). Il est depuis, un des composés répulsif le plus efficace et le plus utilisé dans les formulations (Brown and Hebert, 1997 ; Patel et al., 2016). Il possède un large spectre d'action envers les insectes nuisibles comme les

moustiques, les tiques, les moucherons. Son application permet une protection de plusieurs heures contre les moustiques avec des formulations allant jusqu'à 50 % en substance active (Moore et al., 2007a). Les répulsifs à base de DEET disposant d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) ne sont toutefois pas utilisables en France pour les enfants âgés de moins de 2 ans (Ministère des affaires sociales et de la santé, 2016) (Caumes and Camus, 2015). Cependant le DEET n'est pas une molécule neutre mais possède des fonctions amide. C'est donc un puissant solvant inflammable (Katz et al., 2008). Il a également pour inconvénients de dissoudre le plastique et de détériorer certains autres composés mais il reste sans risque pour le coton, la laine et le nylon. Il aurait aussi un potentiel immuno-modulateur sur la souris à des doses comparables à celles que l'on peut retrouver chez l'Homme (Keil et al., 2009).

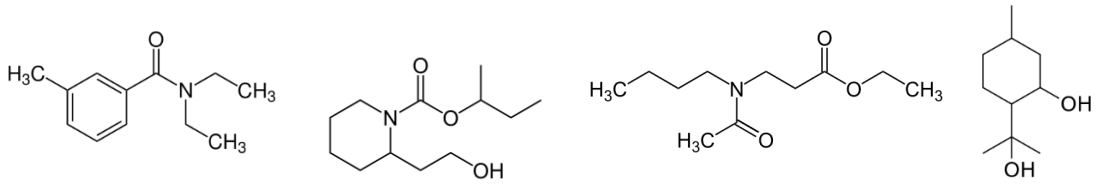


Figure 7 Structure des principales molécules répulsives synthétiques

Depuis, d'autres molécules répulsives ont été proposées dont l'icaridine connue aussi sous la dénomination picaridine ou KBR3023 (Carboxylate de Sec-butyl 2-(2-hydroxyéthyl) pipéridine-1), qui est couramment utilisée dans les formulations disponibles en Europe et indiquées en France par le ministère des affaires sociales et de la santé (Ministère des affaires sociales et de la santé, 2016) (Figure 7). Les concentrations utilisées vont jusqu'à 20 % en substance active (Katz et al., 2008 ; Caumes and Camus, 2015). Cette molécule a pour avantage d'être sans odeur et non corrosive pour le plastique tout en ayant une efficacité comparable à celle du DEET (Debboun et al., 2006 ; Katz et al., 2008).

Les autres substances actives utilisées dans les répulsifs recommandés par l'agence nationale de santé publique sont IR3535 (N-acétyl-N-butyl-β-alaninate d'éthyle) et PMDRBO (mélange de *cis*- et *trans-p*-menthane-3,8-diol) (Figure 7). Ces deux substances sont répertoriées comme ingrédients actifs de biopesticides par l'USEPA (*United States Environmental Protection Agency*). Ce sont des équivalents synthétiques ou des produits dérivés de substances naturelles. IR3535 possède une structure similaire à la β-alanine et est utilisée à des concentrations comprises entre 20 et 30 % (Debboun et al., 2006). PMDRBO est trouvé entre 19 et 25 % en formulation et il peut être obtenu soit par hydrodistillation des feuilles d'*Eucalyptus citriodora* ou par modification chimique du citronellal (Dell, 2009).

II.1.3 - Les répulsifs naturels

De nombreuses huiles essentielles sont utilisées de manière traditionnelle comme répulsifs naturels contre les arthropodes (Pavela and Benelli, 2016). Certaines plantes sont utilisées telles quelles, mais les huiles essentielles restent la formulation la plus couramment exploitée. L'huile essentielle de la citronnelle est l'un des premiers répulsifs naturels connus avec celles de l'eucalyptus, de laurier, de l'anis et de la bergamote (Debboun et al., 2006). Plusieurs espèces végétales ont été reconnues pour leurs propriétés répulsives contre les insectes, en particulier contre les moustiques (Tableau 1). Les espèces *Cymbopogon*, *Eucalyptus* et *Ocimum* sont les plus étudiées pour leur activité répulsive (Nerio et al., 2010).

En tant que produits naturels, ces répulsifs sont en général mieux acceptés par la population que les répulsifs synthétiques. Toutefois, en tant que biocides, ils sont soumis à la même réglementation que les répulsifs synthétiques comme indiqué précédemment (II.1.1 -) et doivent être aussi évalués, tant au niveau des risques sanitaires et écologiques que de leur efficacité de protection. L'activité répulsive est évaluée selon la procédure standard définie par l'OMS pour les répulsifs spatiaux en conditions de laboratoire (World Health Organization, 2013) ou les procédures de l'ASTM (*American Society for Testing and Materials*) ou de l'USEPA (*U.S. Environmental Protection Agency*) (Barnard, 2005).

Tableau 1 Huiles essentielles à activité répulsive

Espèce	Nom commun (composé majoritaire)	Vecteur	Références
Allium sativum	Ail cultivé	*Aedes aegypti*	(Katz et al., 2008)
Artemisia vulgaris	Armoise commune	*Aedes aegypti*	(Hwang et al., 1985) (Wang et al., 2006)
Azadirachta indica	Margousier ou neem	*Anopheles*	(Isman, 2006) (Maia and Moore, 2011) (Abiy et al., 2015)
Carapa guianensis	Carapa	*Aedes aegypti*	(Silva et al., 2006) (Klauck et al., 2014)
Chenopodium ambrosoides	Epazote	*Aedes aegypti*	(Gillij et al., 2008) (Soares et al., 2010) (Pandey et al., 2014)
Chrysanthemum cinerariaefolium	Pyrèthre	*Mansonia*	(Hadis et al., 2003)
Cinnamomum camphora	Camphrier (camphre, eucalyptol, linalol)	*Aedes aegypti*	(Jiang et al., 2016) (Yang et al., 2004)
Corymbia citriodora	Eucalyptus citronné (citronellal, p-menthane-3,8-diol, citronellol, limonène, géraniol, isopulegol, δ¬pinène).	*Anopheles*	(Jaenson et al., 2006a) (Amer and Mehlhorn, 2006a) (Traboulsi et al., 2005) (Bossou et al., 2013)

Tableau 1 (suite) Huiles essentielles à activité répulsive

Curcuma longa	Curcuma	*Aedes aegypti, Anopheles dirus, Culex quinquefaschiatus*	(Auysawasdi et al., 2016) (Tawatsin et al., 2001) (Das et al., 2015)
Cymbopogon citratus	Citronnelle (citral)	*Aedes aegypti, Anopheles, Culex quinquefaschiatus*	(Moore et al., 2007b) (Pushpanathan et al., 2006) (Bossou et al., 2013)
Cymbopogon martinii	Palmarosa (géraniol)	*Aedes aegypti, Anopheles stephensi, Culex quinquefaschiatus*	(Ansari and Razdan, 1994) (Tyagi et al., 1998)
Cymbopogon nardus	Citronellal	*Aedes aegypti, Anopheles stephensi, Culex*	(Trongtokit et al., 2005) (Tyagi et al., 1998) (Adams et al., 2016)
Cymbopogon winterianus	Huile essentielle de citronnelle de Java	*Aedes aegypti, Anopheles stephensi, Culex quinquefaschiatus*	(Ansari and Razdan, 1994) (Tawatsin et al., 2001) (Tyagi et al., 1998)
Eucalyptus camaldulensis	Gommier de Camaldoli	*Culex pipiens*	(Erler et al., 2006)
Hyptis suaveolens	Chan (myrcène)	*Aedes albopictus, Armigeres, Culex, Aedes Anopheles gambiae*	(Conti et al., 2012) (Vongsombath et al., 2012) (Abagli et al., 2012)
Lantana camara	Lantanier	*Anopheles, Culex quinquefaschiatus*	(Dua et al., 1996) (Kamaraj et al., 2011)
Lavandula spp.	Lavande	*Culex pipiens*	(Adams et al., 2016)
Ledum palustre/ Rhododendron tomentosum	Lédon des marais	*Aedes aegypti*	(Dampc and Luczkiewicz, 2013) (Jaenson et al., 2006b)
Lippia javanica		*Aedes aegypti Anopheles gambiae*	(Mwangi et al., 1992) (Omolo et al., 2004)
Lippia uckambensis		*Aedes aegypti Anopheles gambiae*	(Mwangi et al., 1992) (Omolo et al., 2004)
Litsea cubeba		*Aedes, Anopheles, Culex Armigeres*	(Amer and Mehlhorn, 2006a) (Lupi et al., 2013) (Vongsombath et al., 2012)
Melaleuca quinquenervia	Niaouli	*Aedes, Anopheles, Culex*	(Amer and Mehlhorn, 2006a) (Lupi et al., 2013)
Mentha piperita	Menthe poivrée (menthol)	*Culex*	(Amer and Mehlhorn, 2006a) (Erler et al., 2006)
Myrica gale	Myrte des marais	*Aedes aegypti*	(Jaenson et al., 2006b)
Nepeta cataria	Cataire	*Aedes, Anopheles, Culex*	(Amer and Mehlhorn, 2006a) (Lupi et al., 2013)
Ocimum americanum		*Aedes, Anopheles, Culex*	(Tawatsin et al., 2001) (Lupi et al., 2013)
Ocimum basilicum		*Aedes aegypti, Anopheles, Culex*	(Trongtokit et al., 2005) (Amer and Mehlhorn, 2006a) (Erler et al., 2006)
Ocimum forskolei		*Anopheles gambiae*	(Odalo et al., 2005)

Tableau 1 (suite) Huiles essentielles à activité répulsive

Ocimum kilimandscharicum		*Anopheles arabiensis* *Anopheles gambiae*	(Kweka et al., 2008)
Ocimum suave		*Anopheles arabiensis* *Anopheles gambiae*	(Kweka et al., 2008)
Pelargonium spp.	Huile essentielle de géranium	*Aedes*	(Matsuda et al., 1996) (Thorsell et al., 1998) (Amer and Mehlhorn, 2006a)
Pimpinella anisum	Anis vert	*Aedes aegypti, Anopheles stephensi, Culex*	(Prajapati et al., 2005) (Erler et al., 2006)
Pogostemon spp.	Patchouli	*Aedes aegypti, Anopheles, Culex*	(Trongtokit et al., 2005) (Adams et al., 2016)
Rosmarinus officinalis	Huile essentielle de romarin (1,8-cinéole)	*Culex pipiens*	(Amer and Mehlhorn, 2006a) (Gillij et al., 2008) (Adams et al., 2016)
Ruta chalepensis	Rue de Chalep	*Aedes albopictus*	(Hadis et al., 2003) (Conti et al., 2012)
Syzygium aromaticum	Giroflier (eugenol, carvacrol, thymol, cinnamaldehyde)	*Aedes aegypti, Anopheles, Culex*	(Trongtokit et al., 2005) (Lupi et al., 2013) (Adams et al., 2016)
Tagetes minuta			(Gillij et al., 2008)
Thymus spp.	Thym (thymol, linalol, géraniol)		(Amer and Mehlhorn, 2006a)
Vetiveria zizanioides	Vétiver	*Anopheles*	(Aarthi et al., 2010) (Aarthi and Murugan, 2012)
Violeta odorata		*Aedes, Anopheles, Culex*	(Amer and Mehlhorn, 2006a) (Lupi et al., 2013)
Zanthoxylum alatum		*Aedes, Anopheles, Culex quinquefasciatus*	(Tiwary et al., 2007)
Zanthoxylum limonella	Makaen	*Aedes aegypti, Anopheles, Culex quinquefasciatus*	(Das et al., 2003) (Das et al., 2015) (Trongtokit et al., 2005)

Comme indiqué précédemment, l'évaluation des répulsifs doit désormais intégrer leurs risques sanitaires en raison de leurs possibles effets indésirables comme pour les médicaments (Foster et al., 2005). En effet, certaines huiles essentielles sont responsables de dermatites ou d'allergies, comme l'huile essentielle de l'arbre à thé (Trumble, 2002) ou encore l'huile essentielle de romarin (Trattner et al., 2008).

Les huiles essentielles sont constituées par un mélange complexe des composés aromatiques volatils (COV) obtenu généralement par hydrodistillation ou entrainement à la vapeur. La composition de ces huiles comprend majoritairement des monoterpènes, des sesquiterpènes et des composés

oxygénés comme les alcools, les aldéhydes et les esters. Les terpènes ont été identifiés comme composés responsables de l'activité répulsive (Omolo et al., 2004 ; Nerio et al., 2010). La plupart de ces composés répulsifs sont des terpènes oxygénés avec un groupement hydroxyle lié à un carbone primaire, secondaire ou aromatique (Nerio et al., 2010). Toutefois, une étude au Kenya mesurant l'activité répulsive des huiles essentielles *Croton pseudopulchellus*, *Mkilua fragrans*, *Endostemon tereticaulis*, *Ocimum forskolei*, *Ocimum fischeri* et *Plectranthus longipes* et leurs composés majoritaires d'autre part, montre que l'activité répulsive individuelle des composés est en deçà de l'activité répulsive de l'huile essentielle totale (Odalo et al., 2005). L'activité répulsive de ces huiles essentielles serait la résultante d'un effet synergique des composés.

De nombreuses formulations contenant des huiles essentielles ou des constituants de ces huiles sont brevetées chaque année comme répulsifs (Pohlit et al., 2011). Ces formulations cherchent à améliorer l'efficacité des répulsifs à base d'huiles essentielles.

II.1.1 - Mécanismes d'action

Lors du repas sanguin de la femelle moustique, la première barrière rencontrée est la peau qui est l'interface entre l'environnement extérieur et l'organisme. La peau est constituée d'une couche supérieure, l'épiderme, puis du derme et de l'hypoderme (Figure 8). L'épiderme est un épithélium stratifié non vascularisé composé principalement de kératinocytes et de mélanocytes. Suivant la morphologie des kératinocytes, on distingue plusieurs couches dans l'épiderme (couche germinative, épineuse, granuleuse, *stratum lucidum* et *stratum corneum*) (Tobin, 2006).

Le derme est un tissu conjonctif vascularisé comprenant des fibroblastes et des cellules du système immunitaire. En tant que tissu conjonctif, il contient plusieurs protéines et une matrice extracellulaire constituée principalement de fibres de collagène mais aussi d'élastine et de fibrillines. Enfin, l'hypoderme est la couche la plus interne. C'est aussi un tissu conjonctif richement vascularisé composé principalement d'adipocytes.

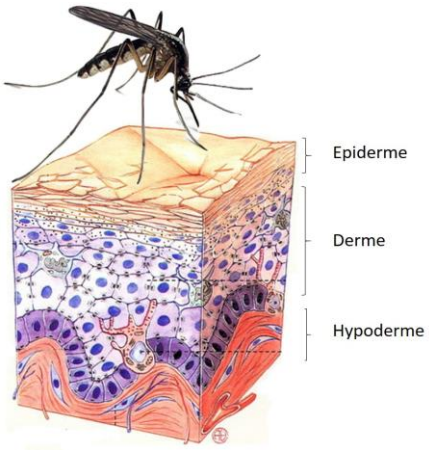


Figure 8 Structure de la peau. Représentation des trois couches formant la peau (épiderme, derme et hypoderme).

La femelle moustique, lors de la recherche d'un hôte pour se nourrir est sensible à divers stimuli (visuels, thermiques et olfactifs) émis par celui-ci. Des différences d'attractivité ont lieu selon les espèces de moustiques et selon leurs hôtes (Mukabana et al., 2002 ; Lindsay et al., 2000). Les stimuli sont détectés par les sensilles des moustiques. Les sensilles sont composées de plusieurs neurones et sont concentrées principalement sur les antennes (McIver, 1974).

Au niveau olfactif, c'est un ensemble de composés (acide lactique, dioxyde de carbone, ammoniac, acides carboxyliques, oct-1-én-3-ol et autres composés de la sueur) qui stimule les sensilles du moustique et non pas un seul composé (Keswani and Bellare, 2006 ; McBride, 2016). Ainsi en étudiant le comportement et la réponse à l'électro-antennogramme de moustiques, une plus grande attractivité de ces derniers pour la sueur humaine incubée pendant deux jours que pour la sueur humaine fraîche a été observée (Meijerink et al., 2000). Cette différence d'attractivité serait due à une différence de pH et/ou de composition (Braks and Takken, 1999).

Ces capacités olfactives des moustiques sont utilisées dans la lutte vectorielle. Des odeurs attractives peuvent être utilisées comme leurre, par exemple le dioxyde de carbone ou l'odeur du fromage Limburger (Ray, 2015 ; Knols, 1996). Plus généralement, des répulsifs de contact odorants sont appliqués sur la peau. L'activité répulsive serait le résultat d'événements physiques et biochimiques. Ces répulsifs formeraient une barrière de vapeur, empêchant la détection des molécules attractives de l'hôte. Les mécanismes moléculaires du fonctionnement des répulsifs sont peu connus, mais certaines molécules agiraient sur les récepteurs olfactifs des moustiques (Bohbot et al., 2011 ; Dickens and Bohbot, 2013 ; Peterson and Coats, 2001 ; Amer and Mehlhorn, 2006b). Le DEET pourrait agir à distance ou par contact direct. Son action porterait sur le récepteur des composés attractifs. Le DEET entrerait alors en compétition avec la molécule oct-1-én-3-ol, attractive pour le moustique ; le récepteur neuronal olfactif Orco serait impliqué dans ce mécanisme (Leal, 2014 ; Ditzen et al., 2008).

L'étude du mécanisme d'action des répulsifs naturels est peu développée, du fait de la composition complexe de l'huile essentielle et du potentiel effet synergique de ses constituants.

II.1.2 - Avantages et limites des répulsifs synthétiques et naturels

Les répulsifs synthétiques de compositions chimiques parfaitement maitrisées ont été sélectionnés pour leur large spectre d'action et ont été formulés (après 40 ans d'utilisation) pour garantir leur stabilité et une grande efficacité du fait de leur persistance sur la peau. La durée de protection du DEET face aux moustiques de l'espèce *Aedes* peut aller jusqu'à dix heures (Lupi et al., 2013). Toutefois, des effets secondaires liés à l'utilisation de cette substance ont été reportés : réactions allergiques mais

aussi des effets neurotoxiques et des problèmes cardiovasculaires (Brown and Hebert, 1997 ; Zadikoff 1979 ; Corbel et al., 2009).

De plus, s'agissant d'une molécule unique ciblant les récepteurs olfactifs, les moustiques sont capables de devenir résistant au DEET : *Aedes aegypti*, préalablement exposé au DEET, peut devenir insensible au DEET du fait d'une anergisation probable des neurones des récepteurs olfactifs en présence du DEET (Stanczyk et al., 2013). Par ailleurs, *Aedes aegypti* préalablement exposé au virus Sindbis peut perdre sa sensibilité au DEET, ou au composé picaridine (Qualls et al., 2011 ; Qualls et al., 2012).

Dans ce contexte, on constate une utilisation accrue des huiles essentielles comme répulsifs anti-moustiques. Ces répulsifs naturels, mélanges complexes, ont généralement un large spectre d'action et il est plus difficile pour les moustiques de développer une résistance. Le fait que ce soient des ressources renouvelables et disponibles directement dans les zones tropicales, là où peuvent avoir lieu les épidémies est un avantage supplémentaire. Cependant leur durée de protection reste inférieure à celle des répulsifs synthétiques comme le DEET (Nerio et al., 2010 ; Maia and Moore, 2011). Afin d'augmenter leur efficacité, de nouvelles formulations ont été développées, telles que la production de répulsifs combinés, l'ajout d'additifs pour stabiliser les produits avec l'utilisation de la paraffine, de la vanilline ou de l'acide salicylurique (Nerio et al., 2010). L'objectif est de réduire la volatilité des huiles et de trouver un compromis entre des concentrations efficaces pour l'effet répulsif et les effets secondaires comme les allergies (Semmler et al., 2014).

II.2 - Vaccins

Les vaccins entrent dans le cadre d'une stratégie de prévention ciblée. En effet, ce sont des outils spécifiques d'un virus, contrairement aux répulsifs qui visent les vecteurs sans sélectivité. Le principe du vaccin se base sur la capacité du système immunitaire à se défendre contre des agents pathogènes. Le vaccin repose sur un agent extérieur qui est introduit pour provoquer une réponse immunitaire de l'organisme. Cet agent extérieur peut être un virus vivant atténué, un agent infectieux inactivé, des fragments d'un agent pathogène ou encore des toxines bactériennes inactives. L'immunité de l'organisme est alors acquise, sans développer de pathogénicité par l'induction d'une mémoire immunitaire. Lorsque l'organisme sera en contact avec le véritable agent pathogène, la réaction immunitaire mémoire développera alors une réponse efficace beaucoup plus rapidement (Campbell and Reece, 2007).

Un vaccin basé sur l'inactivation du virus Ross River a été développée par Aaskov et al. Le virus, isolé à partir d'un patient a d'abord été incubé avec du BEI (éthylèneimine binaire), puis concentré par

centrifugation. Le BEI est utilisé pour diminuer la capacité infectieuse du virus, tout en conservant l'immunogénicité du virion. En effet, il agirait sur les acides nucléiques mais les épitopes des protéines du virus conserveraient leur conformation et leur accessibilité pour leur reconnaissance par les anticorps (Blackburn and Besselaar, 1991 ; Bahnemann, 1990). Des injections intramusculaires et intraveineuses de cette préparation brute ont été menées sur des souris BALB/c. Le sérum de ces souris immunisées montrait alors une production d'immunoglobulines IgM et IgG dirigées contre le virus Ross River et qui était comparable à celle de souris ayant été infectées par le virus (Yu and Aaskov, 1994). Quelques années plus tard, cette même équipe a repris cette procédure en ajoutant cette fois-ci une étape de purification du virus inactivé. Après avoir reçu ce vaccin, des souris infectées *in vivo* par le virus Ross River ne développèrent pas de symptômes liés à l'infection. Le sérum produit montrait alors une production d'anticorps dirigés contre le virus *in vitro* (Aaskov et al., 1997).

L'utilisation du BEI pour inactiver le virus n'étant pas applicable à l'échelle industrielle, du fait des étapes laborieuses de purification, un vaccin a été développé en inactivant le virus Ross River avec le formaldéhyde et des radiations ultraviolettes (Kistner et al., 2007). Une forme couplée ou non à un adjuvant hydroxyde d'aluminium a été également testée sur des souris et des cochons d'inde par immunisation subcutanée. Les anticorps neutralisants le virus Ross River ont été alors quantifiés dans les sérums *in vitro* et la virémie suivie sur les animaux confrontés au virus. Selon plusieurs études, ce vaccin serait efficace sur le modèle animal (Holzer et al., 2011). Depuis, il a été testé avec succès sur 382 adultes européens n'ayant jamais été infectés par le virus Ross River (Aichinger et al., 2011). Plus récemment, une étude sur 1 755 adultes australiens a montré une vaccination contre le virus Ross river plus efficace en terme de production d'anticorps chez les jeunes adultes (16-59 ans) que chez les personnes de plus de 60 ans (Wressnigg et al., 2015). Toutefois, malgré les travaux de cette équipe, il n'existe toujours pas de vaccins commercialisés pour l'infection contre le virus Ross River.

II.3 - Les antiviraux

En l'absence de vaccins, les antiviraux restent une mesure efficace contre l'infection virale. Ils agissent sur le cycle de vie du virus. Contrairement aux répulsifs et aux vaccins, les antiviraux interviennent sur l'organisme déjà infecté après apparition des symptômes. Ils peuvent soit empêcher l'entrée du virus dans la cellule-hôte, soit agir au niveau de la réplication de son matériel génétique ou encore lors de l'étape d'assemblage de ses éléments constitutifs (Figure 6 et Tableau 2).

Une des difficultés majeures dans le développement d'antiviraux est de caractériser une action spécifique sur les enzymes virales sans perturber le fonctionnement cellulaire de l'organisme-hôte. Cette action peut être dirigée spécifiquement contre une protéine du virus, comme par exemple pour

un composé de type benzimidazole qui semble avoir une activité antivirale contre l'alphavirus du Chikungunya en agissant spécifiquement au niveau de la protéine nsP4, impliquée dans la réplication du virus (Wada et al., 2017). La stratégie antivirale peut être limitée par la mutation et/ou résistance que peut développer le virus qui n'a pas été éradiqué. Mais le développement plus rapide des antiviraux par rapport aux vaccins permet d'intervenir plus rapidement contre les infections.

L'ensemble des molécules antivirales connues pour agir sur les alphavirus tel que le virus du Chikungunya a été répertorié récemment (Abdelnabi et al., 2015 ; Ahola et al., 2015). On peut classer ces molécules antivirales suivant leur mode d'action. Certaines, comme la chloroquine ou l'obatoclax, agissent sur l'attachement du virus en inhibant l'acidification de l'endosome avant la fusion du virus (Khan et al., 2010 ; Chopra et al., 2014 ; Varghese et al., 2017). Le médicament Arbidol et les flavaglines (composés naturels) empêchent, eux aussi, l'attachement de l'alphavirus sur les cellules hôtes (Chopra et al., 2014 ; Delogu et al., 2011 ; Wintachai et al., 2015).

Les antiviraux peuvent également agir sur la synthèse protéique, comme les petits ARNs interférents (siRNAs) qui ciblent les protéines nsP1 et E2, ou encore l'harringtonine et l'homoharringtonine qui inhiberaient la production des protéines nsP3 et E2 (Parashar et al., 2013 ; Kaur and Chu, 2013). D'autres molécules comme la ribavirine (analogue nucléosidique) ou la favipiravir (dérivé de la pyrazinamide) ou des dérivés de la structure thiazolidine inhibent la réplication virale (Briolant et al., 2004 ; Rothan et al., 2014 ; Delang et al., 2014 ; Jadav et al., 2015). Les composés naturels 5,7-dihydroxyflavones ont été également décrits comme inhibiteurs du virus du Chikungunya mais leur mécanisme d'action n'a pas encore été résolu (Pohjala et al., 2011).

La recherche de nouveaux antiviraux est désormais appuyée par la bio-informatique qui permet d'identifier de potentiels candidats, inhibiteurs des enzymes virales (Bassetto et al., 2013 ; Byler et al., 2016). Cependant, ils restent encore peu applicables *in vivo*. Par exemple, le traitement par la chloroquine s'est révélé inefficace dans une étude menée à La Réunion sur des patients infectés par le virus du Chikungunya (Lamballerie et al., 2008). Depuis ces dernières années, de nombreuses études ont été menées pour identifier des antiviraux spécifiques ou non des alphavirus (Tableau 2). Plusieurs de ces composés sont d'origine naturelle en tant que métabolites secondaires de plantes ou de bactéries. Ainsi de nombreux flavonoïdes, tels que la baicaléine, le kaempférol, la naringinine, la quercétine, la quercétagétine ou la sylimarine ont une activité antivirale contre le virus du Chikungunya (Lani et al., 2015 ; Lani et al., 2016 ; Ahola et al., 2011).

Tableau 2 Antiviraux testés contre des alphavirus (études à partir de 2015)

Nom de la molécule	Origine ou famille de la molécule	Alphavirus	Méthodes d'évaluation de l'activité	Mode et/ou site d'action	Références
Abamectine	Produits fermentation *Streptomyces avermitilis*	CHIKV, SFV, SINV		Réplication	(Varghese et al., 2016)
Acide méfénamique	Fenamate	CHIKV	*In vivo* sur souris – Quantification du titre viral	Combiné à la ribavirine	(Rothan et al., 2016)
Acide picolinique		CHIKV	Modélisation qRT-PCR Titrage par plage de lyse	Fixation sur la protéine de la capside Co-traitement	(Sharma et al., 2016)
Anthranilamides		WEEV FMV			(Barraza et al., 2015)
Apigénine	Flavone	CHIKV, SFV, SINV			(Ahola et al., 2011)
Baicaléine	Flavonoïdes	CHIKV			(Lani et al., 2016)
Berbérine	Alcaloide isoquinoline dérivé de plante	CHIKV, SFV, SINV		Réplication	(Varghese et al., 2016)
β-D-N^4-hydroxycytidine (NHC)		CHIKV	*In vitro*	Réplication	(Ehteshami et al., 2017)
Composé de type benzimidazole		CHIKV	*In vitro*	Cible la protéine nsP4	(Wada et al., 2017)
Conjugués Benzouracil-coumarin-arène		CHIKV			(Hwu et al., 2015)
Ivermectine	Produits fermentation *Streptomyces avermitilis*	CHIKV, SFV, SINV		Réplication	(Varghese et al., 2016)
Kaempférol	Flavonoïde	CHIKV	*In vitro* – activité cytopathique, PCR quantitative – Western blot (expression protéines)	Réplication et synthèse protéines virales	(Lani et al., 2015)

Tableau 2 (suite) Antiviraux testés contre des alphavirus (études à partir de 2015)

Lactoferrine humaine		SINV, SFV			(Waarts et al., 2005)
Naringinine	Flavonoïde	CHIKV, SFV, SINV			(Ahola et al., 2011)
Niclosamide		CHIKV, SINV, SFV		Entrée du virus	(Wang et al., 2016)
Nitazoxanide		CHIKV, SINV, SFV		Entrée du virus	(Wang et al., 2016)
Prostratine	Dérivé du phorbol (*Homalanthus nutans*)	CHIKV	Détermination de la $CCID_{50}$ – activité cytopathique – qRT-PCR – Western blott	Inhibition de la production de virus lors de la réplication virale	(Abdelnabi et al., 2017)
Quercétine	Flavonoïde	CHIKV	*In vitro*		(Lani et al., 2015)
Quercétagétine	Flavonoïde	CHIKV			(Lani et al., 2016)
Suramine		CHIKV, SINV, SVF	*In vitro* – activité cytopathique – qRT-PCR	Inhibition de la réplication par action sur polymérases virales	(Albulescu et al., 2015)
			In vivo sur souris		(Kuo et al., 2016)
Sylimarine	Flavonoïde extrait du chardon des champs (*Silybum marianum*)	CHIKV	*In vitro*	Inhibition de la réplication du virus (post-traitement, étapes précoces)	(Lani et al., 2015)

III - Les huiles essentielles répulsives

Les huiles essentielles sont utilisées depuis des siècles dans de nombreuses régions comme répulsifs naturels. La norme NF EN ISO 9235 :2013 définit l'huile essentielle comme « produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage.».

Les plantes aromatiques renferment au sein de leurs organes sécréteurs, des cellules génératrices de métabolites secondaires, molécules très volatiles. Ces dernières sont biosynthétisées à partir d'unités méthyle-2-buta1,3-diène (motif isoprène) qui conduisent par des réactions successives d'addition aux monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes et leurs dérivés d'oxydation tels que les alcools, aldéhydes, cétones, éthers et esters. L'ensemble de ces produits sont accumulés dans des cellules sécrétrices et confèrent à la plante son odeur caractéristique.

La biodiversité locale réunionnaise est reconnue comme une source renouvelable en plantes aromatiques. Lors des épidémies de Chikungunya ou lors d'épisodes de dengue, une partie de la population a eu recours aux plantes aromatiques (Minker, 2007 ; Dutertre, 2011).

Il existe une grande diversité des huiles essentielles, mais aussi une grande diversité dans leur spectre d'activités biologiques (Bakkali et al., 2008). L'utilisation des huiles essentielles a longtemps été réservée à la médecine traditionnelle, que ce soit pour leur activité répulsive ou leurs autres indications thérapeutiques. Les huiles essentielles utilisées comme répulsifs doivent désormais être réévaluées pour répondre aux nouvelles normes européennes de sécurité sanitaire des produits biocides (Journal officiel de l'Union européenne, 2012). C'est le cas des huiles essentielles traditionnellement utilisées comme répulsif cutané à La Réunion, comme *Cymbopogon citratus*, *Pelargonium graveolens* et *Vetiveria zizanioides*.

III.1 - Cymbopogon citratus

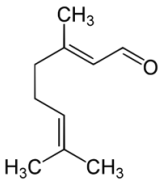
Cymbopogon citratus (DC.) Stapf., plus connue sous le nom de citronnelle ou encore verveine des Indes, est une plante pérenne de la famille des *Poaceae* (Figure 9). Elle se présente avec de longues feuilles vertes linéaires avec peu d'inflorescences et dégage une odeur citronnée (Shah et al., 2011).

Figure 9 Plante *Cymbopogon citratus* avec de longues feuilles.

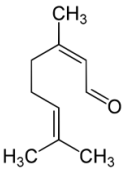
Cette plante herbacée tropicale serait originaire d'Inde mais on la trouve aujourd'hui dans de nombreuses régions tropicales humides et subtropicales (Seaforth et al., 2008). Ainsi, elle est cultivée en Afrique (Bossou et al., 2013), en Amérique du Sud (Franz et al., 2011 ; Seaforth et al., 2008), en Asie tempérée mais aussi dans les îles de l'archipel des Mascareignes (Samoisy and Mahomoodally, 2016). L'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* y est alors utilisée comme répulsif naturel contre les moustiques *Aedes* et *Culex* (Leal and Uchida, 1998 ; Trongtokit et al., 2005 ; Sritabutra and Soonwera, 2013).

III.1.1 - Composition de l'huile essentielle

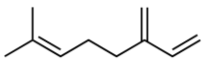
Le chémotype de l'huile essentielle de citronnelle varie selon les pays. On retrouve toutefois comme composés principaux le géranial et néral, respectivement isomères *trans* et *cis* du citral (de 72,60 % à 79 %) (Figure 10).



Géranial



Néral



Myrcène

Figure 10 Composés majoritaires de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus*. L'huile essentielle est extraite à partir des feuilles par hydrodistillation.

Le monoterpène hydrocarboné myrcène est un constituant caractéristique de l'huile essentielle de citronnelle sauf pour celui d'Afrique du Sud où le 2-thuyène (8,05 %) a été identifié en substitution du myrcène (Tableau 3). L'huile essentielle de citronnelle est composée majoritairement de monoterpènes et de sesquiterpènes, avec une proportion plus importante de monoterpènes oxygénés par rapport à l'huile totale (Kpoviessi et al., 2014).

Tableau 3 Composition de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus*

Continent	Pays	Méthode d'analyse	Composés majoritaires	Référence
Afrique	Afrique du sud	GC-MS	Citral : géranial, néral (72,60 %) 2-thuyène (8,05 %)	(Ajayi et al., 2016)
	Angola	GC/MS	Géranial (45,7 %) Néral (32,5 %) β-myrcène (11,5 %)	(Machado et al., 2012)
	Bénin	GC/MS	Géranial (44,3 %) Néral (30,8 %) Myrcène (12,4 %)	(Bossou et al., 2013)
	Bénin	GC/MS GC/FID	Géranial (39,5 %) Néral (35,5 %) β-pinène (10,1 %) Cis-géraniol (4,3 %)	(Kpoviessi et al., 2014)
	Burkina Faso	GC/MS	Géranial (44,6 %) Néral (33 %) Myrcène (10,7 %)	(Menut et al., 2000)
	Togo	GC/MS	Géranial (45,2 %) Néral (32,4 %) Myrcène (10,2 %)	(Koba et al., 2008)
Amérique du Sud	Brésil	GC/MS GC/FID	Géranial (41,3 %) Néral (32,3 %) Myrcène (15,48 %)	(Sacchetti et al., 2005)
	Brésil	GC/MS	Géranial (40,8 %) Néral (36,3 %) β-myrcène (13,2 %)	(Blanco et al., 2009)

L'huile essentielle est utilisée depuis les années 1900, en particulier dans les produits cosmétiques (savons, crèmes, parfums). Cependant elle pourrait produire des irritations, bien qu'ayant une faible toxicité (Opdyke, 1973).

III.1.2 - Ethnopharmacologie

Cymbopogon citratus est connue pour différentes applications. Elle est utilisée aussi bien pour un usage alimentaire qu'en médecine traditionnelle ou encore en aromathérapie (Shah et al., 2011 ; Avoseh et al., 2015 ; Ekpenyong et al., 2015), et son exploitation varie selon les régions (Tableau 4).

Tableau 4 Usages traditionnels de *Cymbopogon citratus*

Continent	Pays	Usages traditionnels	Forme utilisée	Référence
Afrique	Nigéria	Fièvre, rhumes, toux, indigestion, diurétique	Thé, feuilles	(I.S. Akande et al., 2011)
		Diabète, anti-inflammatoire, troubles nerveux		(Avoseh et al., 2015)
	Egypte	Antispasmodique	Décoction des feuilles et tiges	(Shah et al., 2011)
	Rodrigues	Toux	Infusion des feuilles dans l'eau	(Samoisy and Mahomoodally, 2016)
Amérique	Argentine	Rhume, problèmes digestifs	Décoction	(Filipov, 1994)
				(Avoseh et al., 2015)
	Bolivie	Insectifuge	Huile essentielle	(Moore et al., 2007b)
	Brésil	Anxiolytique, antispasmodique, analgésique, sédatif	Thé, Feuilles	(Leite et al., 1986)
				(Souza Formigoni et al., 1986)
		Anti-inflammatoire, antipyrétique		(Shah et al., 2011)
		Troubles digestifs (diurétique)		(Avoseh et al., 2015)
	Colombie	Dentaire	Racines	(Avoseh et al., 2015)
	Costa Rica	Toux, troubles digestifs	Feuilles	(Avoseh et al., 2015)
	Cuba	Rhume, problèmes digestifs, hypotenseur, anti-inflammatoire	Décoction	(Carbajal et al., 1989)
				(Shah et al., 2011)
				(Avoseh et al., 2015)
	Etats-Unis	Blessures, fractures	Décoction	(Spring, 1989)
Asie	Philippines	Fièvre, rhumes, antimicrobien, antifongique, indigestion, antistress	Thé	(Dagupen et al., 2009)
	Thaïlande	Problèmes intestinaux (carminatif, diurétique), fièvre	Feuilles, tiges	(Wannissorn et al., 2005)
		Insectifuge	Huile essentielle	(Shah et al., 2011)
				(Sritabutra, Duangkamon et al., 2011)
	Inde	Répulsif	Plante entière	(Rao and Jamir, 1982)
		Insectifuge, antimicrobien	Huile essentielle	(Bansod and Rai, 2008)
		Fièvre et maux de tête, troubles digestifs	Décoction des feuilles	(Pushpanathan et al., 2006)
				(Shah et al., 2011)
				(Avoseh et al., 2015)

Longtemps réservées à des usages traditionnels, les propriétés de l'huile essentielle de citronnelle sont aujourd'hui réévaluées dans une démarche scientifique rigoureuse. Ainsi les propriétés anti-inflammatoires de *Cymbopogon citratus* ont été évaluées *in vitro* et *in vivo*. L'extrait éthanolique de *Cymbopogon citratus* ou son infusion agissent sur les voies de l'inflammation. Après induction de l'inflammation par le LPS sur des cellules macrophages de souris, en présence d'extraits de citronnelle à 5 ou 10 µg, le médiateur pro-inflammatoire TNF-α est réduit de 56 % dans les cellules avec extraits, par rapport aux cellules sans extraits (Tiwari et al., 2010). De même, les voies de signalisation NF-κB, P38 MAPK et JNK ½ sont inhibées en présence d'extraits de citronnelle (Francisco et al., 2011 ; Francisco et al., 2013). *In vivo*, une décoction de feuilles de citronnelle ingérées par voie orale par des souris réduit faiblement (18 %) l'œdème à la patte induit par la carraghénane (Carbajal et al., 1989). En revanche, l'application cutanée (10 µL) de l'huile essentielle de la citronnelle par voie orale conduit à une diminution de 80 % de l'œdème sur les souris et 75 % de l'œdème à l'oreille (Boukhatem et al., 2014). Le composé majoritaire de l'huile essentielle, le citral, aurait aussi cet effet anti-inflammatoire, notamment en inhibant la voie NF-κB (Lee et al., 2008).

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle a été elle aussi très étudiée. L'huile essentielle de citronnelle cultivée en Thaïlande inhibe la croissance de plusieurs bactéries (*Salmonella* spp, *E. coli*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*) (Wannissorn et al., 2005). L'huile essentielle, ainsi que ses composés majoritaires comme le citral ou le myrcène ont une activité antibactérienne sur *Staphyloccus aureus*. Par contre, seuls l'huile essentielle totale et le citral inhibent la croissance du *Bacillus subtilis* et *E.coli* (Onawunmi et al., 1984). L'huile essentielle de citronnelle est aussi capable de détruire des structures plus complexes, comme le biofilm formé par *Streptococcus mutans* (Tofiño-Rivera et al., 2016).

L'activité antifongique de l'huile essentielle de citronnelle a été établie contre *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* mais aussi *Candida albicans* et *Candida tropicalis* (Bansod and Rai, 2008). Elle agit aussi contre le parasite *Leishmania*, de même que son composé majoritaire, le citral (Machado et al., 2012). L'activité de cette huile contre le parasite responsable du paludisme, *Plasmodium falciparum* a été démontrée *in vitro* (Kpoviessi et al., 2014 ; Akono Ntonga et al., 2014).

L'activité antivirale dose-dépendante de l'huile essentielle de citronnelle sur HSV-1 a été mise en évidence par la méthode de réduction de plaques aux concentrations. A une concentration de 0,1 %, l'huile inhibe complètement HSV-1 lorsqu'elle est incubée 24 h avec le virus, mais pas en situation de prétraitement ou de post-traitement (Minami et al., 2003). Par ailleurs, après 24 h d'incubation de l'huile essentielle ou du citral avec un norovirus non enveloppée murin, le nombre de virions infectieux du norovirus est réduit de 2 $\log_{10}$. Dans ce cas, l'huile essentielle de citronnelle ou le citral se fixeraient

sur la capside du virus et empêcheraient les étapes d'attachement du virus à la cellule-hôte (Gilling et al., 2014). L'activité de fractions à l'hexane de *Cymbopogon nardus* a été montrée sur le virus de la rougeole (M.N. Nurul Aini et al., 2006) et de l'herpès HSV-1 (Bahtiar et al., 2011).

III.2 - *Pelargonium graveolens*

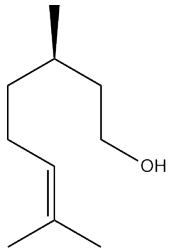
Pelargonium graveolens L'Hér ou encore *Pelargonium x asperum* est une plante herbacée vivace de la famille des *Geraniaceae* et du genre *Pelargonium*. Elle est appelée communément géranium rosat et possède de nombreuses inflorescences (Figure 11). D'origine africaine, on la retrouve aujourd'hui cultivée à La Réunion, en Chine, en Egypte, en Algérie, au Maroc et en Inde (Narayana et al., 1986). La Chine et l'Egypte sont les plus grands producteurs d'huile essentielle de géranium (80 tonnes), suivis de l'Inde (20 tonnes), puis de la Réunion (3 tonnes) et l'Afrique du Sud (3 tonnes) (Lawrence, 2009).

Figure 11 Inflorescences de *Pelargonium graveolens*

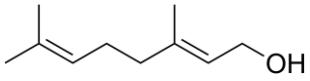
Pour ses propriétés sensorielles olfactives, l'huile essentielle est largement utilisée en parfumerie et aromathérapie. L'huile essentielle est obtenue par hydrodistillation à partir des feuilles de *Pelargonium graveolens*. La composition diffère si l'huile essentielle est obtenue exclusivement des feuilles ou des tiges (Ravindra and Kulkarni, 2015).

III.2.1 - Composition de l'huile essentielle

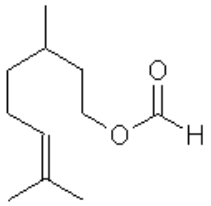
Suivant la variété, la composition de l'huile essentielle varie par le pourcentage des composés majoritaires (citronellol et géraniol) et certains composés ne se retrouvent pas dans toutes les huiles de géranium (Chauhan and Verma, 2010 ; Singh et al., 1999). L'huile essentielle obtenue à partir de plantes en Italie possède 61 composés, dont 69 % de monoterpènes oxygénés, 16,2 % de sesquiterpènes oxygénés et 9,7 % de sesquiterpènes hydrocarbonés (Benelli et al., 2017). De manière générale, elle est composée majoritairement des monoterpènes oxygénés citronellol, géraniol et du formiate de citronellyle (Tableau 5, Figure 12).



Citronellol



Géraniol



Formiate de citronellyle

Figure 12 Composés majoritaires de l'huile essentielle *P. graveolens*. Cette huile est obtenue à partir des feuilles par hydrodistillation

Kulkarni et al. ont montré qu'il pouvait y avoir une variation de la composition de l'huile essentielle entre intra-clones de *Pelargonium* sp. cultivar Bourbon. Bien qu'il n'y ait pas de variations morphologiques, certains clones montrent en effet une composition différente avec un pourcentage d'isomenthone plus élevé que celui du citronellol et du géraniol (Kulkarni et al., 1997).

Tableau 5 Composition de l'huile essentielle obtenue à partir des feuilles de *Pelargonium graveolens*

Pays	**Méthode d'analyse**	**Composés majoritaires**	**Référence**
Algérie	GC/MS	Citronellol (30,2 %)	(Boukhatem et al., 2013b)
		Formiate de citronellyle (9,3 %)	
		Géraniol (7,6 %)	
		Guai-6,9-diene (5,4 %)	
Bosnie-Herzégovine	GC/MS	Géraniol (27,5 %)	(Ćavar and Maksimović, 2012)
		Citronellol (19 %)	
		10-épi-γ-eudesmol (5 %)	
		Guai-6,9-diène (4,6 %)	
Inde (montagnes)	GC/FID	Citronellol (21,3-28,7 %)	(Verma et al., 2010)
		Géraniol (23,1-38,4 %)	
		Linalol (4,2-6,5 %)	
		Iso-menthone (6,5-7,9 %)	
Iran		Citronellol (48,4 %)	(Mousavi et al., 2014)
		O-octène-1-ol (18,61 %)	
		p-menthone (6,96 %)	
Italie	GC/MS	Citronellol (32,8 %)	(Benelli et al., 2017)
		10-épi-γ-eudesmol (10,6 %)	
		Formiate de citronellyle (10,0 %)	
		Isomenthone (6,3 %)	

Tableau 5 (suite) Composition de l'huile essentielle obtenue à partir des feuilles de *Pelargonium graveolens*

Serbie	GC/MS	Citronellol (24,54 %) Géraniol (15,33 %) Formiate de citronellyle (10,66 %) Linalol (9,80 %)	(Dzamic et al., 2013)
Taïwan	GC/MS	Citronellol (28,9 %) Guai-6,9-diène (20,1 %) Formiate de citronellyle (11,7 %)	(Lin et al., 2016)
Tajikistan	GC/MS	Citronellol (37,5 %) Géraniol (6,0 %) Oxyde de caryophyllène (3,7 %) Menthone (3,1 %)	(Sharopov et al., 2014)
Tunisie	GC/MS	Citronellol (21,9 %) Formiate de citronellyle (13,2 %) Géraniol (11,1 %) 10-épi-γ-eudesmol (7,9 %)	(Boukhris et al., 2013)
Tunisie	GC/FID	Citronellol (21,93-30,61 %) Géraniol (11,07-15,63 %) Formiate de citronellyle (9,76-13,24 %)	(Boukhris et al., 2015)
n.d.	GC/MS	Citronellol (33,4 %) Géraniol (12 %) Formiate de citronellyle (10,9 %) Menthone (6,3 %) Linalol (5,5 %)	(Fang et al., 2016)
n.d.	GC/MS	Citronellol (33,6 %) Géraniol (26,8 %) Linalol (10,5 %) Formiate de citronellyle (9,7 %) p-menthone (6,0 %)	(Rana et al., 2002)

III.2.2 - Ethnopharmacologie

Les propriétés biologiques de l'huile essentielle de géranium ne sont pas autant décrites que celles de l'huile essentielle de citronnelle. A La Réunion, les feuilles sont utilisées pour aider à la cicatrisation des plaies. L'huile essentielle est utilisée comme vermifuge mais aussi contre les symptômes grippaux (fatigue, fièvre, rhume, toux) (Lavergne and Véra, 1989). En usage externe, l'huile essentielle est utilisée contre toutes les dermatoses (Lavergne, 2004).

Les propriétés anti-inflammatoires de l'huile essentielle de géranium ont été aussi reportées dans la littérature. Une étude *in vivo* sur des souris montre une réduction de l'inflammation responsable

d'œdèmes au niveau de la patte ou de l'oreille après respectivement une injection ou une application cutanée de l'huile essentielle (200 ou 400 mg/kg). La diminution de l'œdème est dépendant de la dose de l'huile essentielle appliquée. Pour la dose 400 mg/kg, l'œdème à la patte est réduit à 73 % et l'œdème à l'oreille à 88 % (Boukhatem et al., 2013a). Une étude *in vitro* a établi l'effet anti-inflammatoire de l'huile essentielle de géranium sur des cellules nerveuses microgliales, par l'inhibition de la production de NO (Elmann et al., 2010).

L'activité antimicrobienne, tant bactérienne que fongicide, de l'huile essentielle de géranium a été aussi décrite (Dorman and Deans, 2000 ; Boukhris et al., 2013 ; Raut and Karuppayil, 2014).

L'activité contre *Leishmania* de l'huile essentielle de géranium ou de ses composés majoritaires, tels que le géraniol a été mise en évidence (Essid et al., 2015). Le géranium a une activité antibactérienne contre *E. coli* mais aussi plusieurs bactéries gram-négatives isolées de patients (Lin et al., 2016 ; Sienkiewicz et al., 2014). L'activité antifongique a été caractérisée, entre autres, pour le champignon *Ascoshpaera apis* mais aussi *Candida*, en action synergique avec l'amphotéricine B (Ansari et al., 2016 ; Rosato et al., 2008) et la levure *Malassezia* (Naeini et al., 2011).

III.3 - *Vetiveria zizanioides*

Vetiveria zizanioides (L.) Nash, répertoriée également sous les noms *Andropogon zizanioides*, *Chrysopogon zizanioides* est une plante pérenne de 1 à 2 m de haut avec des racines très développées (Figure 13). Elle fait partie de la famille des Poacées. Originaire d'Inde, elle a été introduite et cultivée dans de nombreuses régions tropicales.

Figure 13 Racines et partie aérienne de *Vetiveria zizanioides*

Les principaux producteurs du vétiver sont Haïti, l'Inde, Java et la Réunion ("Index de la flore," 2017). C'est une plante hydrophyte, mais dont la culture est peu exigeante. En effet, elle résiste à des conditions très sèches ou très humides. L'huile essentielle est utilisée principalement en parfumerie, mais la plante entière est aussi souvent utilisée en bordures pour fixer le sol. Elle est produite principalement en Haïti et en Indonésie mais aussi à Madagascar et à La Réunion (Lawrence, 2009).

III.3.1 - Composition de l'huile essentielle

L'huile essentielle de vétiver est très visqueuse et s'obtient par hydrodistillation des racines. Cette huile ne contient pas de composés majoritaires définis, mais elle est plus riche en composés que les huiles essentielles précédentes (Tableau 6). Elle est constituée majoritairement de sesquiterpènes oxygénés, puis de monoterpènes oxygénés (Filippi et al., 2013).

Tableau 6 Composition chimique de l'huile essentielle obtenue à partir des racines de *Vetiveria zizanioides*

Pays ou type	Méthode d'analyse	Composition	Référence
Bourbon	GC-MS	Alcools (27 %)	(Martinez et al., 2004)
		Composés carbonyles (16,4 %)	
		Hydrocarbones (8,9 %)	
		Isovalencénol (8,9 %)	
Brésil	GC-MS	Alcools (28,3 %)	(Martinez et al., 2004)
		Acide zizanoique (24,0 %)	
		Acides carboxyliques (24 %)	
Haïti	GC-MS	Alcools (43 %)	(Martinez et al., 2004)
		Composés carbonyles (18,2 %)	
		Isovalencénol (15,3 %)	
Inde	GC-FID	Khusimol (16,25 %)	(Chahal et al., 2015)
		Khusinol (10,28 %)	
		Germacrène-D (9,73 %)	
Java	GC-MS	Hydrocarbones (28,3 %)	
		Alcools (21,3 %)	
		Composés carbonyles (17,7 %)	
Taïwan	GC/MS	Cedr-8-ène-13-ol (12,36 %)	(Chou et al., 2012)
		α-amorphène (7,80 %)	
		β-vatirenène (5,94 %)	
		α-gurjunène (5,91 %)	
		Déhydro-aromadendrène (5,45 %)	

Tableau 6 (suite) Composition chimique de l'huile essentielle obtenue à partir des racines de *Vetiveria zizanioides*

	β-vetispirène (1,6-4,5 %) Khusimol (3,4-13,7 %) Vétisélinènol (1,3-7,8 %) α-vétivone (2,5-6,3 %)	(Champagnat et al., 2006)

III.3.2 - Ethnopharmacologie

Le vétiver est utilisé traditionnellement pour de nombreux usages. Ainsi à La Réunion, la tisane du vétiver est utilisée comme régulateur menstruel ou la décoction de ses racines contre les diarrhées. Une boisson composée de quelques gouttes de l'huile essentielle de vétiver ajoutées à une tisane de citronnelle sert contre la fièvre et la toux (Aplamedom, 2013). Dans l'île de Rodrigues, on utilise les racines de cette plante en infusion contre les rhumes et les symptômes grippaux (Samoisy and Mahomoodally, 2016). Dans les îles des Caraïbes, elle est utilisée en décoction des racines contre les douleurs abdominales mais aussi la fièvre et la grippe (Seaforth et al., 2008).

Toutefois, il y a à ce jour peu d'études sur l'activité biologique de l'huile essentielle de vétiver. Chou et al. ont mis en évidence une activité anti-inflammatoire corrélée à une activité antioxydante sur des macrophages stimulée par LPS (Chou et al., 2012). L'action répulsive de l'huile essentielle a été mise en évidence contre *Culex quinquefasciatus* et *Anopheles minimus* (Sathantriphop et al., 2014). Les extraits éthanoliques à partir des racines sont des pesticides contre le vecteur du paludisme *Anopheles stephensi* (Aarthi and Murugan, 2012) mais aussi contre les termites (Nix et al., 2006).

L'approche ethnopharmacologique a permis de décrire une activité répulsive des huiles essentielles de citronnelle, géranium et vétiver, comme on l'a vu précédemment (II.1.3 -) ainsi que d'autres propriétés biologiques, mais la potentielle activité antivirale reste peu caractérisée. Peu d'études décrivent la potentielle activité antivirale du géranium, si ce n'est contre le virus influenza avec une inhibition de plus de 60 % de l'activité du virus (Turmagambetova et al., 2015). A ce jour, les possibles effets secondaires des huiles essentielles de citronnelle, géranium et vétiver ont été peu étudiés.

PARTIE 2 : Résultats

I - Caractérisation chimique des huiles essentielles

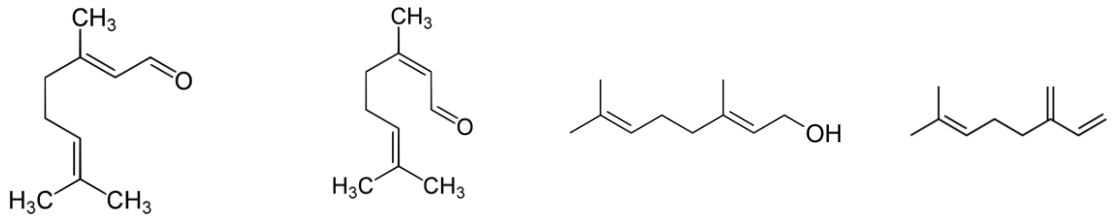
Une huile essentielle est un mélange très complexe et sa composition chimique dépend de multiples caractéristiques de sa matière première (organe considéré, conditions écologiques, maturité, mode de récolte, méthode et paramètre d'extraction), mais elle est généralement définie par l'origine du matériel végétal et le procédé utilisé pour son extraction. Pour les activités biologiques recherchées dans cette étude, la caractérisation chimique fine des huiles essentielles était fondamentale.

L'analyse chimique des huiles essentielles est effectuée en routine par chromatographie gazeuse couplée à la fois à un spectromètre de masse (GC-MS) pour l'analyse qualitative et un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) pour l'analyse quantitative. Ces techniques classiques sont uniquement basées sur la volatilité (température d'ébullition) et la masse des constituants mais leur sensibilité est souvent limitée, par exemple pour la résolution des isomères. Le domaine analytique appliqué à la caractérisation fine de mélanges complexes s'appuie de plus en plus sur la technologie avancée de la chromatographie gazeuse bidimensionnelle couplée à un spectromètre de masse à temps de vol (GC × GC-TOF MS). En effet, la chromatographie bidimensionnelle consiste à coupler deux colonnes de polarités différentes pour avoir une séparation parfaite des isomères. Cette méthode est appliquée aux mélanges complexes qui conduisent à de nombreuses co-élutions. À l'heure actuelle, le seul détecteur de masse parfaitement adapté au couplage GC × GC est le détecteur de masse à temps de vol (GC × GC-TOF MS). Ce spectromètre possède une vitesse d'acquisition des spectres supérieure à 500 Hz qui permet alors l'enregistrement de 10 à 20 spectres par pic, ce qui est parfaitement adapté au couplage GC × GC.

Dans cette étude, les trois huiles essentielles ont été isolées à partir des parties aériennes (citronnelle, géranium) ou des racines (vétiver) de la plante par hydrodistillation, qui reste la technique d'extraction la plus courante. Pour leur caractérisation chimique, l'analyse quantitative par GC-FID a été ici associée à une analyse qualitative par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse à temps de vol en mode monodimensionnel (1D-GC-TOF MS). La chromatographie gazeuse permet de séparer les différents constituants selon leur affinité pour la colonne et ainsi déterminer leurs temps de rétention sur cette colonne. Les indices de rétention (KI) sont calculés sur la base des n-alcanes C_7-C_{30} et des spectres de masse obtenus, comparés aux bases de données et la littérature existantes (Adams, 2004).

I.1 - Cymbopogon citratus

L'huile essentielle de citronnelle, de couleur jaune, a été obtenue avec un rendement de 0,3 % (w/w) par rapport à la matière sèche initialement traitée. 48 constituants ont été détectés et 37 d'entre eux ont été identifiés, soit 99,4 % de la composition totale (Tableau 7). Les données établissent une composition riche en monoterpènes et sesquiterpènes. Les monoterpènes oxygénés sont prédominants (90,16 %). Deux aldéhydes monoterpéniques isomères, le géranial (45,11 %) et le néral (32,16 %) formant le mélange appelé citral, sont les constituants majoritaires avec l'alcool monoterpénique géraniol (3,29 %). La composition chimique révèle la présence notable de monoterpènes hydrocarbonés (8,49 %) avec principalement du myrcène (7,85 %) (Figure 14).



Géranial Néral Géraniol Myrcène

Figure 14. Constituants majoritaires de l'huile essentielle de *C. citratus*. L'huile est obtenue par hydrodistillation de la partie aérienne.

La résolution plus importante avec la technique GC–TOF-MS a permis d'identifier des constituants jusqu'ici non répertoriés dans les compositions décrites. Ainsi, plusieurs monoterpènes oxygénés comme le 1,8-cinéole, l'oxyde de (Z)-limonène, le verbénol ou encore les isomères (Z)-isocitral et (E)-isocitral ont été identifiés dans l'huile essentielle de citronnelle (Tableau 7).

Les constituants oxygénés sont réputés responsables de l'activité biologique répulsive de l'huile essentielle de citronnelle (Papachristos et al., 2004). Pour les besoins de cette étude, le fractionnement de l'huile a été effectué par élution sur colonne pour séparer une fraction enrichie en composés oxygénés et une fraction enrichie en hydrocarbures. La comparaison des chromatogrammes (Figure 15) indique que cette méthode simple de séparation a été efficace. En effet, le géranial, le néral et le géraniol sont retrouvés dans la fraction oxygénée et le myrcène est identifié dans la fraction hydrocarbonée.

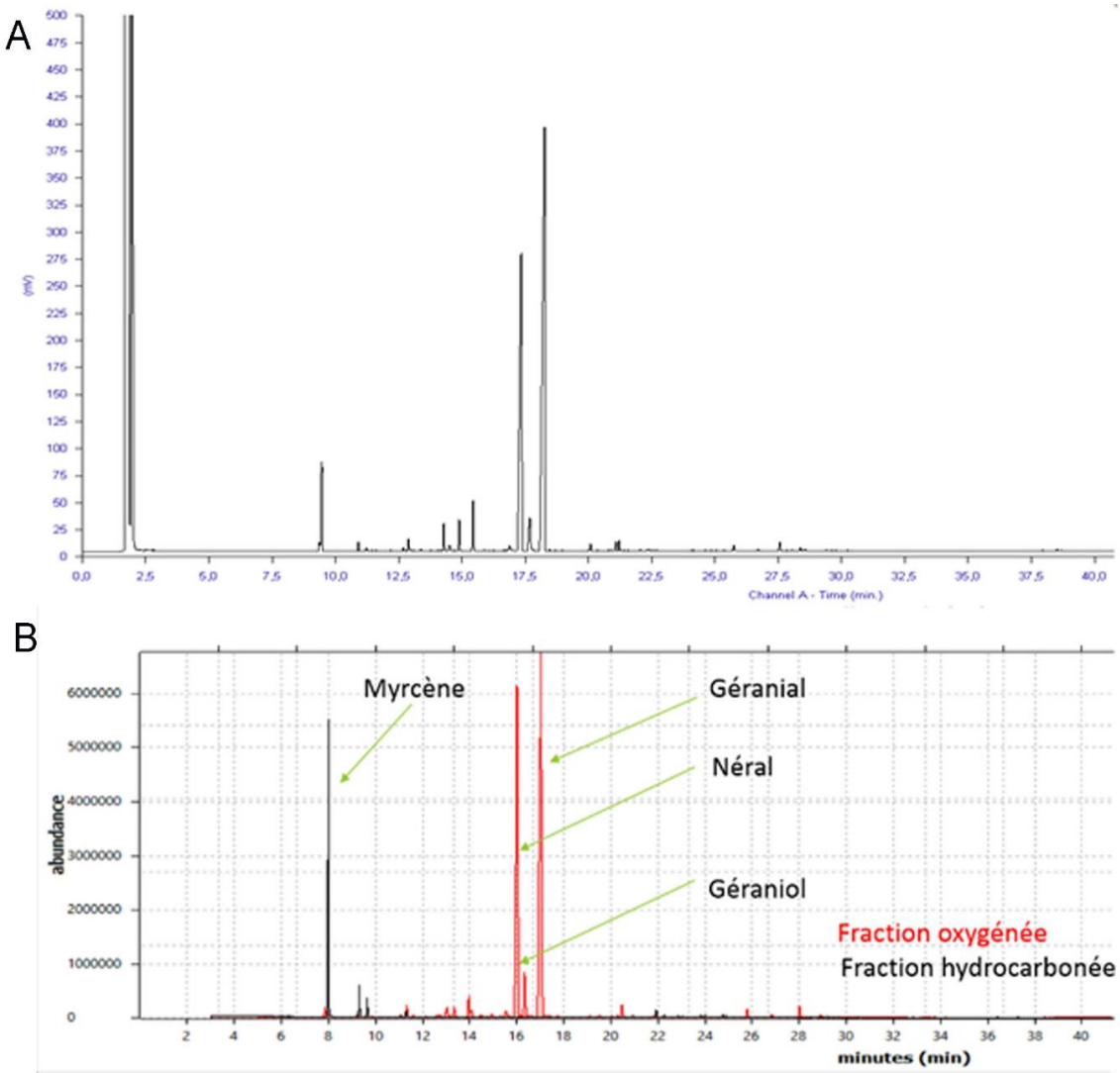
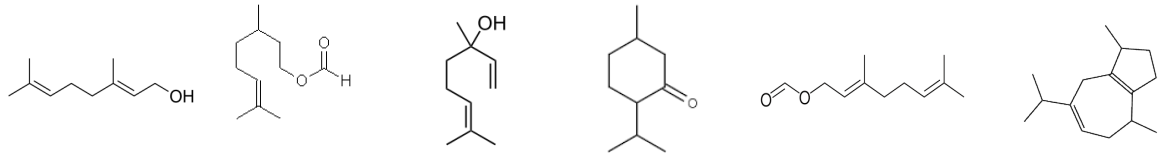


Figure 15 Chromatogrammes de l'huile essentielle de citronnelle ou de ses fractions. Injection en GC-MS de l'huile essentielle de citronnelle (A) ou superposition des chromatogrammes obtenus après injection de la fraction oxygénée et la fraction hydrocarbonée de citronnelle (B).

I.2 - Pelargonium graveolens

L'huile essentielle de géranium a été obtenue par hydrodistillation avec un rendement de 2 % (w/w) par rapport à la matière sèche initiale et elle se présente avec une couleur verte. L'analyse chimique permet de détecter 75 composés dont 67 ont été identifiés pour 98,74 % de la composition totale (Tableau 8). La composition détaillée révèle la prédominance de monoterpènes oxygénés (81,17 %) avec trois alcools (citronellol : 23,43 % ; géraniol : 16,85 % ; linalol : 10,79 %) ainsi que deux de leurs dérivés esters (formiate de citronellyle : 12,29 % ; formiate de géranyle : 4,72 %) et une cétone (isomenthone : 7,06 %). L'huile essentielle se distingue par la présence significative de sesquiterpènes hydrocarbonés (8,21 %) avec le constituant caractéristique guaia-6,9-diène pour une proportion de 3,54 % (Figure 16).



Géraniol | Formiate de citronellyle | Linalol | Isomenthone | Formiate de géranyle | Guaia-6,9-diène

Figure 16. Constituants majoritaires de l'huile essentielle de géranium. L'huile est obtenue par hydrodistillation de la partie aérienne.

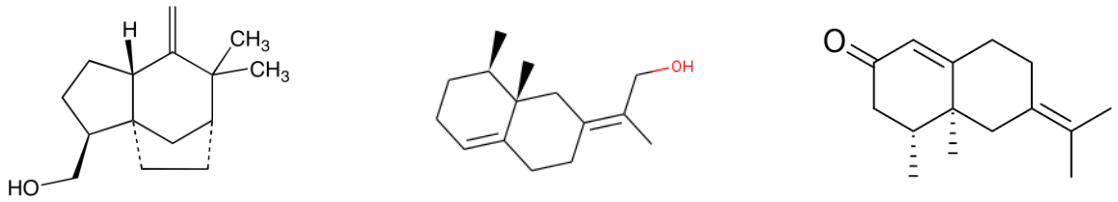
Comme précédemment, des constituants supplémentaires ont été identifiés : plusieurs monoterpènes oxygénés apparaissent dans notre huile essentielle, comme le terpinène-4-ol, l'isomenthol, le myrténol ou le (E)-myrtanol ainsi que plusieurs monoterpènes hydrocarbonés, dont les isomères (Z)-β-ocimène et (E)-β-ocimène (Tableau 8).

Selon la même méthode que pour l'huile essentielle de citronnelle, une fraction enrichie en composés oxygénés et une fraction enrichie en hydrocarbures ont été obtenues par fractionnement sur colonne. Le géraniol, le formiate de citronellyle, le linalol, l'isomenthone et le formiate de géranyle sont identifiés dans la fraction oxygénée et le guaia-6,9-diène est retrouvé dans la fraction hydrocarbonée.

I.3 - Vetiveria zizanioides

L'huile essentielle de vétiver a été obtenue par hydrodistillation des racines avec un rendement de 0,3 % (w/w) par rapport à la matière sèche initiale et elle se présente sous forme d'un liquide visqueux de couleur jaune. L'analyse chimique permet de caractériser un mélange très complexe de 90 composés

dont seulement 53 composés ont été identifiés, soit 78,60 % de la composition totale de l'huile essentielle (Tableau 9). Les données détaillées montrent que les sesquiterpènes oxygénés khusimol (23,78 %), (E)-isovalencénol (6,79 %) et α-vétivone (3,84 %) (Figure 17) forment les constituants à plus fortes teneurs.



Khusimol (E)-isovalencénol α-vétivone

Figure 17 Constituants majoritaires de l'huile essentielle de vétiver. L'huile est obtenue par hydrodistillation à partir des racines.

Parmi les constituants jusqu'ici non répertoriés, on trouve de nombreux sesquiterpènes comme par exemple les isomères α-vétispirène et β-vétispirène ou encore le khusimone (Tableau 9).

Tableau 7 Composition chimique de l'huile essentielle *C. citratus* (feuilles) de La Réunion. Les résultats sont exprimés en la moyenne du pourcentage de l'aire ± erreur standard (n=9). Les composés majoritaires sont indiqués en gras.

No	Nom	KI[a]	KI[b]	Identification	%
1	6-Méthyl-5-heptène-2-one	988	985	KI, MS	0,76 ± 0,25
2	**Myrcène**	**991**	**990**	KI, MS	**7,85 ± 1,46**
3	1,8-Cinéole	1031	1031	KI, MS	0,04 ± 0,00
4	(Z)-β-Ocimène	1039	1037	KI, MS	0,33 ± 0,06
5	(E)-β-Ocimène	1050	1050	KI, MS	0,22 ± 0,04
6	γ-Terpinène	1062	1059	KI, MS	0,05 ± 0,00
7	Terpinolène	1094	1088	KI, MS	0,04 ± 0,00
8	6,7-Epoxymyrcène	1098	1092	KI, MS	0,14 ± 0,04
9	Linalol	1100	1096	KI, MS	0,70 ± 0,10
10	Oxyde de (Z)-limonène	1143	1136	KI, MS	0,08 ± 0,03
11	(Z)-Verbénol	1148	1141	KI, MS	1,34 ± 0,17
12	Citronellal	1155	1153	KI, MS	0,60 ± 0,14
13	Oxyde de β-pinène	1161	1159	KI, MS	0,05 ± 0,01
14	(Z)-isocitral	1167	164	KI, MS	1,61 ± 0,28
15	**(E)-isocitral**	**1184**	**1180**	KI, MS	**2,68 ± 0,47**
16	α-Terpinéol	1197	1188	KI, MS	0,08 ± 0,00
17	Citronellol	1233	1225	KI, MS	0,54 ± 0,11
18	(Z)-Carvéol	1237	1229	KI, MS	0,07 ± 0,01
19	**Néral**	**1249**	**1238**	KI, MS	**32,16 ± 0,69**
20	**Géraniol**	**1260**	**1252**	KI, MS	**3,29 ± 0,31**
21	**Géranial**	**1279**	**1267**	KI, MS	**45,11 ± 2,46**
22	Formiate de néryle	1293	1282	KI, MS	0,03 ± 0,00
23	2-Undécanone	1343	1368[c]	KI, MS	0,24 ± 0,15
24	Acétate de néryle	1379	1361	KI, MS	0,34 ± 0,22
25	Acétate de géranyle	1383	1381	KI, MS	0,49 ± 0,06
26	β-Elemène	1414	1390	KI, MS	0,08 ± 0,00
27	Acide nérolique	1424	1423[c]	KI, MS	0,05 ± 0,02
28	(E)-Caryophyllène	1427	1419	KI, MS	0,08 ± 0,01
29	α-(E)-Bergamotène	1438	1434	KI, MS	0,05 ± 0,01
30	α-Humulène	1458	1454	KI, MS	0,06 ± 0,00
31	γ-Muurolène	1493	1479	KI	0,04 ± 0,00
32	Elémol	1557	1549	KI, MS	0,26 ± 0,05
33	Oxyde de caryophyllène	1594	1583	KI, MS	0,08 ± 0,02
34	τ-Muurolol	1652	1642	KI	0,04 ± 0,00
35	α-Cadinol	1665	1654	KI, MS	0,09 ± 0,02
36	Intermédeol	1673	1666	KI, MS	0,12 ± 0,00
37	Eudesm-7(11)-en-4-ol	1709	1700	KI, MS	0,04 ± 0,00
	Total identifié, %				99,84

[a] Indices de rétention de Kovats calculés grâce aux n-alcanes C_7-C_{30} sur une colonne non polaire Elite-5

[b] Indices de rétention de Kovats sur colonne non polaire DB-5 d'après la littérature (Adams, 2004)

Tableau 8 Composition chimique de l'huile essentielle de *P. graveolens* (feuilles) de La Réunion. Les résultats sont exprimés en la moyenne du pourcentage de l'aire ± erreur standard (n=9). Les composés majoritaires sont indiqués en gras.

No	Nom	KI[a]	KI[b]	Identification	%
1	ni	591			
2	ni	600			
3	α-Pinène	939	939	KI, MS	0,52 ± 0,01
4	β-Pinène	978	979	KI, MS	0,08 ± 0,00
5	Myrcène	994	990	KI, MS	0,71 ± 0,05
6	Oxyde de déhydro-trans-linalol	997	993	KI, MS	0,10 ± 0,00
7	α-Phellandrène	1008	1002	KI, MS	0,09 ± 0,01
8	p-Cymène	1030	1024	KI, MS	0,36 ± 0,02
9	Limonène	1034	1029	KI, MS	0,14 ± 0,03
10	β-phellandrène	1040	1029	KI, MS	0,08 ± 0,01
11	(Z)- β-Ocimène	1044	1037	KI, MS	0,23 ± 0,01
12	(E)- β-Ocimène	1054	1050	KI, MS	0,35 ± 0,02
13	Oxyde de (Z)-linalol	1080	1072	KI, MS	0,35 ± 0,00
14	Oxyde de (E)- linalol	1095	1086	KI, MS	0,19 ± 0,01
15	**Linalol**	**1107**	**1096**	**KI, MS**	**10,79 ± 0,05**
16	Hydrate de (E)-sabinène	1111	1098	KI, MS	0,08 ± 0,01
17	6-Méthyl-3,5-heptadiène-2-one	1114	1105	KI, MS	0,07 ± 0,01
18	Oxyde de (Z)-Rose	1117	1108	KI, MS	0,54 ± 0,01
19	Oxyde de (E)-Rose	1136	1125	KI, MS	0,22 ± 0,01
20	Isobutanoate de (Z)-3-Hexényle	1152	1146	KI, MS	0,07 ± 0,00
21	ni	1160			0,06 ± 0,00
22	Menthone	1162	1152	KI, MS	0,46 ± 0,03
23	**Isomenthone**	**1174**	**1162**	**KI, MS**	**7,06 ± 0,02**
24	Terpinène-4-ol	1186	1177	KI, MS	0,07 ± 0,01
25	p-cymène-8-ol	1189	1182	KI, MS	0,16 ± 0,01
26	isomenthol	1191	1182	KI, MS	0,12 ± 0,00
27	α-terpinéol	1198	1188	KI, MS	0,83 ± 0,05
28	Myrténol	1205	1195	KI, MS	0,07
29	**Citronellol**	**1241**	**1225**	**KI, MS**	**23,43 ± 0,14**
30	Néral	1251	1238	KI, MS	0,60 ± 0,00
31	**Géraniol**	**1268**	**1252**	**KI, MS**	**16,85 ± 0,05**
32	(E)-Myrtanol	1273	1261	KI, MS	0,30 ± 0,05
33	Géranial	1280	1267	KI, MS	0,86 ± 0,06
34	**Formiate de citronellyle**	**1283**	**1273**	**KI, MS**	**12,29 ± 0,05**
35	Formiate de néryle	1288	1282	KI, MS	0,16 ± 0,00
36	**Formiate de géranyle**	**1309**	**1298**	**KI, MS**	**4,72 ± 0,04**
37	α-Cubébène	1316	1351	KI, MS	0,21 ± 0,00
38	Acétate de citronellyle	1359	1352	KI, MS	0,28 ± 0,01
39	Propanoate de 2-Phényléthyle	1363	1354	KI, MS	0,08 ± 0,01

Tableau 8 (suite) Composition chimique de l'huile essentielle *P. graveolens* (feuilles) de La Réunion.

40	α-Ylangène	1384	1375	KI, MS	0,14 ± 0,01
41	α-Copaène	1390	1376	KI, MS	0,40 ± 0,00
42	β-Bourbonène	1394	1388	KI, MS	0,46 ± 0,01
43	Isobutanoate de phényléthyle	1399	1393	KI, MS	0,20 ± 0,00
44	ni	1404			0,08 ± 0,01
45	**(E)-caryophyllène**	1431	1419	KI, MS	0,84 ± 0,01
46	α-guaiène	1449	1439	KI, MS	0,58 ± 0,01
47	**Guaia-6,9-diène**	**1455**	**1444**	**KI, MS**	**3,54 ± 0,05**
48	Propanoate de cytronellyle	1460	1446	KI, MS	0,30 ± 0,01
49	α-humulène	1466	1454	KI, MS	0,21 ±0,01
50	Allo-aromadendrène	1474	1460	KI, MS	0,11 ± 0,01
51	**Propanoate de géranyle**	**1481**	**1477**	**KI, MS**	**1,16 ± 0,02**
52	γ-muurolène	1487	1479	KI, MS	0,08 ± 0,01
53	Germacrène	1492	1481	KI, MS	0,60 ± 0,01
54	Isobutanoate de citronellol	1498	1483	KI, MS	0,11 ± 0,00
55	α-selinène	1511	1498	KI, MS	0,09 ± 0,01
56	α-muurolène	1519	1500	KI, MS	0,24 ± 0,00
57	d-amorphène	1526	1512	KI, MS	0,09 ± 0,00
58	Trans-calamenène	1534	1522	KI, MS	0,51 ± 0,00
59	Butanoate de citronellyle	1535	1531	KI, MS	0,29 ± 0,00
60	Furopelargone A	1554	1540	KI, MS	0,28 ± 0,01
61	**Butanoate de géranyle**	**1567**	**1564**	**KI, MS**	**1,18 ± 0,01**
62	**Tiglate de 2-phényléthyle**	**1598**	**1585**	**KI, MS**	**1,03 ± 0,01**
63	ni	1608			0,20 ± 0,01
64	Isovalerate de géranyle	1614	1607	KI, MS	0,09 ± 0,00
65	Cubénol<1,10-di-epi->	1629	1619	KI, MS	0,09 ± 0,01
66	10-épi-gamma-eudesmol	1632	1623	KI, MS	0,20 ± 0,01
67	Valérate de citronellyle	1637	1625	KI, MS	0,10 ± 0,00
68	ni	1645			0,07 ± 0,01
69	α-muurolol	1659	1646		0,27 ± 0,01
70	β-eudesmol	1663	1650		0,15 ± 0,03
71	Valérate de géranyle	1673	1656		0,50 ± 0,06
72	Tiglate de citronellyle	1689	1668		0,12 ± 0,03
73	Tiglate de géranyle	1709	1696		1,30 ± 0,02
74	ni	1724			0,02 ± 0,00
75	ni	1761			0,07 ± 0,00
	Total identifié, %				98,74

[a] Indices de rétention de Kovats calculés grâce aux n-alcanes C_7-C_{30} sur une colonne non polaire Elite-5

[b] Indices de rétention de Kovats sur colonne non polaire DB-5 d'après la littérature (Adams, 2004)

Tableau 9 Composition chimique de l'huile essentielle *V. zizanioides* (racines) de La Réunion. Les résultats sont exprimés en la moyenne du pourcentage de l'aire ± erreur standard (n=6). Les composés majoritaires sont indiqués en gras.

No	Nom	KI[a]	KI[b]	Identification	%
1	1,8-cinéole	1039	1031	KI, MS	0,09
2	Linalol	1105	1096	KI, MS	0,90
3	ni	1154	1146	KI, MS	0,07
4	Menthone	1161	1153	KI, MS	0,12
5	Isomenthone	1172	1164	KI, MS	0,08
6	Bornéol	1178	1169	KI, MS	0,05
7	Terpinène-4-ol	1185	1177	KI, MS	0,35
8	α-Terpinéol	1197	1189	KI, MS	0,42
9	**Citronellol**	**1237**	**1229**	**KI, MS**	**3,98**
10	Géraniol	1263	1255	KI, MS	0,52
11	ni	1357	1349	KI, MS	0,09
12	ni	1362	1354	KI, MS	0,10
13	α-Ylangène	1375	1367	KI, MS	0,11
14	α-copaène	1378	1370	KI, MS	0,82
15	Isoledène	1389	1381	KI, MS	0,08
16	β-cubébène	1392	1384	KI, MS	0,11
17	7-épi-sesquithujène	1400	1392	KI, MS	0,19
18	Acora-3,7(14)-diène	1419	1411	KI, MS	0,08
19	β-Funebrène	1424	1416	KI, MS	0,17
20	**2,5-dimethoxy-p-cymène**	**1433**	**1425**	**KI, MS**	**1,29**
21	ni	1442	1434	KI, MS	0,11
22	Prezizaène	1460	1452	KI, MS	0,79
23	Khusimène	1465	1457	KI, MS	1,00
24	ni	1467	1459	KI, MS	0,12
25	ni	1478	1470	KI, MS	0,12
26	ni	1481	1473	KI, MS	0,82
27	ni	1490	1482	KI, MS	0,29
28	α-Amorphène	1493	1485	KI, MS	0,44
29	α-Vétispirène	1496	1488	KI, MS	0,88
30	β-Vétispirène	1502	1494	KI, MS	0,57
31	δ-Sélinène	1511	1503	KI, MS	0,12
32	ni	1517	1509	KI, MS	0,08
33	δ-Amorphène	1521	1513	KI, MS	0,10
34	Nootkatène	1525	1517	KI, MS	0,20
35	δ-Cadinène	1535	1527	KI, MS	0,31
36	γ-Vétivénène	1542	1534	KI, MS	0,17
37	ni	1551	1543	KI, MS	0,14
38	α-Calacorène	1557	1549	KI, MS	0,70
39	Elémol	1563	1555	KI, MS	0,58

Tableau 9 (suite) Composition chimique de l'huile essentielle de *V. zizanioides* (racines) de La Réunion.

40	β-Vétivénène	1568	1560	KI, MS	0,43
41	**Epi-longipinanol**	**1577**	**1569**	**KI, MS**	**1,46**
42	β-calacorène	1580	1572	KI, MS	0,17
43	ni	1583	1575	KI, MS	0,31
44	ni	1585	1577	KI, MS	0,10
45	Oxyde de caryophyllène	1589	1581	KI, MS	0,17
46	Tiglate de 2-phényléthyle	1599	1591	KI, MS	0,59
47	Viridiflorol	1607	1599	KI, MS	0,51
48	ni	1609	1601	KI, MS	0,35
49	ni	1615	1607	KI, MS	0,80
50	**Khusimone**	**1622**	**1614**	**KI, MS**	**3,36**
51	ni	1627	1619	KI, MS	0,22
52	di-épi-1,10-Cubénol	1633	1625	KI, MS	0,69
53	ni	1637	1629	KI, MS	2,24
54	ni	1642	1634	KI, MS	0,67
55	Eremoligénol	1650	1640	KI, MS	1,15
56	Epoxyde de allo-Aromadendrène	1655	1645	KI, MS	0,20
57	Epi-α-muurolol	1657	1647	KI, MS	0,79
58	ni	1660	1651	KI, MS	0,48
59	ni	1664	1654	KI, MS	0,56
60	**β-eudesmol**	**1670**	**1660**	**KI, MS**	**2,81**
61	ni	1676	1666	KI, MS	2,34
62	ni	1679	1669	KI, MS	3,29
63	**Epi-zizanone**	**1685**	**1675**	**KI, MS**	**1,80**
64	**Cadalène**	**1689**	**1680**	**KI, MS**	**1,73**
65	**Khusinol**	**1695**	**1685**	**KI, MS**	**3,69**
66	**Zizanal**	**1702**	**1693**	**KI, MS**	**3,38**
67	ni	1710	1700	KI, MS	0,39
68	**8-cedrèn-13-ol**	**1718**	**1708**	**KI, MS**	**1,98**
69	(Z)-5-hydroxy-calamenène	1729	1719	KI, MS	0,17
70	ni	1735	1725	KI, MS	1,02
71	**Vétisélinénol**	**1745**	**1735**	**KI, MS**	**3,27**
72	ni	1757	1747	KI, MS	0,16
73	**Khusimol**	**1771**	**1762**	**KI, MS**	**21,50**
74	ni	1781	1771	KI, MS	0,37
75	ni	1789	1779	KI, MS	0,71
76	ni	1797	1787	KI, MS	0,14
77	ni	1800	1791	KI, MS	0,07
78	ni	1805	1796	KI, MS	0,08
79	**(E)-Isovalencénol**	**1814**	**1804**	**KI, MS**	**6,06**
80	Nootkatone	1819	1809	KI, MS	0,88
81	ni	1827	1817	KI, MS	0,29

Tableau 9 (suite) Composition chimique de l'huile essentielle de *V. zizanioides* (racines) de La Réunion.

82	**β-Vétivone**	**1843**	**1833**	**KI, MS**	**1,93**
83	ni	1855	1846	KI, MS	0,60
84	ni	1860	1850	KI, MS	0,07
85	**α-Vétivone**	**1870**	**1860**	**KI, MS**	**3,37**
86	ni	1878	1868	KI, MS	0,06
87	ni	1884	1874	KI, MS	0,09
88	ni	1943	1934	KI, MS	0,09
89	ni	1966	1956	KI, MS	0,12
90	ni	2101	2092	KI, MS	0,13
	Total identifié %				78,60

[a] Indices de rétention de Kovats calculés grâce aux n-alcanes C_7-C_{30} sur une colonne non polaire Elite-5

[b] Indices de rétention de Kovats sur colonne non polaire DB-5 d'après la littérature (Adams, 2004)

II - Caractérisation biologique

Bien que les huiles essentielles soient des produits naturels, leur utilisation comme répulsif cutané est désormais soumise à la réglementation européenne (Journal officiel de l'Union européenne, 2012) qui les répertorie dans les produits biocides et appelle à mieux caractériser leur toxicité pour l'Homme. Le bénéfice des huiles essentielles comme solution anti-infectieuse impose qu'elles puissent être utilisées à des doses tolérables. Cette partie décrit ainsi le cadre structuré mis en place pour la réévaluation biologique des trois huiles essentielles, dans le contexte d'une application cutanée pouvant être perturbé par une infection avec le virus Ross River.

La tolérance des huiles essentielles a été évaluée sur des cellules représentatives de celles qui sont susceptibles d'être rencontrées successivement lors de leur diffusion à travers la peau : HaCaT (kératinocytes), SK-MEL28 (mélanocytes) et MRC-5 (fibroblastes). Pour disposer d'une méthode fiable et déterminer des doses tolérables, les tests colorimétriques les plus courants (MTT, Cristal violet, bleu de trypan) ont été utilisés. Pour étudier l'activité biologique des huiles et leur mécanisme d'action en contexte infectieux, une lignée de cellules épithéliales (HEK293T) a été retenue pour sa meilleure capacité à reproduire un contexte infectieux significatif par rapport aux lignées précédentes.

II.1 - Cytotoxicité

II.1.1 - Protocole optimisé pour les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont constituées de composés organiques volatils dont l'impact sur des tests miniaturisés de toxicité n'a jamais été évalué. En effet, la volatilité peut conduire à des contaminations entre puits comme cela a été observé par ailleurs (Ciapetti et al., 1998) et par conséquent, à une courbe dose-réponse non régulière qui doit normalement permettre de déterminer des indicateurs de toxicité.

Les protocoles classiques des tests au MTT (Mosmann, 1983) qui mesure une activité mitochondriale ou au cristal violet (CV) qui mesure directement des cellules vivantes (Saotome et al., 1989) ont été appliqués sur la lignée HaCaT qui représente les cellules les plus abondantes dans la couche superficielle de la peau (90 %). Les cellules ont été traitées avec une gamme classique de concentrations (0,1 – 1000 µg/mL). La Figure 18A montre des différences significatives (de 42,5 à 56,3 %) entre les deux techniques à partir de la concentration 35 µg/mL. Lorsque les puits sont simplement recouverts d'un film adhésif, les résultats des deux tests deviennent nettement plus comparables (Figure 18B). Ce protocole adapté a été alors retenu pour le reste de l'étude.

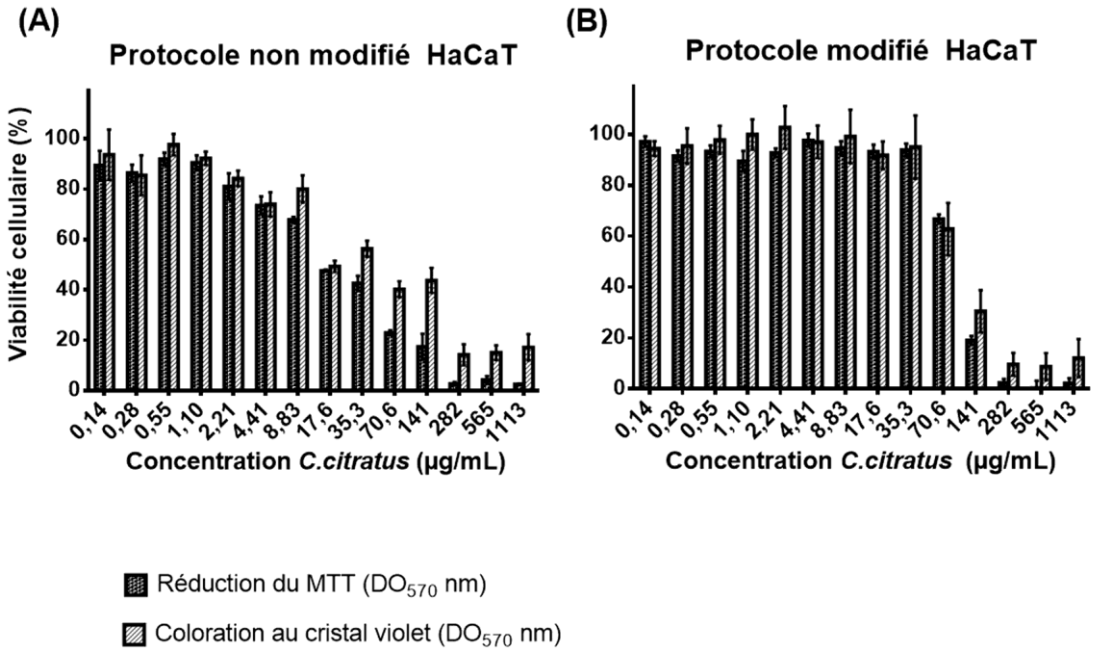


Figure 18 Viabilité cellulaire (HaCaT) lors d'un traitement par l'huile essentielle de citronnelle. Traitement selon la procédure conventionnelle (A) ou en utilisant des plaques recouvertes d'un film adhésif (B). Les valeurs sont exprimées en pourcentage relatif avec l'erreur standard moyenne (n=3).

II.1.2 - Comparaison des tests colorimétriques courants de cytotoxicité

En l'absence de norme particulière pour déterminer la cytotoxicité des huiles essentielles, trois tests colorimétriques couramment utilisés ont été comparés. Le test de réduction au MTT qui mesure l'activité mitochondriale des cellules et le test au cristal violet qui détecte les cellules dont le matériel génétique (ADN) n'est pas affecté sont des méthodes indirectes pour mesurer la viabilité cellulaire. Le comptage direct au microscope en utilisant le bleu de trypan qui colore les cellules mortes s'effectue dans des boîtes de Pétri séparées, ce qui doit normalement diminuer les risques de contaminations.

Avec le protocole adapté décrit précédemment, ces trois tests ont été appliqués sur les lignées HaCaT (kératinocytes), SK-MEL28 (mélanocytes) et MRC-5 (fibroblastes) pour déterminer leur viabilité cellulaire après traitement par différentes concentrations (0,1 – 1 mg/mL) de l'huile essentielle de citronnelle. Les courbes dose-réponse obtenues sont reportées sur la Figure 19.

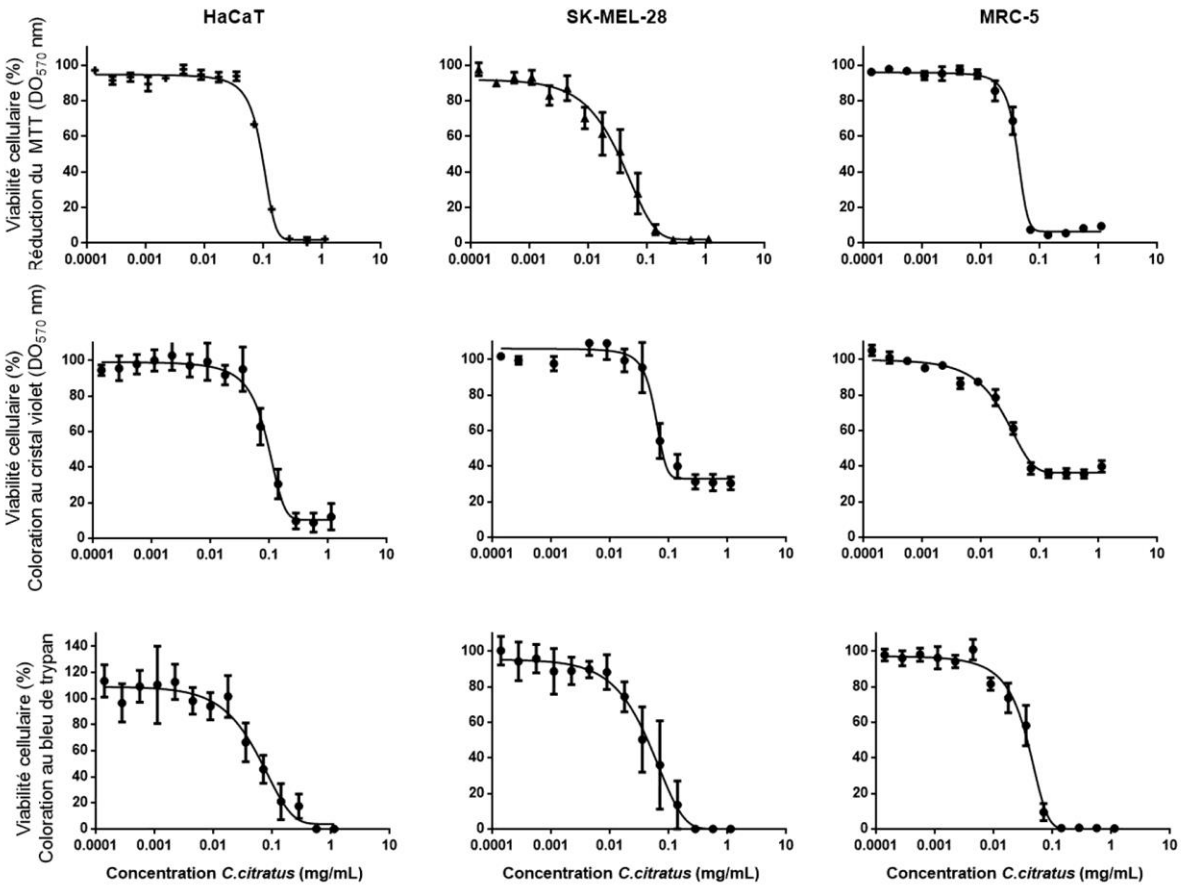


Figure 19 Viabilité cellulaire lors d'un traitement par l'huile essentielle de citronnelle. Mesure par MTT, cristal violet et bleu de trypan sur les lignées cellulaires HaCaT (A), SK-MEL28 (B) et MRC-5 (C). Les valeurs sont exprimées en pourcentage relatif avec l'erreur standard moyenne (n=3).

On constate que les trois tests conduisent à des courbes de type sigmoïde pour les trois lignées cellulaires, ce qui traduit un effet dose-dépendant pour l'huile essentielle test. Les valeurs de CC_{50} correspondant à la concentration nécessaire pour avoir 50 % de mortalité cellulaire ont été déterminées graphiquement (Tableau 10, Figure 19).

Pour une lignée donnée, les trois tests utilisés conduisent à des valeurs de CC_{50} du même ordre de grandeur si on considère les intervalles d'incertitudes. Pour un test donné, l'ordre des valeurs de CC_{50} est identique pour les trois lignées. Sur l'exemple du test au MTT, on constate alors que la valeur plus élevée pour HaCaT (CC_{50} = 92,1 µg/mL) est suivie par celle de SK-MEL-28 (CC_{50} = 47,9 µg/mL), la valeur la plus faible étant observée pour la lignée MRC-5 (CC_{50} = 40,5 µg/mL).

Tableau 10 Valeurs CC_{50} (µg/mL) lors d'un traitement par l'huile essentielle de citronnelle. Les cellules HaCaT, SK-MEL-28 et MRC-5 sont traitées pendant 24h. Les valeurs sont déterminées par les tests MTT, cristal violet et bleu de trypan. Les données sont présentées comme les valeurs de CC_{50} (n=3) ± erreur standard moyenne.

Cellules	**CC_{50} (µg/mL) ± SEM**		
	MTT	Cristal violet	Bleu de trypan
HaCaT	92,1 ± 3,5	86,3 ± 13,6	66,1 ± 9,8
SK-MEL-28	47,9 ± 9,8	38,6 ± 17,1	46,1 ± 7, 7
MRC-5	40,5 ± 4,1	24,1 ± 5,2	36,4 ± 7,0

Le protocole adapté avec le test au MTT a été ensuite appliqué à une fraction oxygénée de l'huile essentielle de citronnelle et les résultats ont été superposés avec ceux obtenus précédemment pour l'huile totale (Figure 20). On constate des allures et des variations sensiblement identiques des courbes dose-réponse. La valeur de CC_{50} déterminée graphiquement la fraction oxygénée (CC_{50} = 131 ± 20,6 µg/ml) ne présente pas de différence significative avec celle qui a été déterminée précédemment pour l'huile totale (CC_{50} = 92,1 ± 3,5 µg/mL).

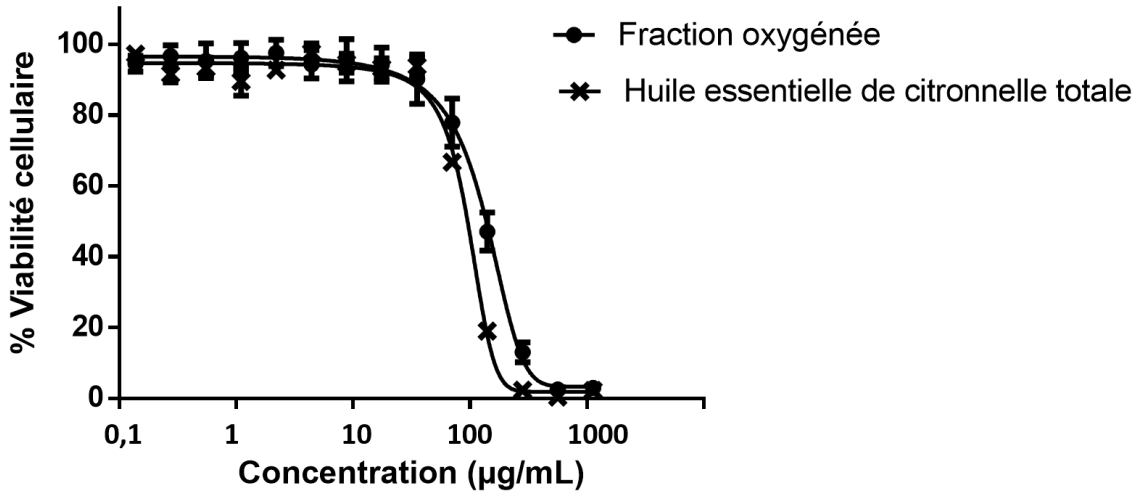


Figure 20 Viabilité cellulaire des cellules HaCaT lors d'un traitement par l'huile essentielle de citronnelle totale ou de sa fraction oxygénée. Les valeurs sont mesurées par MTT après 24 h de traitement.

II.2 - Activité antivirale

L'activité antivirale a été étudiée sur les trois huiles essentielles testées sans traitement particulier et par plusieurs expériences qui devaient permettre d'obtenir un modèle adapté pour déterminer leur mode d'action par rapport au cycle de vie du virus.

II.2.1 - Permissivité des lignées cellulaires au virus Ross River (RRV-T48)

La permissivité du virus Ross River (souche RRV-T48) a été d'abord étudiée sur plusieurs types cellulaires afin de disposer d'un modèle où les cellules sont suffisamment infectées. La lignée HaCaT n'a pas été envisagée, leur faible permissivité aux alphavirus ayant déjà été démontrée par ailleurs (Bernard et al., 2015). Les cellules ont été infectées à différentes valeurs de MOI (0,01 à 10) à 24 h et 48 h post-infection puis observées par immunofluorescence, où le marquage des cellules avec un anticorps dirigé contre la capside de l'alphavirus permet de visualiser les virions produits.

En rapport avec l'objectif de cette étude, la lignée SK-MEL-28 a été prioritairement considérée et les résultats sont reportés sur la Figure 21. A 48 h post-infection, 100 % des cellules sont infectées pour les valeurs de MOI 5 et 10. A 24 h post-infection, seulement 40 % des cellules sont infectées quelle que soit la valeur de MOI. Cependant, on observe au microscope une forte activité cytopathique à 48 h post-infection.

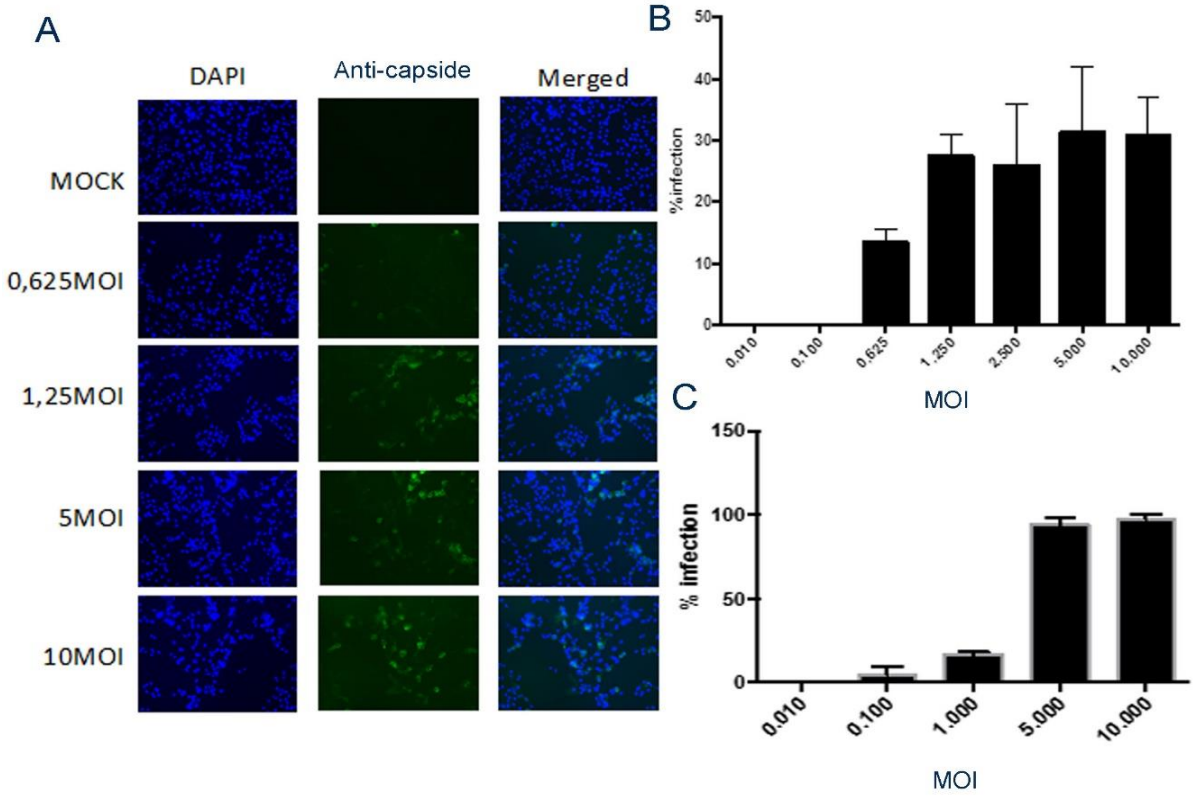


Figure 21 Cellules SK-MEL28 infectées ou non par RRV-T48. L'infection est de 24 h à différentes valeurs de MOI (0,6 ; 1,2 ; 5 ; 10). Les cellules ont été marquées par un anticorps anti capside et les noyaux ont été marqués au DAPI (A). Les pourcentages d'infection à 24 h et 48 h sont exprimés respectivement en (B) et (C). Les résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

Des cellules fibroblastiques (HS633T) ont été ensuite testées sur la même gamme de valeurs de MOI et les résultats sont reportés sur la Figure 22. A 24 h post-infection, on constate que les cellules

sont peu infectées post-infection pour un taux de 30% à la valeur maximale de MOI de 10 alors qu'elles le sont toutes à 48 h post-infection dès une MOI de 1.

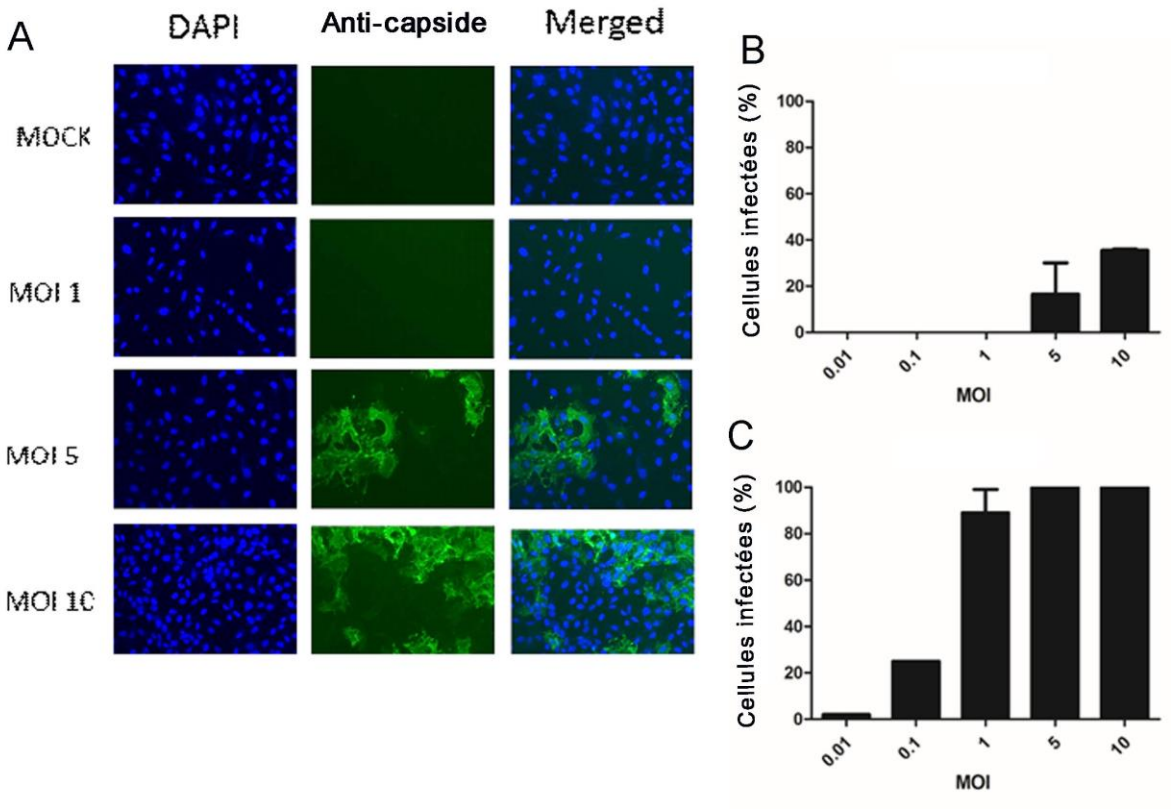


Figure 22 Cellules HS633T infectées ou non par RRV-T48. L'infection est de 24 h à différentes valeurs de MOI (1 ; 5 ; 10). Les cellules ont été marquées par un anticorps anti capside et les noyaux ont été marqués au DAPI. Les pourcentages d'infection à 24 h et 48 h sont exprimés respectivement en (B) et (C). Les résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

Pour les cellules MRC-5 (fibroblastes) déjà utilisées pour la toxicité des huiles essentielles, les résultats sont reportés sur la Figure 23. A 24 h post-infection, les cellules sont infectées à la valeur maximale de 80 % pour une valeur de MOI de 5. A 48 h post-infection, le pourcentage d'infection est proche de 100 %, comme pour les deux autres types cellulaires précédemment étudiés. Cependant, on observe au microscope une forte activité cytopathique du virus Ross River sur les cellules.

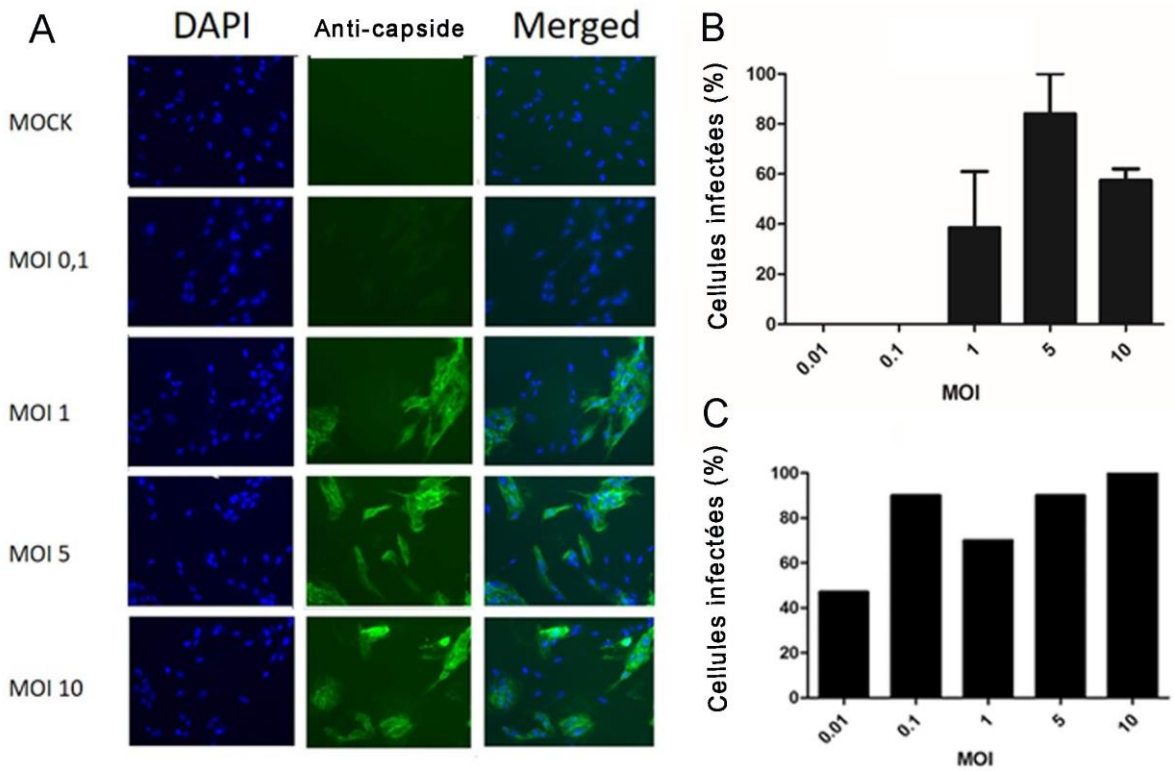


Figure 23 Cellules MRC-5 infectées ou non par RRV-T48. L'infection est de 24 h à différentes valeurs de MOI (1 ; 5 ; 10). Les cellules ont été marquées par un anticorps anti capside et les noyaux ont été marqués au DAPI. Les pourcentages d'infection à 24 h et 48 h sont exprimés respectivement en B et C. Les résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

Les cellules SK-MEL28 et HS633T sont semi-permissives au virus Ross River à 24 h post-infection. De même, il a été montré que seules les cellules fibroblastes MRC-5 sont permissives au virus Ross River à 24 h, mais à des MOIs élevées.

II.2.1 - Mise au point d'un modèle d'étude pour le suivi de la réplication virale

Pour suivre l'inhibition de la réplication virale, deux clones moléculaires construits à partir de la souche RRV-T48 ont été sélectionnées.

Un gène rapporteur exprimant la GFP (VisGreen GFP) a été inséré dans le génome du virus sur l'ARN subgénomique, au niveau des gènes codant pour les protéines structurales et plus précisément au niveau de la séquence codant pour les premiers acides aminés de la protéine E2. La production de virus RRV-GFP est alors suivi avec la synthèse de la protéine GFP, produite en même temps que les protéines structurales (Krejbich-Trotot et al., 2016).

Dans un essai préliminaire, des cellules épithéliales HEK293T ont été infectées par le clone RRV-GFP pour trois valeurs de MOIs (2,5 ; 5 et 10) et la fluorescence a été mesurée au cours du temps (6 à 48 h). Les résultats de la Figure 24A montrent une augmentation de la fluorescence pour atteindre sa valeur

maximale à 36 h post-infection, quelle que soit la valeur de MOI. Au-delà de 36 h, la fluorescence diminue en accord avec l'effet cytopathique observé précédemment sur les autres types de cellules après 48 h d'infection. Pour vérifier la relation directe entre la fluorescence et la production du virus RRV-GFP, des cellules Vero infectées pour une valeur de MOI de 1 ont été ensuite soumises à différentes radiations ultra-violettes. La courbe de la Figure 24B montre que la fluorescence décroit avec l'inactivation du virus. Les solutions inactivées ont été ensuite titrées par plage de lyse et pour le traitement à 0,5 Joules, le titrage conduit à une valeur inférieure à 1 000 PFU/mL.

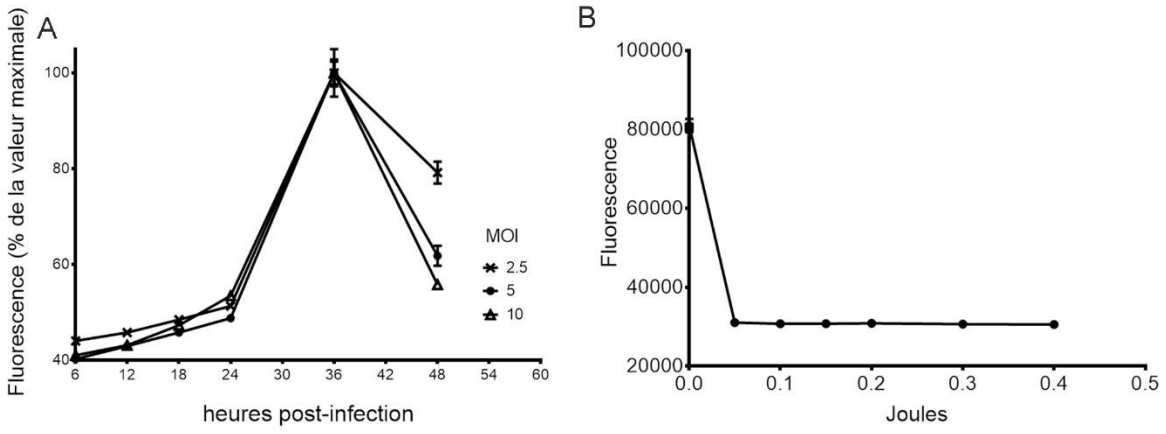


Figure 24 Mesure de la fluorescence de cellules HEK293T infectées par RRV-GFP. Infection à différentes valeurs de MOI au cours du temps (A) et de cellules Vero infectées par RRV-GFP à MOI 1, soumises à un traitement UV. La fluorescence est mesurée 24 h post-infection (B). Les valeurs sont représentatives de deux expériences indépendantes.

La permissivité du clone RRV-GFP a été ensuite étudiée sur des cellules épithéliales HEK293T et des fibroblastes MRC-5 infectées à différentes valeurs de MOIs, par observation de la fluorescence au microscope après 24 ou 48 h. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules GFP positives sur la Figure 25. Pour les cellules MRC-5 et quelle que soit la valeur de MOI, le pourcentage de cellules GFP positives ne dépasse jamais 50 % à 24 ou 48 h post-infection. Ce pourcentage est même plus faible que celui observé pour les cellules infectées par la souche sauvage RRV-T48 (Figure 23). Pour les cellules HEK293T traitées dans les mêmes conditions, on constate une augmentation des cellules GFP positives en fonction de la valeur MOI à 24 ou 48 h post-infection, avec une valeur maximale pour une valeur de MOI de 1 à 48 h post-infection.

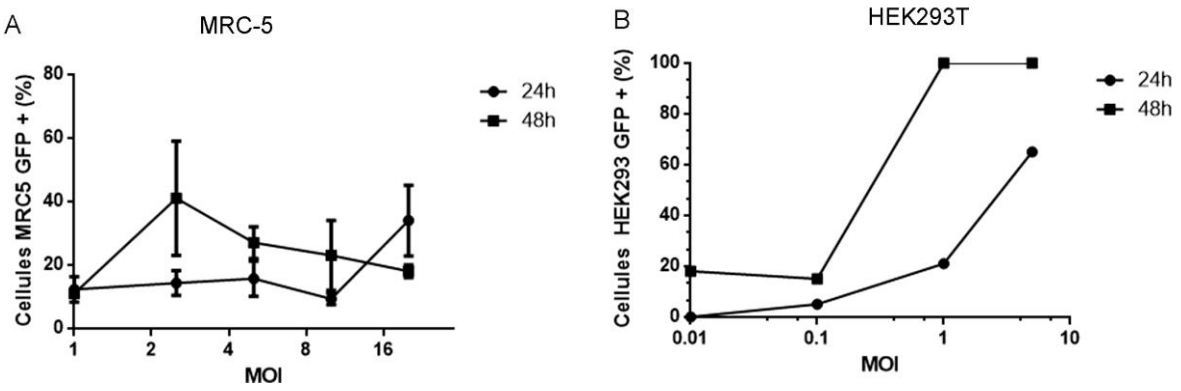


Figure 25 Cellules MRC-5 (A) et HEK293 (B) GFP positives après infection par RRV-GFP à différentes MOI à 24 h et 48 h pi.

Un deuxième clone moléculaire du virus RRV-T48 a été obtenu en introduisant un gène rapporteur codant pour la *Renilla* luciférase au niveau de l'ARN génomique, dans la région des gènes codant pour les protéines non structurales nsP3 et nsP4 (Henrik Gad et al., 2012 ; Krejbich-Trotot et al., 2016).

Les cellules épithéliales A549 et HEK293T ont été ensuite infectées par le clone RRV-*ren*Luc à différentes valeurs de MOIs (1 ; 5 ; 10) pendant 24 h et l'activité luciférase est mesurée au cours du temps par bioluminescence. Les résultats de la Figure 26 montrent une augmentation de la luminescence au cours du temps pour les cellules A549 et HEK293T, mais avec un signal plus faible pour les cellules A549 (maximum 4000 unités arbitraires) que pour les cellules HEK293T (maximum 200 000 unités arbitraires). Pour les valeurs de MOI de 5 et 10, il n'y a pas de différence significative de l'activité luciférase sur les deux lignées cellulaires.

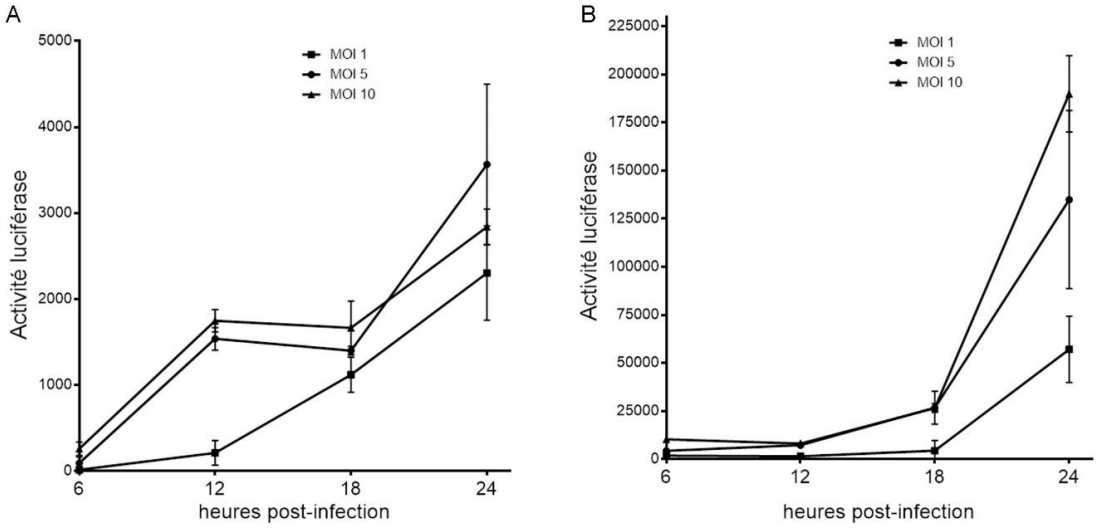


Figure 26 Activité luciférase des cellules épithéliales A549 (A) et HEK293 (B) infectées par RRV-*ren*Luc à différentes MOI au cours du temps. Les valeurs sont représentatives de deux expériences indépendantes (hexaplicats).

L'activité luciférase du clone RRV-*ren*Luc a été ensuite corrélée à la production de virions infectieux.

Pour cela, les cellules HEK293T ont été infectées à la valeur de MOI de 2 pendant 48 h et les virions infectieux ont été ensuite titrés dans le surnageant. Les résultats de la Figure 27A montrent que l'activité luciférase est bien en rapport avec la production de virions infectieux. Pour la valeur maximale de l'activité luciférase à 36 h post-infection, le titre déterminé du virus correspond à une valeur de $1{,}0 \times 10^7$ PFU/mL. La corrélation entre l'activité luciférase et la réplication du virus RRV-*ren*Luc a été établie à 24 h post-infection, comme précédemment par un traitement des cellules infectées avec des radiations ultra-violettes (Figure 27B).

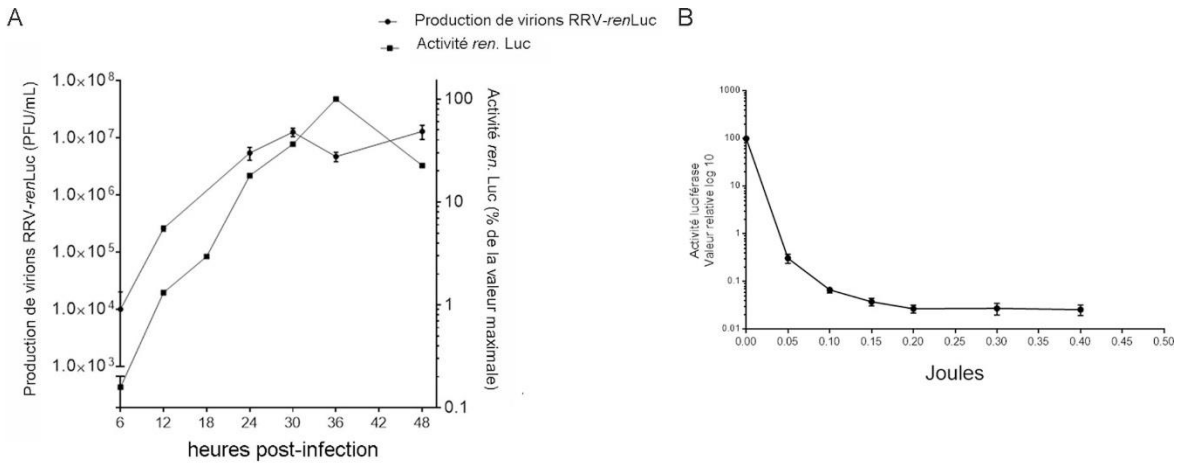


Figure 27 Validation du clone moléculaire RRV-renLuc. Mesure de l'activité luciférase corrélée à la production de virions infections lors de l'infection des cellules HEK293T par RRV-*ren*Luc à MOI 2 au cours du temps (A) et de cellules Vero infectées par RRV-*ren*Luc à MOI 1, soumises à un traitement UV. La luminescence est mesurée 24 h post-infection (B). Les valeurs sont représentatives de deux expériences indépendantes.

Les résultats précédents permettent de retenir les cellules HEK293T pour mesurer l'inhibition de la réplication virale avec le virus RRV-*ren*Luc.

II.2.2 - Effet cytoprotecteur des huiles essentielles

Au préalable, la tolérance des cellules HEK293T vis-à-vis des trois huiles essentielles a été d'abord étudiée. Pour cela, la viabilité cellulaire a été mesurée à différentes concentrations (0,0001 – 1 mg/mL) par le test au MTT. Les résultats sont consignés dans la Figure 28 avec les courbes qui ont permis de déterminer graphiquement les concentrations nécessaires pour avoir une mortalité cellulaire de 50 % et de 10 % (respectivement CC_{50} et CC_{10}) qui sont reportées dans le Tableau 11.

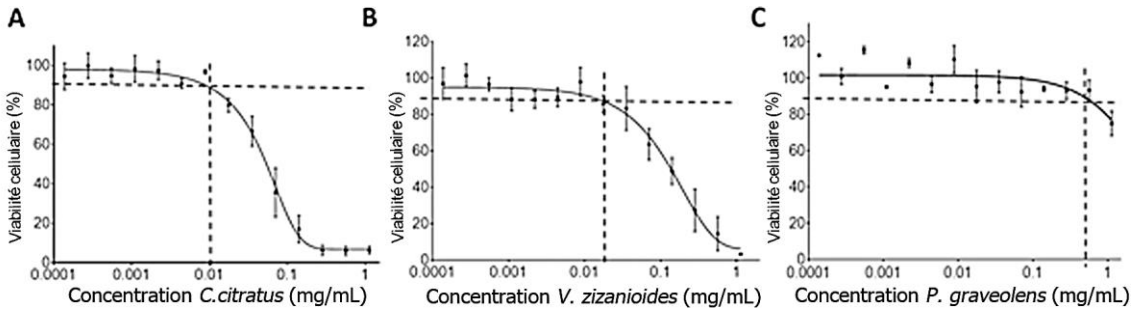


Figure 28 Détermination de la cytotoxicité des huiles essentielles sur les cellules HEK293T. La viabilité des cellules HEK293T a été déterminée par le test au MTT avec un traitement par les huiles essentielles de citronnelle (A), géranium (B) et vétiver (C). Les valeurs sont exprimées comme les pourcentages relatifs avec l'erreur standard moyenne (n=3).

Les concentrations déterminées pour l'huile essentielle de géranium (CC_{50} > 1000 µg/mL et CC_{10} = 533 ± 199 µg/mL) sont largement supérieures à celles observées pour les deux autres huiles essentielles. La valeur CC_{50} = 49,5 µg/mL la plus faible est observée pour l'huile essentielle de citronnelle et cette valeur est proche de celles qui ont été déterminées précédemment avec les cellules MRC-5 et SK-MEL28 (Tableau 10).

Tableau 11 Valeurs de cytotoxicité des huiles essentielles sur les cellules HEK293T

Huile essentielle	**CC_{50} (µg/mL)**	**CC_{10} (µg/mL)**
Cymbopogon citratus (CC)	49.5 ± 20.5	17.6 ± 8.2
Pelargonium graveolens (PG)	> 1000	533 ± 199
Vetiveria zizanioides (VZ)	169.9 ± 72.2	29.4 ± 13.5

La concentration CC_{10}, pour laquelle la viabilité cellulaire est supérieure à 90 %, a été retenue pour tester chaque huile essentielle sur des cellules HEK293T infectées par la souche RRV-T48 (MOI de 2). La viabilité cellulaire des cellules infectées avec ou sans traitement par l'huile essentielle a été déterminée par le test au MTT.

La viabilité des cellules infectées et sans traitement par l'huile essentielle a d'abord été suivie au cours du temps (0 à 48 h). Les résultats de la Figure 29A montre un effet cytopathique marqué au-delà de 30 h post-infection alors que la viabilité cellulaire est encore à 80 % à 24 h post-infection. La viabilité des cellules infectées et traitées simultanément par l'huile essentielle a été déterminée à 24, 32 et 48 h post-infection.

Comme le montrent les résultats de la Figure 29B, on observe des effets variables en fonction du temps et de l'huile essentielle utilisée. A 24 h post-infection, seul le traitement des cellules infectées par l'huile essentielle de géranium conduit à une viabilité cellulaire (95 %) significativement supérieure

à celle des cellules infectées et non traitées (80 %) avec $p < 0,05$. A 32 h post-infection, l'écart pour l'huile essentielle de géranium est encore plus important avec une viabilité des cellules infectées et traitées à 70 % par rapport aux cellules de contrôle limitées à 40 % ($p < 0,001$). La différence devient tout juste significative pour les cellules infectées et traitées par l'huile essentielle de citronnelle avec une viabilité cellulaire de 50 % ($p < 0,05$). A 48 h post-infection, il n'y a pas de différence significative pour les trois huiles.

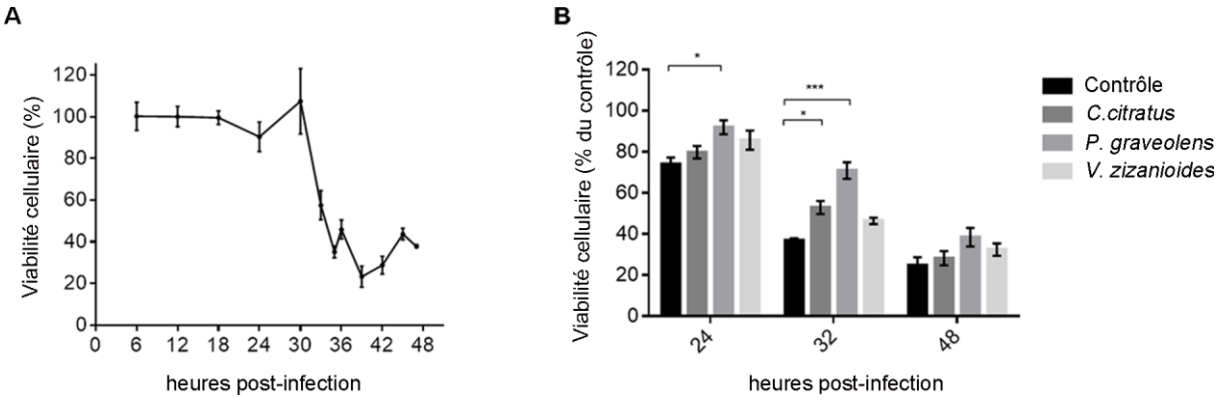


Figure 29 Viabilité des cellules HEK293T infectées par RRV-T48 (MOI de 2). Infection sans traitement par l'huile essentielle (A) ; avec traitement par les huiles essentielles de citronnelle, géranium et vétiver à une concentration CC_{10} à 24, 32 et 48 h post-infection (B). Les contrôles consistent en les cellules non traitées par les huiles essentielles. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la moyenne avec l'erreur standard moyenne (n=3). Les valeurs statistiques sont obtenues à partir du test ANOVA (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

II.2.3 - Effet des huiles essentielles sur l'entrée du virus

Afin de vérifier l'effet des trois huiles essentielles étudiées sur l'entrée du virus, deux expériences ont été réalisées. L'infectivité résiduelle d'une solution de virus RRV-T48 en contact avec les huiles essentielles aux concentrations CC_{10} et $0,1 \times CC_{10}$ a d'abord été titrée sur des virus (Figure 30A). Une autre expérience consistait au traitement préalable des cellules par les huiles essentielles avant de titrer le virus RRV-T48 sur ces cellules (Figure 30B). Quelles que soient les conditions utilisées pour chacune des huiles essentielles testées, l'infectivité résiduelle n'est pas affectée de manière significative. Les deux types d'expériences ne conduisent pas à une différence significative des infectivités résiduelles en contrôle qui sont de l'ordre de 1×10^6 et 1×10^7.

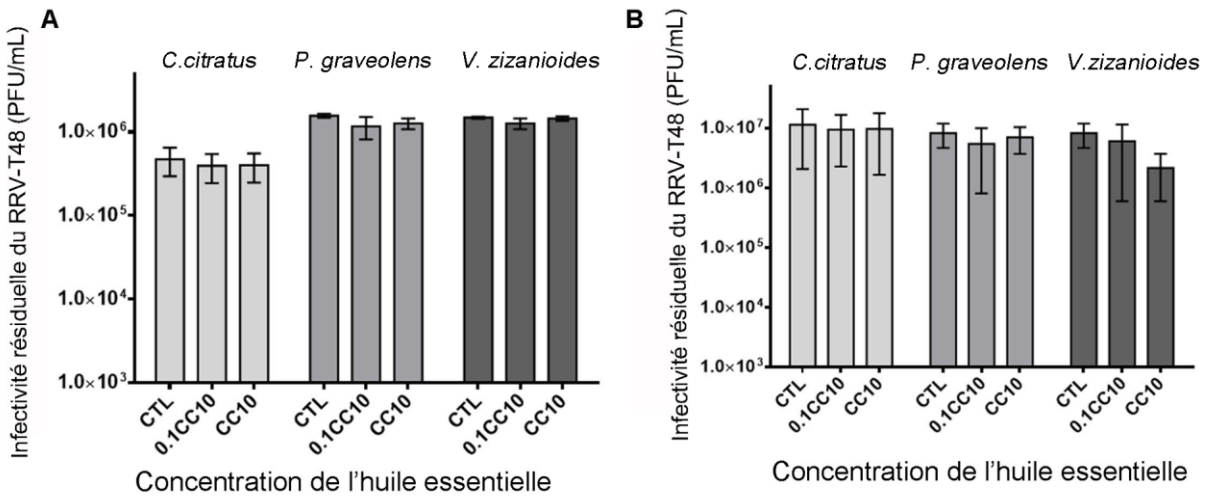


Figure 30 Infectivité résiduelle de RRV-T48. Détermination par titrage par plage de lyse sur des cellules Vero infectées par une solution de virus (1 x 10^5 PFU) préalablement incubée avec les huiles essentielles (A) et sur des cellules Vero prétraitées par les huiles essentielles (B). Les contrôles sont les cellules infectées par RRV-T48 sans traitement par l'huile essentielle. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de la moyenne avec l'erreur standard de la moyenne (n=3).

Pour confirmer les résultats précédents, l'ARN de la souche RRV-T48 incubé avec l'huile essentielle à deux concentrations (CC_{10} et 0,1 × CC_{10}) a été extrait et amplifié par PCR à partir d'amorces de gènes spécifiques des protéines nsP1 d'alphavirus. La révélation sur gel d'agarose (Figure 31) n'établit aucune dégradation de l'ARN du virus par l'effet d'une huile essentielle.

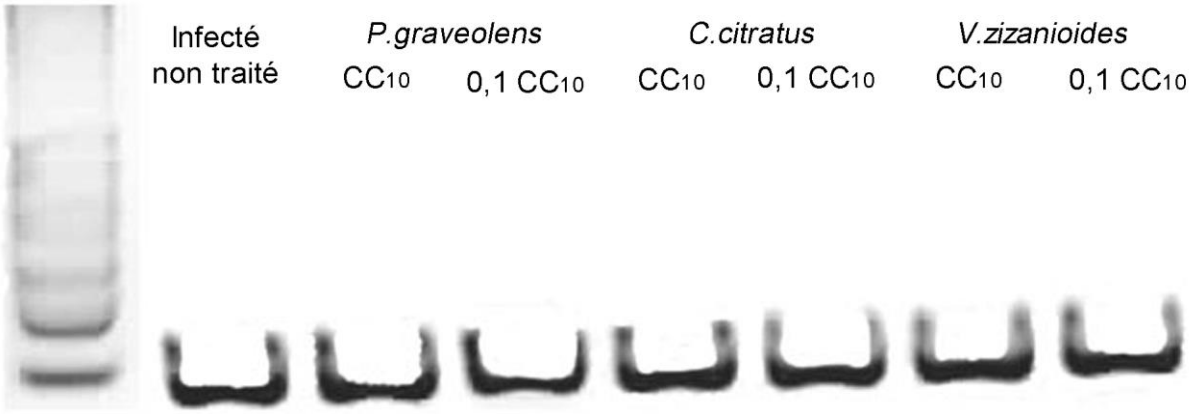


Figure 31 Produits de RT PCR déposés sur gel d'agarose. ARN extrait à partir de RRV-WT incubé pendant 1 h avec les huiles essentielles de citronnelle, géranium et vétiver aux concentrations CC_{10} et 0,1 x CC_{10}. Amplification à partir d'amorces des gènes spécifiques d'alphavirus nsP1.

II.2.4 - Effet des huiles essentielles sur la réplication virale

Le clone moléculaire RRV-*ren*Luc a été ensuite utilisé pour contrôler l'inhibition de la réplication virale dans les cellules HEK293T. Trois approches qui diffèrent par les séquences de contact entre les cellules, le clone RRV-*ren*Luc et l'huile essentielle ont été étudiées (Figure 32). En prétraitement, les cellules sont préalablement mises en contact avec l'huile essentielle avant l'incubation du virus. Le

co-traitement se rapporte à l'exposition simultanée des cellules à l'huile essentielle et au virus. Le post-traitement consiste à introduire l'huile essentielle après l'adsorption virale.

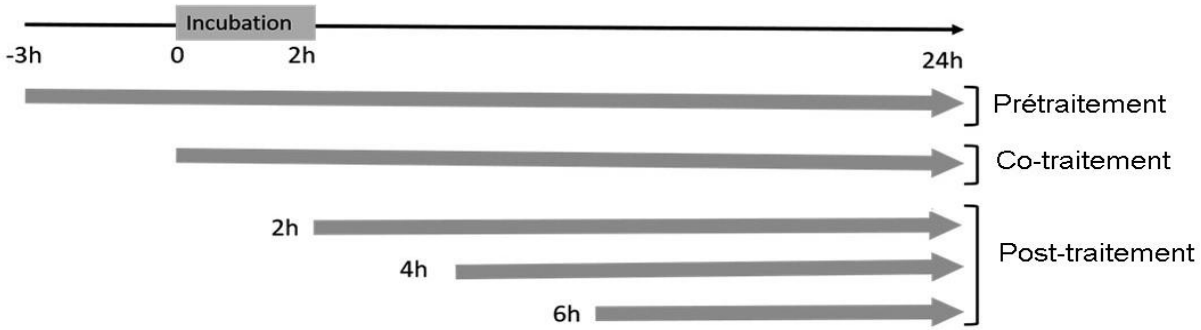


Figure 32 Chronologie des différents traitements par l'huile essentielle sur les cellules HEK293T infectées par RRV-*ren*Luc.

Comme décrit précédemment, l'effet cytoprotecteur a été observé lors d'un co-traitement des cellules HEK293T par la souche RRV-T48 et l'huile essentielle. Ce traitement a été reproduit pour vérifier le système formé avec le clone moléculaire RRV-*ren*Luc, avec un contrôle positif basé sur l'activité inhibitrice de la chloroquine contre les alphavirus (Khan et al., 2010 ; Chopra et al., 2014). Le suivi de l'activité luciférase est rapportée d'une part à la viabilité cellulaire des cellules co-traitées avec la souche RRV-T48 et la chloroquine (20 µg/mL) ou une huile essentielle à la concentration CC_{10} et d'autre part, au titrage des virions infectieux résiduels. Les résultats de chaque type d'expérience après 24 h post-infection sont consignés sur la Figure 33.

Pour l'huile essentielle de citronnelle, on observe que son effet cytoprotecteur significatif contre la souche RRV-T48 avec une viabilité cellulaire de 80 % ($p < 0,01$) se traduit sur le système composé avec le clone RRV-*ren*Luc, par une réduction modérée de l'activité luciférase (55 %, $p < 0,001$) et l'infectivité résiduelle (53 %, $p < 0,05$) par rapport à la chloroquine. Pour l'huile essentielle de géranium, la viabilité cellulaire bien maintenue (92 %, $p < 0,001$) contre la souche RRV-T48 s'accompagne dans le cas du clone RRV-*ren*Luc d'une réduction significative de l'activité luciférase (34 %, $p < 0,01$) et de l'infectivité résiduelle (13 %) par rapport à la chloroquine. Pour l'huile essentielle de vétiver, la viabilité tout juste significative par rapport au contrôle (86 %, $p < 0,05$) avec la souche RRV-T48 ne se traduit pas par un effet notable contre le clone RRV-*ren*Luc.

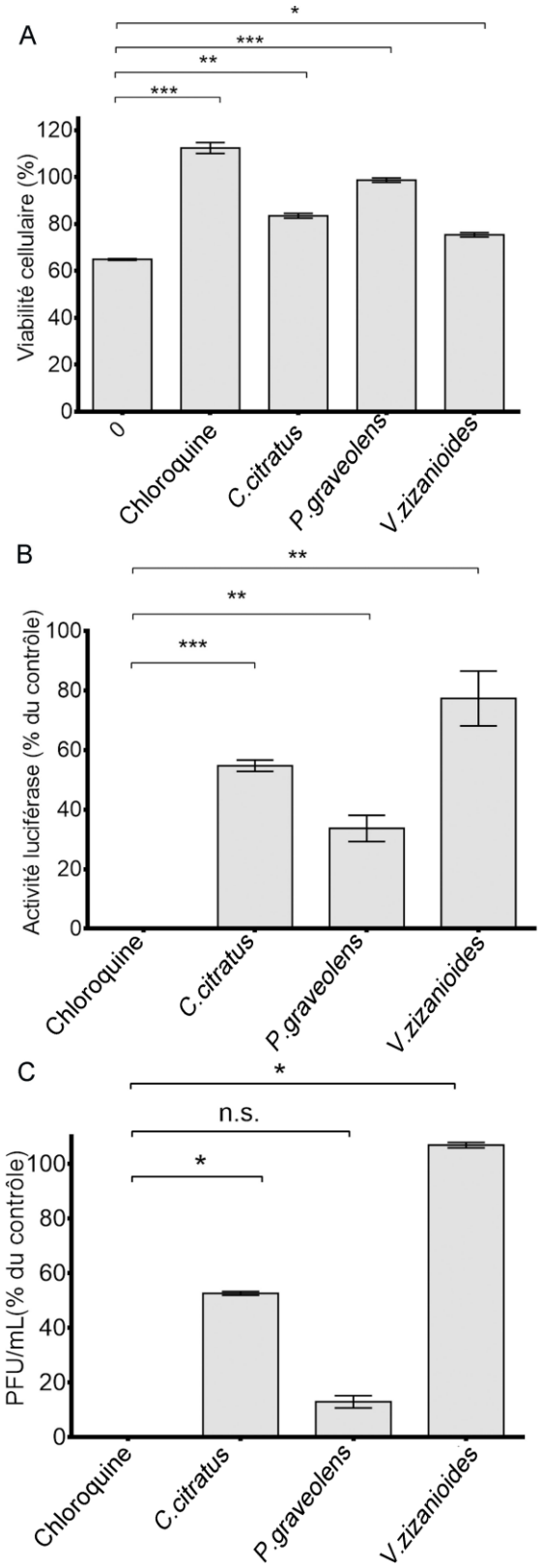


Figure 33 Activité antivirale de la chloroquine et des huiles essentielles de citronnelle, géranium et vétiver sur le virus Ross River. Viabilité des cellules HEK293T infectées par RRV-T48 (MOI de 2) et traitées par la chloroquine a une concentration de 20 µg/mL et des huiles essentielles de citronnelle, géranium et vétiver à la concentration CC_{10} à 24 h post-infection (A). Inhibition de la réplication de RRV-*ren*Luc (MOI de 2) lors d'un co-traitement par la chloroquine à une concentration 20 µg/mL ou par les huiles essentielles de citronnelle, géranium et vétiver à la concentration CC_{10} (B). Titrage de la production virale par titrage par plages de lyse sur des cellules Vero (C). Les contrôles sont les cellules infectées par RRV mais sans traitement par

la chloroquine ou les huiles essentielles. Les valeurs sont exprimées en pourcentage relatifs avec l'erreur standard moyenne (n=3). Les valeurs statistiques sont obtenues à partir du test ANOVA (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Pour les deux autres scénarios (prétraitement et post-traitement), les expériences ont été réduites au clone moléculaire RRV-*ren*Luc et les résultats combinés à ceux du co-traitement sont consignés dans la Figure 34.

Pour l'huile essentielle de citronnelle, le co-traitement conduit aux valeurs minimales de l'activité luciférase (55 %, $p < 0,01$) et du titre du virus (53 %, $p < 0,001$). Pour l'huile essentielle de géranium, le co-traitement conduit à des valeurs encore plus remarquables de 34 % ($p < 0,001$) pour l'activité luciférase et de 13 % ($p < 0,01$) pour l'infectivité résiduelle et cette dernière est également réduite de manière encore plus importante (inférieure à 20 %) en post-traitement à 4 h. Pour l'huile essentielle de vétiver, aucune variation significative des deux indicateurs n'a été observée.

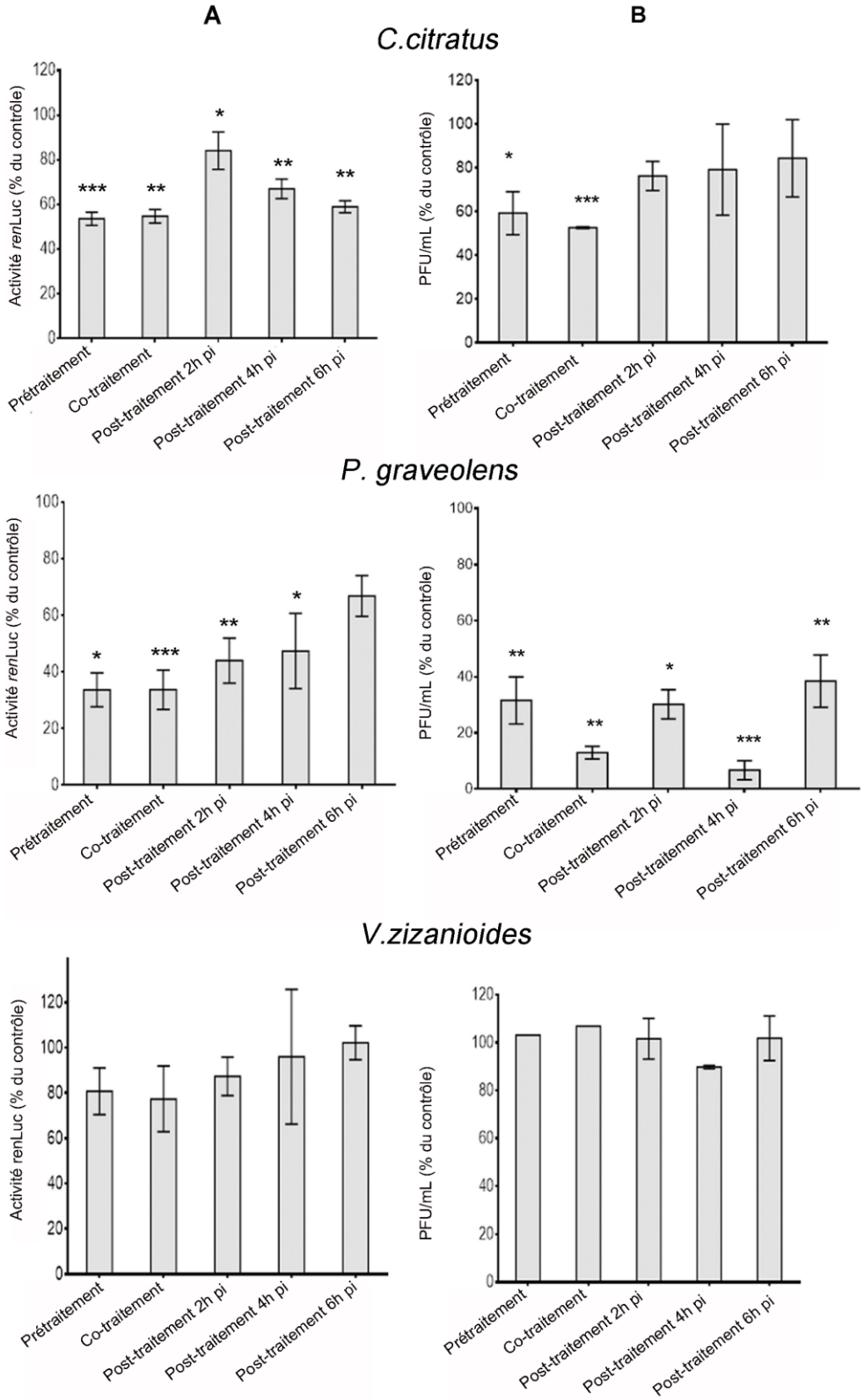


Figure 34 Inhibition de la réplication de RRV-renLuc (MOI de 2) selon différents traitements par l'huile essentielle. Mesure par l'activité luciférase (A) ou l'infectivité résiduelle sur des cellules Vero (B). Les contrôles sont les cellules infectées par RRV-*ren*Luc sans traitement par les huiles essentielles. Les valeurs sont exprimées en pourcentage relatifs avec l'erreur standard moyenne (n=3). Les valeurs statistiques sont obtenues à partir du test ANOVA (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Les capacités de la fraction oxygénée de l'huile essentielle de géranium ont été ensuite évaluées sur les cellules HEK293T infectées avec le clone RRV-*ren*Luc, par les différents scénarios dont les résultats sont consignés sur la Figure 35. En comparaison avec les résultats de l'huile totale (Figure 34B), on constate des différences peu significatives avec la fraction enrichie en composés oxygénés. Pour cette dernière, son application en co-traitement conduit à la valeur minimale de l'activité luciférase (26 % ; $p < 0{,}01$) et une production de virions inférieure à 20 % ($p < 0{,}001$).

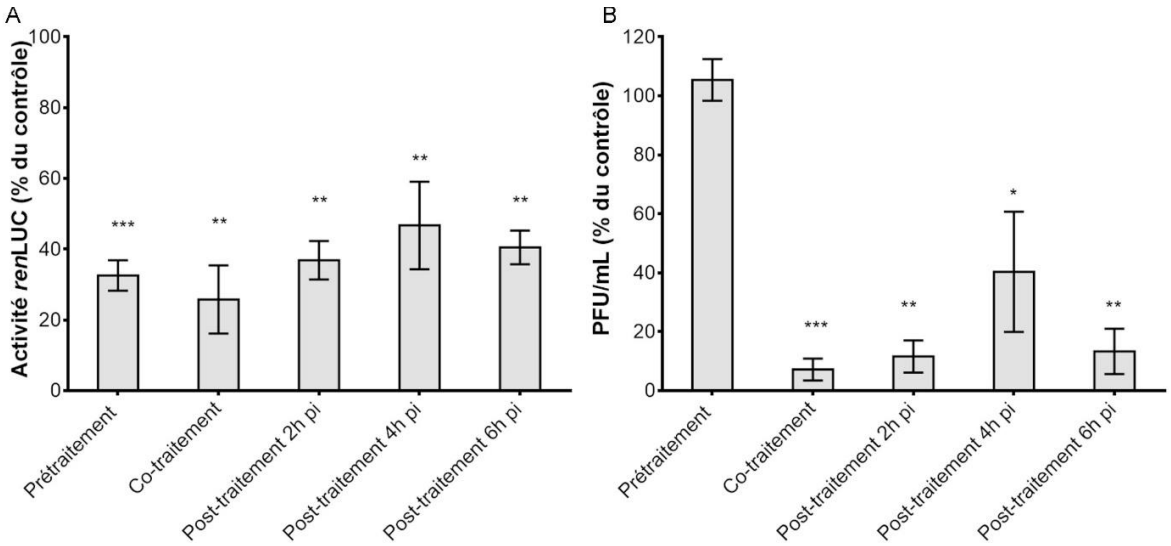


Figure 35 Inhibition de la réplication de RRV-renLuc (MOI de 2) par la fraction oxygénée de l'huile essentielle de géranium. Mesure de l'activité luciférase (A) ou l'infectivité résiduelle sur des cellules Vero (B). Les contrôles sont les cellules infectées par RRV-*ren*Luc sans traitement par la fraction oxygénée. Les valeurs sont exprimées en pourcentage relatifs avec l'erreur standard moyenne (n=3).

II.3 - Activité immuno-modulatoire

II.3.1 - Quantification des cytokines pro-inflammatoires et expression de leurs gènes

La réponse inflammatoire des cellules HEK293T a été étudiée après un co-traitement avec chaque huile essentielle et le clone RRV-*ren*Luc.

La production des principales cytokines pro-inflammatoires a été quantifiée par qPCR à 24 h post-infection. Les résultats de l'expression des gènes sont consignés dans la Figure 36. Le gène correspondant à l'interleukine-6 (IL-6) est exprimé de manière significative en présence du virus Ross River et cette expression est réduite par le traitement de chaque huile (3000 fois).

L'expression relative des gènes codant pour les cytokines IL-8, MCP-1 et ISG15 est faible lorsque les cellules sont infectées par le virus. Dans une moindre mesure, les huiles essentielles de géranium, citronnelle et vétiver diminuent l'expression des gènes ISG54 et ISG56.

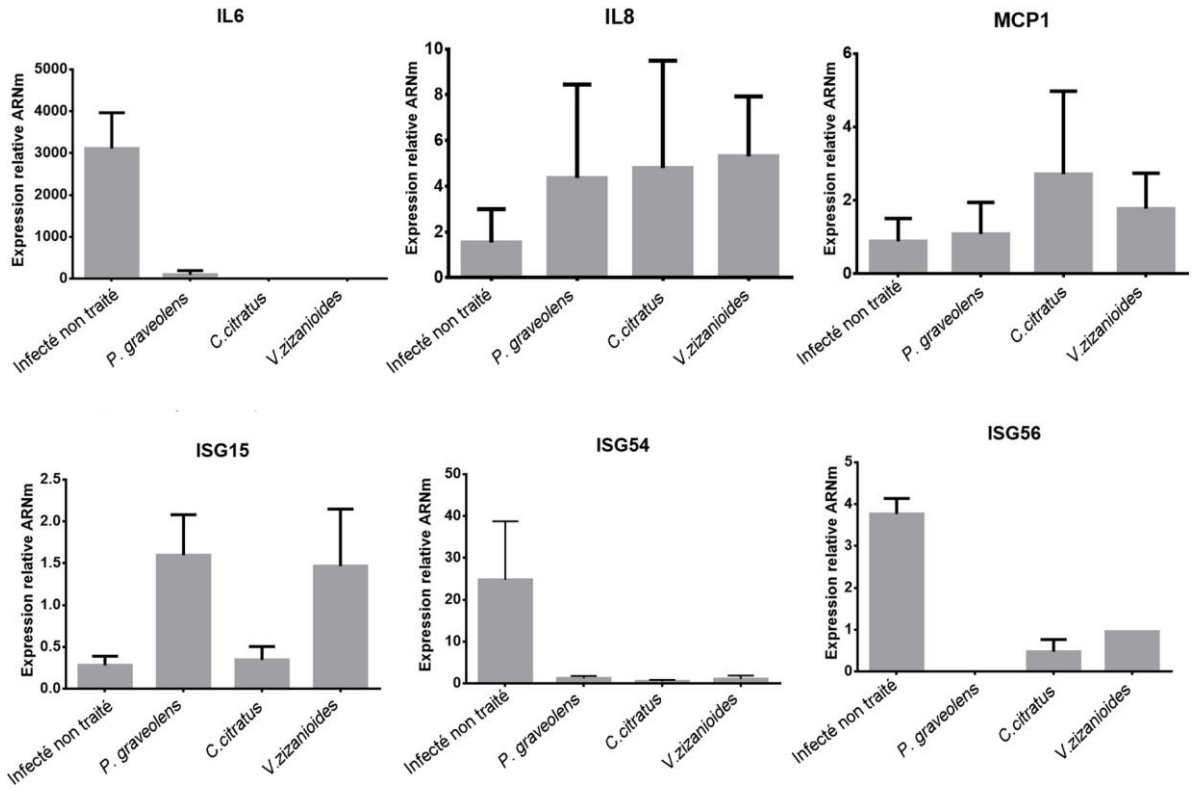


Figure 36 Expression relative des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires. Infection 24 h par RRV-*ren*Luc sur les cellules HEK293T. L'expression des cytokines IL-6, IL-8, MCP-1, ISG15, ISG54 et ISG56 a été quantifiée par qPCR. Les résultats sont normalisés par rapport aux cellules non-infectées et à la GAPDH en utilisant la méthode ΔΔCt.

La présence de la cytokine IL-6 soluble a été ensuite déterminée puis quantifiée par ELISA à 8 et 24 h post-infection à partir du surnageant des cellules HEK293T infectées avec le clone RRV-*ren*Luc. La cytokine TNF-α a été utilisée comme contrôle positif. Les résultats sont reportés en Figure 37.

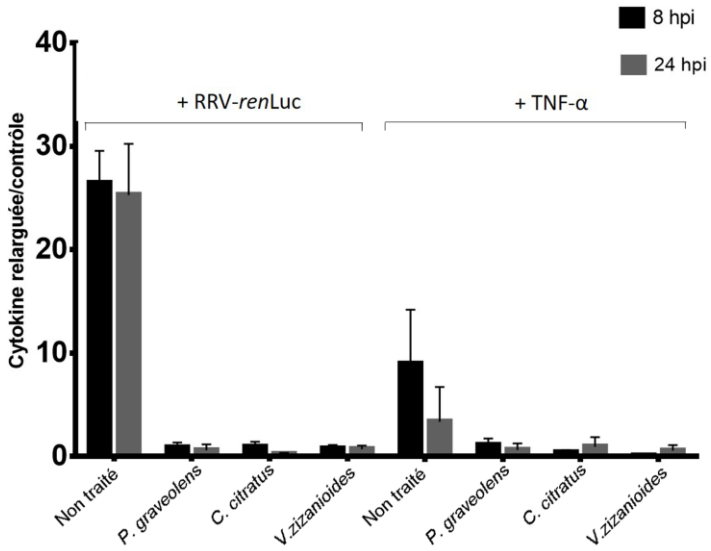


Figure 37 Production d'IL-6 dans les cellules HEK293T lors de l'infection par RRV-*ren*Luc à 8 et 24 h post-infection. La sécrétion des cytokines IL-6 a été mesurée grâce au kit ELISA. Comme contrôle positif, les cellules ont été incubées avec 10 ng/mL de TNF-α. Les résultats sont présentés comme la moyenne et l'erreur standard à la moyenne de trois expériences indépendantes réalisées en triplicata.

La cytokine IL-6 a été détectée à une concentration de 25 pg/mL lorsque les cellules HEK293T sont infectées par RRV-*ren*Luc dès 8 h post-infection. On constate que les cellules infectées et traitées par les huiles essentielles relarguent une faible quantité de cette cytokine (inférieure à 5 pg/mL) à 8 ou 24 h post-infection. La sécrétion d'IL-6 est induite plus faiblement par TNF-α que par le virus Ross River. Cependant, la sécrétion d'IL-6 est diminuée par les trois huiles essentielles, qu'elle soit induite par TNF-α ou le virus Ross River.

II.3.2 - Investigation des voies de l'inflammation impliquées lors d'une infection au RRV

Afin de déterminer les voies impliquées dans le processus inflammatoire, les cellules HEK Blue™ NF-κB ont été utilisées pour évaluer la sécrétion de NF-κB. Ces cellules possèdent un gène rapporteur de la phosphatase alcaline secrétée (SEAP), sous le contrôle du promoteur minimal d'IFN-β, fusionné à cinq sites de liaisons des facteurs de transcription NF-κB et AP-1 (Protéine activatrice 1). Les cellules HEK Blue™ NF-κB sont traitées par les huiles essentielles et infectées par RRV-*ren*Luc ou traitées par le facteur de nécrose TNF-α (Figure 38).

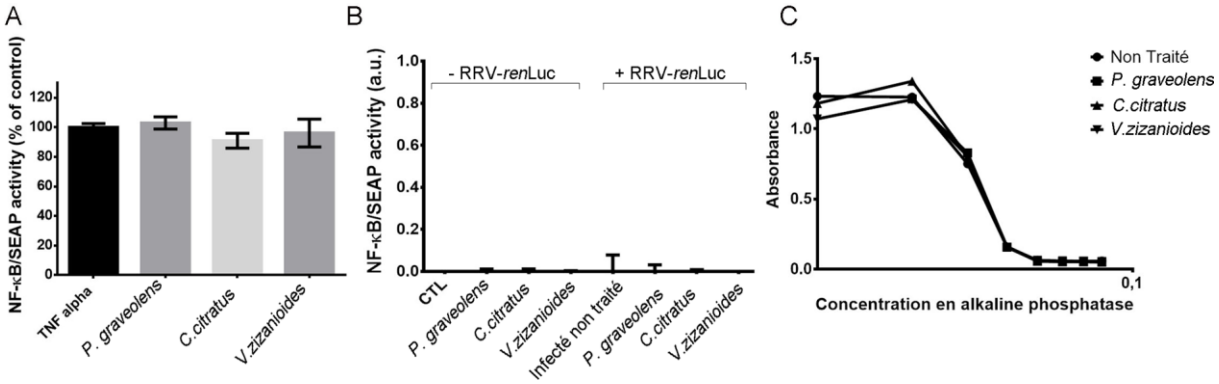


Figure 38 Voie de signalisation NF-κB lors de l'infection des cellules HEK Blue™ NF-κB par RRV-*ren*Luc. Quantification de la sécrétion de SEAP induite par NF-κB en réponse à TNF-α (A) et à l'infection par RRV-*ren*Luc (B). Les cellules HEK Blue™ NF-κB sont co-traitées par TNF-α ou RRV- *ren*Luc et les huiles essentielles géranium, citronnelle et vétiver. Quantification de la phosphatase alcaline incubée avec les huiles essentielles citronnelle, géranium et vétiver (C). L'activité extracellulaire de la phosphatase alcaline (SEAP) est mesurée en utilisant le réactif Quanti-blue.

On constate qu'il n'y a pas d'effet des huiles essentielles de géranium, citronnelle et vétiver sur la sécrétion de NF-κB induite par TNF-α (Figure 38A). De plus, il n'y a pas de sécrétion de NF-κB lors d'une infection par le virus RRV-*ren*Luc (Figure 38B). Une approche similaire (non présentée) a été menée sur des cellules HEK Blue ™ IFN-α/β, possédant le gène rapporteur de la SEAP sous le contrôle du promoteur de l'ISG54, gène inductible par les interférons de type 1. Les résultats obtenus montrent aussi une absence de sécrétion d'interféron. Par ailleurs, les huiles essentielles n'interagissent pas avec la phosphatase alcaline, ce qui permet d'utiliser le système des cellules HEK Blue ™ (Figure 38C).

PARTIE 3 : Discussion

Dans la prévention des arboviroses chez l'Homme, les répulsifs cutanés conservent leur intérêt dans la stratégie de protection individuelle qui consiste à réduire le risque de transmission d'un agent pathogène par les vecteurs compétents. Les nouvelles exigences sanitaires et environnementales ont conduit à un regain d'intérêt pour les produits naturels. Toutefois, ces derniers ne sont pas exempts de toxicité chez l'Homme et de nouvelles formulations ont été développées pour réduire leur diffusion percutanée et limiter ainsi les effets indésirables locaux et systémiques. Parmi les produits naturels les plus utilisés comme répulsifs cutanés ou non, les huiles essentielles occupent une place culturellement importante par leurs multiples vertus et leurs propriétés organoleptiques. La disponibilité et l'exploitation directe du matériel végétal dans les zones à haut risque épidémique constituent des avantages indéniables. Jusqu'ici, le traitement de la peau avec ces huiles essentielles n'a pas été envisagé ou reconnu comme moyen de limiter une infection encore localisée lorsque la transmission de l'agent pathogène n'a pu être évitée.

Les huiles essentielles de citronnelle, de géranium et de vétiver recouvrent une importance économique à La Réunion. Elles génèrent une activité pour des coopératives agricoles mais qui reste encore limitée à la production de matières premières pour la parfumerie ou la cosmétique, à leur utilisation comme additifs agro-alimentaires ou encore pour des indications particulières depuis les origines de la médecine traditionnelle jusqu'à la phytothérapie moderne. Dans cette étude, les propriétés anti-infectieuses de ces trois huiles essentielles répulsives ont été évaluées *in vitro* contre l'infection par un alphavirus. Le virus Ross River a été choisi comme modèle d'étude pour son épidémiologie particulière dans la zone Ouest de l'océan Indien, sa transmission facilitée par les multiples combinaisons d'hôtes et de vecteurs, l'absence de solutions vaccinales ou antivirales et par sa manipulation expérimentale faiblement contrainte en laboratoire.

I - Rendement des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont généralement obtenues avec de faibles rendements (< 1 %) calculés par rapport à la masse sèche du matériel végétal. Le rendement dépend de plusieurs facteurs, comme la méthode de récolte, la fréquence de la moisson, la taille des plantes à la récolte, la saison et les conditions climatiques lors de la récolte, mais aussi les paramètres lors de la distillation (temps, pression, température) (Singh et al., 1999 ; Flamini et al., 2013).

Les huiles essentielles produites dans cette étude ont été obtenues par hydrodistillation avec des rendements de 0,2 ou 0,3 %. Avec la même technique, des rendements plus élevés, de l'ordre de 0,7 %, ont été reportés pour l'huile essentielle de citronnelle du Bénin ou d'Afrique du Sud alors que l'extraction assistée par micro-ondes n'apporte pas d'amélioration significative (Kpoviessi et al., 2014 ; Ajayi et al., 2016). Pour l'huile essentielle de géranium, le rendement est comparable à celle originaire d'Algérie obtenue à 0,15 % (Boukhatem et al., 2013b) et dans la gamme observée (0,1 à 0,7 %) pour la plante cultivée en Europe de l'Est (Ćavar and Maksimović, 2012). Pour le vétiver dont le rendement peut s'élever jusqu'à 9,61 % (Adams et al., 2003), celui obtenu dans cette étude est comparable aux données reportées pour les cultures du nord de l'Inde (0,28 %) mais plus faible que celles relatives au sud de l'Inde (2,37 %) (Chahal et al., 2015). L'extraction de l'huile essentielle de vétiver au fluide supercritique (dioxyde de carbone) permet d'obtenir un rendement plus important (3,2 %) mais cette technique modifie sensiblement la composition de l'huile essentielle (Martinez et al., 2004).

Les techniques modernes d'extraction (fluide supercritique, micro-ondes) se distinguent surtout par des économies de temps et d'énergie et par l'obtention d'un extrait volatil différent de l'huile essentielle (Martinez et al., 2004). L'hydrodistillation, qui reste la technique la plus courante, conserve un intérêt pour une production locale et une qualité sensiblement reproductible.

II - Profil chimique des huiles essentielles

La composition chimique d'une huile essentielle peut varier, comme pour le rendement, avec les caractéristiques propres du matériel végétal et la technique d'extraction. Dans un contrôle qualité, l'analyse chimique d'une huile essentielle consiste généralement à caractériser un chémotype qui retrace un profil particulier. Les analyses de routine s'appuient sur les techniques chromatographiques en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) dont la résolution et la fiabilité restent limitées. Dans le cadre de cette étude, la caractérisation des trois huiles essentielles s'est appuyée sur une analyse quantitative par GC-FID et une identification plus importante des constituants du mélange complexe avec la technologie GC×GC-TOFMS utilisée en mode monodimensionnel.

Ainsi, la composition chimique de l'huile essentielle de citronnelle a été établie avec l'identification de 37 composés (99,4 % de la composition totale) alors que les dernières données les plus récentes de la littérature avec une analyse classique font état de 19 (95,2 % de la composition totale), 23 (95,1 % de la composition totale) ou 29 (98,1 % de la composition totale) composés (Bossou et al., 2013 ; Machado et al., 2012 ; Kpoviessi et al., 2014) (Tableau 12). Pour l'huile essentielle de géranium, 67 composés (98,74 % de la composition totale) ont été identifiés contre 45 (94,2 % de la composition totale) ou 59 (92,3 % de la composition totale) composés avec l'analyse classique par GC-MS (Boukhatem et al., 2013b ; Ćavar and Maksimović, 2012) (Tableau 13). Pour l'huile essentielle de vétiver, 53 constituants (78,60 % de la composition totale) ont été identifiés contre 25 composés en GC-MS pour une huile essentielle de Taïwan (Chou et al., 2012) ou 29 composés en GC-FID pour une huile essentielle extraite des cultures en Inde (Chahal et al., 2015). Des données cumulées de spectroscopie de RMN établissent un mélange de 155 constituants avec une forte proportion de sesquiterpènes (Weyerstahl et al., 2000) (Tableau 14).

Le chémotype d'une huile essentielle est généralement associé à des composés majoritaires et détermine son activité biologique (Kushwaha et al., 2012). La résolution plus importante de la technologie TOF MS a permis ainsi d'établir les caractéristiques propres des trois huiles essentielles étudiées. Les composés majoritaires identifiés dans les huiles essentielles de cette étude sont reportés sur la Figure 39.

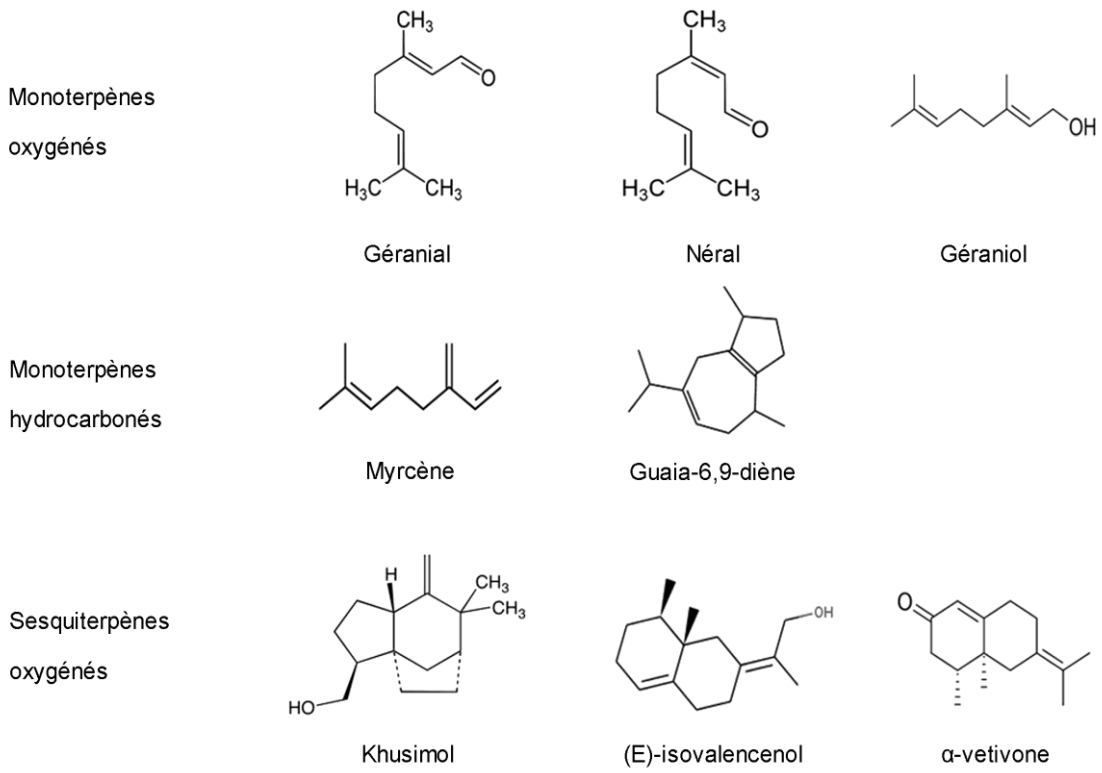


Figure 39. Composés monoterpènes et sesquiterpènes majoritaires dans les huiles essentielles de citronnelle, géranium et vétiver.

Pour l'huile essentielle de citronnelle, la composition riche en monoterpènes oxygénés (90,16 % avec le géranial, le néral et le géraniol) associé à un monoterpène hydrocarboné (8,49 % de myrcène) est conforme aux données de la littérature pour les mélanges originaires d'Afrique ou d'Amérique du Sud (Machado et al., 2012 ; Bossou et al., 2013 ; Menut et al., 2000 ; Koba et al., 2008 ; Sacchetti et al., 2005 ; Blanco et al., 2009 ; Kpoviessi et al., 2014) et se distingue de l'huile essentielle du Brésil moins riche en monoterpènes oxygénés (78,6 %) mais qui présente davantage de monoterpènes hydrocarbonés (15,5 %) (Sacchetti et al., 2005) (Tableau 12).

L'huile essentielle de géranium se compose majoritairement de monoterpènes (81,17 %) associés avec une quantité significative de sesquiterpènes hydrocarbonés (8,21 %), pour une composition comparable à celle de l'huile d'Algérie (Boukhatem et al.,2013b). Les monoterpènes oxygénés citronellol (23,43 %), géraniol (16,85 %) et formiate de citronellyle (12,29 %) conduisent à une composition similaire à celle de l'huile essentielle d'Algérie, de Serbie ou de la Tunisie (Boukhatem et al., 2013b ; Dzamic et al., 2013 ; Boukhris et al., 2013) (Tableau 13). Ainsi, l'huile essentielle de géranium de cette étude est représentative du chémotype « citronellol ». Ce dernier est caractérisé avec des traces de 10-epi-gamma-eudesmol et une quantité significative en formiate de citronellyle et en guaia-6,9-diène, ces proportions étant inversées avec le chémotype Bourbon (Boukhatem et al.,

2013b). Pour cette étude, l'huile essentielle de géranium se distingue de l'huile essentielle de citronnelle par une composition moins riche en monoterpènes oxygénés (81,17 %) et une présence significative de sesquiterpènes oxygénés (8,21 %).

Pour l'huile essentielle de vétiver, le sesquiterpène oxygéné khusimol a été identifié comme composé majoritaire (21,50 %) comme pour une huile essentielle caractérisée en Inde (Chahal et al., 2015) (Tableau 14). Cette composition riche en alcools se retrouve dans d'autres huiles essentielles (chémotypes Bourbon, Brésil, Haïti) (Martinez et al., 2004).

Dans cette étude, les trois huiles essentielles ont été choisies pour leur activité répulsive qui s'accorde donc de leurs compositions chimiques plus ou moins différentes avec comme composés d'intérêt les terpènes oxygénés (Nerio et al., 2010). Ce constat traduit une diversité structurale dans les huiles essentielles applicable à une diversité des vecteurs mais avec des mécanismes complexes et encore peu résolus qui ne permettent pas d'établir des compositions privilégiées. De la même manière, il n'y avait aucune donnée sur un spectre de composés naturels applicable au virus Ross River.

Tableau 12 Composition chimique de l'huile essentielle de *C. citratus* (feuilles) de la Réunion. Les résultats sont exprimés en la moyenne du pourcentage de l'aire ± erreur standard (n=9). Les composés majoritaires sont indiqués en gras.

No	Nom	GC-FID GC-TOF MS (%)	GC-FID (Machado et al., 2012)	GC-MS (Bossou et al., 2013)	GC-FID (Kpoviessi et al., 2014)
1	6-Méthyl-5-heptèn-2-one	0,76 ± 0,25	0,6		
2	**Myrcène**	**7,85 ± 1,46**	**11,5**	**12,4**	
3	1,8-Cinéole	0,04 ± 0,00			
4	(Z)-β-Ocimène	0,33 ± 0,06	0,4	0,3	0,4
5	(E)-β-Ocimène	0,22 ± 0,04	0,3	0,2	0,2
6	γ-Terpinène	0,05 ± 0,00			
7	Terpinolène	0,04 ± 0,00			0,2
8	6,7-Epoxymyrcène	0,14 ± 0,04	0,2	0,2	
9	Linalol	0,70 ± 0,10	0,8	1,1	0,9
10	Oxyde de (Z)-limonène	0,08 ± 0,03			
11	(Z)-Verbénol	1,34 ± 0,17			
12	Citronellal	0,60 ± 0,14	0,1	0,1	0,4
13	Oxyde de β-pinène	0,05 ± 0,01			
14	(Z)-isocitral	1,61 ± 0,28			
15	**(E)-isocitral**	**2,68 ± 0,47**			
16	α-Terpinéol	0,08 ± 0,00			
17	Citronellol	0,54 ± 0,11			0,4
18	(Z)-Carvéol	0,07 ± 0,01			
19	**Néral**	**32,16 ± 0,69**	**32,5**	**33,1**	**35,5**
20	**Géraniol**	**3,29 ± 0,31**	**1,3**	**1,0**	**4,3**
21	**Géranial**	**45,11 ± 2,46**	**45,7**	**44,3**	**39,5**
22	Formiate de néryle	0,03 ± 0,00			
23	2-Undécanone	0,24 ± 0,15	0,1	0,1	0,1
24	Acétate de néryle	0,34 ± 0,22			
25	Acétate de géranyle	0,49 ± 0,06	0,8	0,8	1,0
26	β-Elemène	0,08 ± 0,00			
27	Acide nérolique	0,05 ± 0,02			0,1
28	(E)-Caryophyllène	0,08 ± 0,01	0,1	0,1	0,2
29	α-(E)-Bergamotène	0,05 ± 0,01	traces		0,1
30	α-Humulène	0,06 ± 0,00			
31	γ-Muurolène	0,04 ± 0,00			
32	Elémol	0,26 ± 0,05			
33	Oxyde de caryophyllène	0,08 ± 0,02		0,1	0,1
34	τ-Muurolol	0,04 ± 0,00			
35	α-Cadinol	0,09 ± 0,02			
36	Intermédeol	0,12 ± 0,00			
37	Eudesm-7(11)-en-4-ol	0,04 ± 0,00			0,1
	Total identifié	99,84			

Tableau 12 (suite) Composition chimique de l'huile essentielle de *C. citratus* (feuilles) de la Réunion.

Monoterpènes oxygénés	90,16
Monoterpènes hydrocarbonés	8,49
Monoterpènes	98,65
Sesquiterpènes oxygénés	0,67
Sesquiterpènes hydrocarbonés	0,55
Sesquiterpènes	1,22

[a] Indices de rétention de Kovats calculés grâce aux n-alcanes C_7-C_{30} sur une colonne non polaire Elite-5

[b] Indices de rétention de Kovats sur colonne non polaire DB-5 d'après la littérature (Adams, 2004)

Tableau 13 Composition chimique de l'huile essentielle de *P. graveolens* (feuilles) de La Réunion. Les résultats sont exprimés en la moyenne du pourcentage de l'aire ± erreur standard (n=9). Les composés majoritaires sont indiqués en gras.

No	Nom	GC-FID GC-TOFMS (%)	GC-MS (Ćavar and Maksimović, 2012)	GC-MS (Boukhatem et al., 2013b)
1	α-Pinène	0,52 ± 0,01		0,1
2	β-Pinène	0,08 ± 0,00		
3	Myrcène	0,71 ± 0,05		
4	Oxyde de déhydro-trans-linalol	0,10 ± 0,00		
5	α-Phellandrène	0,09 ± 0,01	traces	
6	p-Cymène	0,36 ± 0,02		0,2
7	Limonène	0,14 ± 0,03		
8	β-phellandrène	0,08 ± 0,01		
9	(Z)- β-Ocimène	0,23 ± 0,01		
10	(E)- β-Ocimène	0,35 ± 0,02		
11	Oxyde de (Z)-linalol	0,35 ± 0,00	0,1	
12	Oxyde de (E)- linalol	0,19 ± 0,01	0,1	
13	**Linalol**	**10,79 ± 0,05**	**3,6**	**3,2**
14	(E)-sabinène hydrate	0,08 ± 0,01		
15	6-Méthyl-3,5-heptadiène-2-one	0,07 ± 0,01		
16	Oxyde de (Z)-Rose	0,54 ± 0,01	0,1	1,3
17	Oxyde de (E)-Rose	0,22 ± 0,01	0,1	2,2
18	Isobutanoate de (Z)-3-Hexényle	0,07 ± 0,00		
19	Menthone	0,46 ± 0,03	5,2	3,6
20	**Isomenthone**	**7,06 ± 0,02**		**4,1**
21	Terpinène-4-ol	0,07 ± 0,01		
22	p-cymène-8-ol	0,16 ± 0,01		
23	isomenthol	0,12 ± 0,00		
24	α-terpinéol	0,83 ± 0,05	0,2	0,2
25	Myrténol	0,07		
26	**Citronellol**	**23,43 ± 0,14**	**19,0**	**30,2**
27	Néral	0,60 ± 0,00		0,3
28	**Géraniol**	**16,85 ± 0,05**	**27,5**	**7,6**
29	(E)-Myrtanol	0,30 ± 0,05		
30	Géranial	0,86 ± 0,06		2,6
31	**Formiate de citronellyle**	**12,29 ± 0,05**		**9,3**
32	Formiate de néryle	0,16 ± 0,00		
33	**Formiate de géranyle**	**4,72 ± 0,04**	**0,1**	**1,5**
34	α-Cubébène	0,21 ± 0,00		0,2
35	Acétate de citronellyle	0,28 ± 0,01		0,4
36	Propanoate de 2-Phényléthyle	0,08 ± 0,01		
37	α-Ylangène	0,14 ± 0,01		0,3

Tableau 13 (suite) Composition chimique de l'huile essentielle de *P. graveolens* (feuilles) de La Réunion.

38	α-Copaène	0,40 ± 0,00	0,5	0,5
39	β-Bourbonène	0,46 ± 0,01	0,1	1,3
40	Isobutanoate de phényléthyle	0,20 ± 0,00	0,5	
41	**(E)-caryophyllène**	0,84 ± 0,01	1,2	0,6
42	α-guaiène	0,58 ± 0,01	0,5	0,1
43	**Guaia-6,9-diène**	**3,54 ± 0,05**	**4,6**	**5,4**
44	Propanoate de cytronellyle	0,30 ± 0,01		1,0
45	α-humulène	0,21 ±0,01	0,3	
46	Allo-aromadendrène	0,11 ± 0,01		0,5
47	**Propanoate de géranyle**	**1,16 ± 0,02**	**1,6**	
48	γ-muurolène	0,08 ± 0,01		
49	Germacrène	0,60 ± 0,01	0,1	1,5
50	Isobutanoate de citronellol	0,11 ± 0,00		
51	α-selinène	0,09 ± 0,01		0,3
52	α-muurolène	0,24 ± 0,00		0,1
53	δ-amorphène	0,09 ± 0,00	0,5	1,5
54	Trans-calamenène	0,51 ± 0,00		0,5
55	Butanoate de citronellyle	0,29 ± 0,00		1,5
56	Furopelargone A	0,28 ± 0,01		
57	**Butanoate de géranyle**	**1,18 ± 0,01**	**0,7**	**1,1**
58	**Tiglate de 2-phényléthyle**	**1,03 ± 0,01**	**2,3**	**2,3**
59	Isovalerate de géranyle	0,09 ± 0,00		0,5
60	Cubénol<1,10-di-epi->	0,09 ± 0,01	0,2	
61	10-épi-gamma-eudesmol	0,20 ± 0,01	5,0	0,8
62	Valérate de citronellyle	0,10 ± 0,00		1,4
63	α-muurolol	0,27 ± 0,01	1,0	
64	β-eudesmol	0,15 ± 0,03	0,4	
65	Valérate de géranyle	0,50 ± 0,06	0,4	0,2
66	Tiglate de citronellyle	0,12 ± 0,03	0,5	0,5
67	Tiglate de géranyle	1,30 ± 0,02	3,9	2,0
	Total identifié	98,74		
Monoterpènes oxygénés		81,17		
Monoterpènes hydrocarbonés		2,56		
Monoterpènes		83,73		
Sesquiterpènes oxygénés		3,1		
Sesquiterpènes hydrocarbonés		8,21		
Sesquiterpènes		11,31		

[a] Indices de rétention de Kovats calculés grâce aux n-alcanes C_7-C_{30} sur une colonne non polaire Elite-5

[b] Indices de rétention de Kovats sur colonne non polaire DB-5 d'après la littérature (Adams, 2004)

Tableau 14 Composition chimique de l'huile essentielle de *V. zizanioides* (racines) de la Réunion. Les résultats sont exprimés en la moyenne du pourcentage de l'aire ± erreur standard (n=6). Les composés majoritaires sont indiqués en gras.

No	Nom	%	GC-MS I (Chou et al., 2012)	GC-MS II (Mallavarapu et al., 2012)	GC-MS III (Mallavarapu et al., 2012)
1	1,8-cinéole	0,09			
2	Linalol	0,90			
3	Menthone	0,12			
4	Isomenthone	0,08			
5	Bornéol	0,05			
6	Terpinène-4-ol	0,35			
7	α-Terpinéol	0,42			
8	**Citronellol**	**3,98**			
9	Géraniol	0,52			
10	α-Ylangène	0,11			
11	α-copaène	0,82			
12	Isoledène	0,08			
13	β-cubébène	0,11			
14	7-epi-sesquithujène	0,19			
15	Acora-3,7(14)-diène	0,08			
16	β-Funebrène	0,17			
17	**2,5-dimethoxy-p-cymène**	**1,29**			
18	Prezizaène	0,79			
19	Khusimène	1,00		0,66	1,59
20	α-Amorphène	0,44	7,80	0,22	1,68
21	α-Vétispirène	0,88			
22	β-Vétispirène	0,57			
23	δ-Sélinène	0,12			
24	δ-Amorphène	0,10			
25	Nootkatène	0,20			
26	δ-Cadinène	0,31	2,57		
27	γ-Vétivénène	0,17			
28	α-Calacorène	0,70			
29	Elémol	0,58			
30	β-Vétivénène	0,43			
31	**Epi-longipinanol**	**1,46**			
32	β-calacorène	0,17			
33	Oxyde de caryophyllène	0,17		0,28	
34	Tiglate de 2-phényléthyle	0,59			
35	Viridiflorol	0,51			
36	**Khusimone**	**3,36**			
37	di-épi-1,10-Cubénol	0,69			

Tableau 14 (suite) Composition chimique de l'huile essentielle de *V. zizanioides* (racines) de la Réunion.

38	Eremoligénol	1,15		
39	Epoxyde de allo-Aromadendrène	0,20		0,83
40	Epi-α-muurolol	0,79		
41	**β-eudesmol**	**2,81**		
42	**Epi-zizanone**	**1,80**		
43	**Cadalène**	**1,73**		
44	**Khusinol**	**3,69**	**10,28**	
45	**Zizanal**	**3,38**		
46	**8-cedrèn-13-ol**	**1,98**		
47	(Z)-5-hydroxy-calamenène	0,17		
48	**Vétisélinénol**	**3,27**		
49	**Khusimol**	**21,50**	**16,25**	**15,77**
50	**(E)-Isovalencénol**	**6,06**		
51	Nootkatone	0,88		
52	**β-Vétivone**	**1,93**		
53	**α-Vétivone**	**3,37**	**2,01**	**3,44**
	Total identifié %	78,60		

[a] Indices de rétention de Kovats calculés grâce aux n-alcanes C_7-C_{30} sur une colonne non polaire Elite-5

[b] Indices de rétention de Kovats sur colonne non polaire DB-5 d'après la littérature (Adams, 2004)

I Huile essentielle de Taïwan (Chou et al., 2012)

II Huile essentielle du nord de l'Inde (Mallavarapu et al., 2012)

III Huile essentielle du sud de l'Inde (Mallavarapu et al., 2012)

III - Tolérance cellulaire des huiles essentielles

En tant que produits naturels, les huiles essentielles sont parfois considérées à tort comme inoffensives, en particulier lors d'une application cutanée. L'amélioration de la durée de protection de ces répulsifs cutanés naturels s'accompagne de l'utilisation de concentrations de plus en plus élevées de ces huiles (Fradin and Day, 2002). Or une exposition excessive à ces composés peut entraîner des effets secondaires (Brown and Hebert, 1997). Ainsi, des réactions allergiques ont été observées suite à un contact de la peau avec des huiles essentielles, comme celle d'ylang-ylang ou encore celle de citronnelle (Uter, Wolfgang et al., 2010 ; Frosch et al., 2002).

Certains composés des huiles essentielles peuvent être absorbés par la peau et induire une toxicité, comme le montre l'étude de Hayes en utilisant un système de diffusion de cellule de Franz (Hayes and Markovic, 2003). Ainsi, le citral qu'on retrouve dans l'huile essentielle de citronnelle fait partie de ces composés facilement absorbés par la peau indépendamment du temps d'exposition. Les composés monoterpèniques de l'huile essentielle de géranium, comme le limonène ou l'α-pinène et le β-pinène sont aussi connus pour être absorbés par la peau (Kohlert et al., 2000 ; Ekpenyong et al., 2015). Une autre étude met en évidence l'absorption par la peau de composés terpéniques (Cal and Sznitowska, 2003). Afin de limiter ces phénomènes de diffusion, des formulations telles que la microencapsulation ont été utilisées pour les répulsifs cutanés (Solomon et al., 2012). A l'opposé, on peut tirer avantage de cette diffusion pour l'exploitation des huiles essentielles comme antiviral sur le site d'infection mais à des doses tolérables.

A ce jour, l'évaluation de la toxicité des huiles essentielles se fait principalement sur des modèles animaux, par application au niveau du dos ou de l'oreille de rongeurs et l'observation de la présence d'érythèmes ou œdèmes (Zhang et al., 2012 ; Lalko and Api, 2006) . Cependant, peu d'études ont lieu *in vitro* sur des cellules représentatives de la peau. Dans cette étude, des lignées cellulaires (HaCaT, SK-MEL28 et MRC-5) ont été choisies pour l'étude de toxicité, par leur contact privilégié avec une huile essentielle appliquée sur la peau.

Grâce à la mesure de la viabilité cellulaire par trois tests différents, les concentrations toxiques ont été alors évaluées. Ainsi la citronnelle est toxique pour les lignées cellulaires HaCaT, SK-MEL28 et MRC-5 à fortes concentrations, avec 100 % de cellules mortes à 1 mg/mL. Les valeurs de CC_{50} permettent de comparer la toxicité des huiles essentielles sur les différentes lignées cellulaires. La mesure de la viabilité par le test au MTT sur des cellules HaCaT traitées par la citronnelle donnait une valeur de CC_{50}

de 92,1 µg/mL (soit 110,05 µL/mL), comparable à celle obtenue pour la citronnelle du Togo sur le même type cellulaire (CC_{50} de 150 µL/mL) (Koba et al., 2008).

La toxicité varie aussi selon le type cellulaire : la lignée HaCaT est la moins sensible lors d'un traitement par la citronnelle que les lignées SK-MEL28 et MRC-5. Cette différence peut s'expliquer par les fonctions associées à ces cellules : les kératinocytes ont en effet une fonction de sentinelle, tandis que les mélanocytes sont immunocompétentes et les fibroblastes réguleraient la réponse inflammatoire (Lu et al., 2002 ; Jordana et al., 1994). La toxicité de l'huile essentielle de citronnelle sur des cellules lymphocytes humaines prélevées à partir de patients est plus faible que celle observée dans notre étude. En effet, à une concentration de 2 mg/mL, la viabilité cellulaire mesurée par le test au MTT est de 80 % (Sinha et al., 2014).

L'analyse chimique de l'huile essentielle de citronnelle a permis d'établir la présence de monoterpènes oxygénés et de sesquiterpènes comme constituants majoritaires (Tableau 15). Or une étude associe l'activité répulsive à ces composés plutôt qu'aux composés hydrocarbonés (Papachristos et al., 2004). Un enrichissement de l'huile essentielle en composés oxygénés serait aussi avantageux au niveau la formulation, en augmentant la solubilité de l'huile dans l'eau et en permettant une stabilisation du mélange complexe (Gañán and Brignole, 2013). Toutefois, les résultats de la présente étude montrent un profil de toxicité semblable entre l'huile essentielle totale et la fraction enrichie en composés oxygénés. Pour une application cutanée, l'utilisation de l'huile essentielle peut donc se faire sans traitement supplémentaire.

Tableau 15 Principales caractéristiques des huiles essentielles

Huile essentielle	**Composés majoritaires**	**CC_{50} (µg/mL)**	**CC_{10} (µg/mL)**
Cymbopogon citratus (CC)	Géranial (45,11 %) Néral (32,16 %) Myrcène (7,85 %)	49,5 ± 20.5	17,6 ± 8,2
Pelargonium graveolens (PG)	Citronellol (23,43 %) Géraniol (16,85 %) Formiate de citronellyle (12,29 %) Linalol (10,79 %) Isomenthone (7,06 %)	> 1000	533 ± 199
Vetiveria zizanioides (VZ)	Khusimol (23,78 %) (*E*)-Isovalencenol (6,79 %) α-Vétivone (3,84 %)	169,9 ± 72.2	29,4 ± 13,5

IV - Mécanisme d'action antivirale

Dans cette étude, l'absorption cutanée de l'huile essentielle a été prise en avantage dans un contexte infectieux. Les connaissances acquises sur le cycle de vie du virus et les techniques immuno-virologiques ont permis de mettre au point un modèle adapté pour évaluer la capacité d'inhibition du virus Ross river par les huiles étudiées.

Les cellules représentatives de la peau ont d'abord été étudiées. Cependant, toutes les cellules ne sont pas permissives au virus Ross River. Mais lors d'un repas sanguin par une femelle moustique infectée par le virus Ross River, ce dernier peut se retrouver en contact avec diverses cellules, car la femelle moustique est à la recherche d'un vaisseau sanguin au niveau de la peau grâce à son proboscis. Cette phase peut durer plusieurs secondes, et le virus pourrait alors être transmis à différents types cellulaires (Choumet et al., 2012).

Toutefois dans notre étude, les lignées cellulaires représentatives des cellules de peau, HaCaT, SK-MEL28 et MRC-5 se révèlent peu permissives au virus en comparaison avec la lignée épithéliale HEK293T, davantage permissive au virus. Il a été mis en évidence que le virus Ross River se réplique efficacement dans ces cellules et que des virions infectieux sont produits. Assi et al. ont réussi à infecter des cellules SK-MEL28 par la souche RRV-T48 avec un pourcentage de l'ordre de 20 % à 24 h et pouvant aller jusqu'à 60 % à 48 h. Cependant, malgré ce pourcentage d'infection important à 48 h, on observe dans notre cas sur SK-MEL28, un fort effet cytopathique par rapport à l'étude de Assi et al. au bout de deux jours, ce qui ne permet pas de retenir ce modèle cellulaire (Assi et al., 2015). D'autres lignées cellulaires ont été exposées au virus Ross River et de l'ARN génomique du virus a été retrouvé dans des cellules monocytes humaines (MM6), mais peu de virions infectieux sont produits dans ce type cellulaire (Krejbich-Trotot et al., 2016). Les cellules épithéliales HEK293T se sont avérées être un bon modèle d'étude par leur permissivité et leur capacité à produire des virions infectieux.

Il y a actuellement un intérêt grandissant pour la capacité antivirale des huiles essentielles (Jassim and Naji, 2003 ; Turmagambetova et al., 2015). Les huiles essentielles ayant une activité répulsive n'avaient jamais été envisagées dans le contexte cutané comme antiviraux. Cette étude a montré que les huiles essentielles de citronnelle et géranium retardent l'effet cytopathique de la souche RRV-T48, avec un effet plus important pour le géranium. Il a été établi que l'effet cytopathique n'était pas corrélé à un effet virucide ou une action sur l'entrée du virus. Afin de déterminer plus précisément l'activité de ces huiles essentielles, des clones moléculaires du virus Ross River ont été utilisés.

En utilisant les clones moléculaires, il a pu être montré que l'huile essentielle de géranium et celle de citronnelle dans une moindre mesure, agissent au niveau des étapes précoces de la réplication virale. Le contrôle positif chloroquine a permis de valider le modèle utilisé. Il a été observé que l'inhibition de la réplication virale est maximale lorsque les huiles essentielles de citronnelle et géranium sont appliquées pendant ou après adsorption du virus (application concomitante ou postérieure). Du fait de sa faible toxicité sur les cellules épithéliales et de sa capacité à inhiber la réplication virale, l'huile essentielle du géranium s'avère donc intéressante pour son exploitation comme antiviral à application locale (et non systémique). Son activité inhibitrice a aussi été mise en évidence sur le virus influenza (Turmagambetova et al., 2015). L'activité d'autres huiles essentielles a été mise en évidence sur le virus de l'herpès (*Herpesviridae*), le virus de la fièvre jaune (*Flaviviridae*) et le virus influenza (*Orthomyxoviridae*) (Minami et al., 2003 ; Schnitzler et al., 2001 ; Meneses et al., 2009 ; Turmagambetova et al., 2015). A notre connaissance, il n'y a pas d'études sur l'effet des huiles essentielles sur des alphavirus.

Cette activité antivirale des huiles essentielles serait à relier à leur composition. En effet, on peut noter que la citronnelle et le géranium sont composés majoritairement de monoterpènes oxygénés, tandis que le vétiver, qui n'a pas d'activité antivirale contient davantage de sesquiterpènes. De plus, la fraction oxygénée du géranium montre aussi une inhibition importante du virus Ross River. L'activité antivirale de monoterpènes hydrocarbonés (α-pinène, β-pinène ou le limonène), de monoterpènes oxygénés (α-terpinéol, thymol, géranial, néral) ainsi que le sesquiterpène β-caryophyllène a été montrée en incubant pendant 1 h le virus HSV-1 avec ces composés (Astani et al., 2010 ; Astani et al., 2011 ; Astani and Schnitzler, 2014). L'activité virale sur les cellules de singe RC-7 est alors réduite de plus de 80 %. L'hypothèse avancée dans l'étude d'Astani et al. serait une action sur la structure de l'enveloppe du virus plutôt que sur la réplication virale. Dans notre étude, l'action des huiles essentielles se ferait plutôt au niveau de la réplication virale.

V - Modulation induite de l'immunité cutanée

Lors d'une infection par un virus, le système immunitaire de la cellule hôte est sollicité comme pour tout élément étranger introduit dans l'organisme. Or de nombreuses huiles essentielles sont connues pour avoir une activité anti-inflammatoire. Des études rapportent notamment l'activité anti-inflammatoire de la citronnelle, du géranium et du vétiver (Boukhatem et al., 2014 ; Boukhatem et al., 2013a ; Chou et al., 2012).

Dans cette étude, l'infection par le virus Ross River induit une expression du gène stimulé par l'interféron ISG 54 et du gène codant pour la cytokine pro-inflammatoire IL-6, ainsi que la production des protéines correspondantes. Il a été décrit dans la littérature que lors d'une infection virale, les cellules peuvent produire des cytokines, telles qu'IL-6, impliquées dans la régulation de l'inflammation (Harker et al., 2011). Cette cytokine pro-inflammatoire peut être produite par différents types cellulaires et a un impact sur le développement des lymphocytes T CD8+, eux-mêmes responsables de l'élimination des cellules infectées (Cox et al., 2013). L'expression du gène IL-6 peut être induite par la voie NF-κB (Libermann and Baltimore, 1990). Le gène ISG 54 code notamment pour la protéine antivirale IFIT 2 (IFN-induced protein with tetraticopeptide repeats) qui induirait l'apoptose des cellules (Stawowczyk et al., 2011). Cependant d'après nos résultats, l'infection par le virus Ross River ne semble pas impliquer les voies NF-κB et IFN à 24 h post-infection. Assi et al. montrent une expression d'IFN-β à 48 h post-infection lors d'une infection de mélanocytes SK-MEL28 par le virus Ross River, mais là aussi le virus interfère avec la réponse IFN (Assi et al., 2015). Pour nos travaux, le virus Ross River a été produit sur des cellules de singe Vero. Or il a été décrit que les cellules dendritiques primaires réagissent différemment selon si elles sont infectées par le virus Ross River dérivé de cellules de mammifères ou dérivé de cellules de moustiques. En effet, dans le premier cas, il y a induction importante d'IFN antiviraux à 18 h post-infection par rapport à une infection par le virus dérivé de cellules de moustiques (Shabman et al., 2007). La composition de la membrane lipidique aurait donc peut être un rôle dans l'activité antivirale dépendante de la voie IFN.

De plus, dans notre étude, les huiles essentielles de citronnelle, de géranium et de vétiver réduisent l'expression d'IL-6 et ISG 54, après infection par le virus Ross River lorsqu'elles sont appliquées en co-traitement. Les huiles essentielles étudiées ont été décrites pour avoir une activité anti-inflammatoire (Boukhatem et al., 2014 ; Boukhatem et al., 2013a ; Elmann et al., 2010 ; Chou et al., 2012). Des études sur les extraits de citronnelle ont montré qu'ils pouvaient réduire la production du médiateur pro-inflammatoire TNF-α ou encore inhiber les voies de l'inflammation NF-κB, P38 MAPK et

JNK ½ (Tiwari et al., 2010 ; Francisco et al., 2011 ; Francisco et al., 2013). Les voies de l'inflammation impliquées lors de l'infection par le virus Ross River et le rôle des huiles essentielles sont encore à préciser.

Conclusion

Dans cette étude, l'activité anti-infectieuse des trois huiles essentielles de citronnelle (*Cymbopogon citratus*), de géranium (*Pelargonium graveolens*) et de vétiver (*Vetiveria zizanioides*) a été conduite à partir de leur composition chimique mieux résolue, de doses tolérables sur un modèle cellulaire qui a permis de préciser leur influence sur le processus infectieux du virus Ross River. Le cadre biologique qui a été utilisé repose sur des cellules HEK293T qui permettait de reproduire un contexte infectieux et de suivre l'inhibition de la réplication virale par les huiles essentielles. Ces dernières montrent également une activité immuno-modulatoire dont les voies inflammatoires restent toutefois à préciser.

L'étude comparative des trois huiles essentielles a fait ressortir l'activité inhibitrice particulièrement significative de l'huile essentielle de géranium contre des cellules infectées par le virus Ross River. L'huile essentielle de citronnelle présentait une activité modérée tandis qu'aucune activité significative de l'huile essentielle de vétiver n'a été observée. Ces résultats suggèrent que l'activité anti-infectieuse contre le virus Ross River est associée à une composition riche en monoterpènes et ouvrent d'autres perspectives dans la recherche de nouvelles formulations anti-infectieuses d'origine naturelle.

Face aux virus émergents ou ré-émergents, la prévention des arboviroses appelle de nouveaux moyens d'intervention. Les résultats de ces travaux soutiennent une nouvelle voie qui considère l'activité anti-infectieuse que peuvent apporter des huiles essentielles initialement appliquées sur la peau comme répulsifs de contact. Une telle stratégie serait un atout dans l'économie de la santé et permettrait de mieux aux nouvelles exigences de sécurité sanitaire et environnementales.

PARTIE 4 : Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

Les parties aériennes de *Cymbopogon citratus* (DC) Strapf et *Pelargonium graveolens* ont été récoltées en juillet 2014 et juin 2015 dans les hauts de l'île de la Réunion. Les racines de *Vetiveria zizanioides* ont été récoltées en décembre 2015. Tous les échantillons ont été généreusement mis à disposition par la CAHEB (Coopérative Agricole des Huiles essentielles de Bourbon).

2. Préparation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont extraites par hydrodistillation en triplicata en utilisant un appareil de type Clevenger. 2,5 kg des parties aériennes des plantes de géranium et citronnelle ou des racines de vétiver sont utilisées pour l'extraction. Les huiles essentielles sont décantées à partir de la phase aqueuses, séchées par du sulphate sodium anhydre puis filtrées à l'aide d'un filtre Minisart (0,2 µm). Les échantillons sont ensuite stockés à 4°C dans l'obscurité.

3. Fractionnement de l'huile essentielle de citronnelle

La déterpénation s'effectue par l'utilisation d'une colonne de verre remplie de silice (taille des particules : 40-63 µm). La silice est conditionnée par un passage du solvant hexane (100 %). 5 g de l'huile essentielle de citratus ou du géranium sont déposés sur la silice. L'éluant pour les composés hydrophobes est de l'hexane à 100 %. Les fractions récoltées sont analysées par CCM et révélées par UV et l'utilisation du permanganate de potassium. Une fois les composés hydrocarbonés élués, un éluant 100 % éthanol est utilisé pour éluer les composés hydrophobes restants. Les solvants hexane et éthanol sont ensuite évaporés à l'évaporateur rotatif et les échantillons pesés.

4. Caractérisation chimique

Les constituants des huiles essentielles ont été analysés et quantifiés par GC-FID avec un chromatographe en phase gazeuse PerkinElmer *Clarus* 500 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. Le chromatographe est équipé d'une colonne capillaire de silice Elite-5 (5 % diphenyl, 95 % dimethylpolysiloxane) de 30 m de long, 0,25 mm de diamètre interne, et d'une épaisseur de film de 0,25 µm. Les huiles essentielles sont diluées dans du pentane (> 99 %, 0,5 % H_2O, v/v). Le gaz vecteur est l'hélium à une pression d'entrée de 15 psi à 50°C, soit l'équivalent d'un débit volumétrique de 1,3 $mL.min^{-1}$. La température du détecteur est de 300°C et la température du four est programmée de 50°C (2 min) à 280°C (10 min) à une vitesse de 5°C. min^{-1}. Un injecteur avec ou sans division est utilisé

à 260°C en mode division avec un ratio de 1 : 10. Le volume d'injection est de 1 µL.

L'identification des composés organiques volatils est faite en utilisant un système GC×GC-TOFMS LECO Pegasus 4D, consistant en un chromatographe en phase gazeuse Agilent 7890A GC, avec un système GERSTEL Multipurpose Sampler MPS couplé à un spectromètre de masse utilisant un détecteur temps de vol (TOF) (LECO) et un modulateur cryogénique à quatre jets (Zoex, Houston, TX), en comparant l'indice de rétention dans le programme unidimensionnel à température linéaire à ceux obtenus précédemment par la même méthode (Baranauskienė et al., 2016). Le système est équipé d'une première colonne BPX-5 (30 m, 0,25 mm d.i., épaisseur de film 0,25 µm) (SGE Analytical Science) connectée en série à une deuxième colonne BPX-50 (2,0 m, 0,10 mm d.i., épaisseur de film 0,1 µm). Le premier four est programmé pendant 2 min à 50°C puis la température augmente jusqu'à 280°C avec une vitesse de 5°C.min^{-1}. La température du deuxième four est maintenue 2 min à 65°C puis augmente progressivement jusqu'à 295°C à 5°C.min^{-1}. La ligne de transfert de la température est de 250°C. Le port de l'injecteur GC a été maintenu à 280°C avec un temps de désorption de 5 min. Le taux d'acquisition TOF MS est de 20 spectres s, la zone de masse utilisée pour l'identification est de 30-550 m/z. La tension du détecteur est réglée à 1550 V et une température de source d'ions de 250°C. Les données du système GCxGC-TOFMS ont été collectées par le logiciel ChromaTOF V.4.22 (LECO) après un délai du pic de solvant de 480 s. Le rapport de division est réglé à 1 : 20. Pour la détection de pic et l'identification des spectres avec les bibliothèques de spectres de masse NIST, MainLib, Replib et Adams, le seuil de bruit de fond a été fixé à 50 et le minimum de similarité à 750.

Les fractions obtenues par déterpénation ont été analysées grâce à un chromatographe en phase gazeuse Agilent 7890A GC, couplé à un spectromètre de masse utilisant un détecteur à impact électronique (70 eV). Le système est équipé d'une colonne capillaire (30 m, 0,25 mm d.i., épaisseur de film 0,25 µm). Le gaz vecteur est l'hélium à une pression d'entrée de 15 psi à 50°C, soit l'équivalent d'un débit volumétrique de 1,3 mL.min^{-1}. La température du détecteur est de 300°C et la température du four est programmée de 50°C (5 min) à 280°C (15 min) à une vitesse de 4°C. min^{-1}.

L'identification des composés organiques volatils est faite par comparaison entre les indices de rétention de Kovats (KI) par rapport aux *n*-alcanes C_7-C_{30} obtenus par une colonne non polaire Elite-5 avec ceux fournis par la littérature (Adams, 2004) et en comparant leurs spectres de masse avec les données correspondantes des constituants des huiles de référence. L'identification est considérée comme positive lorsque qu'il y a correspondance entre le spectre de masse et le KI (Baranauskienė et al., 2016).

5. Culture cellulaire

Les différentes lignées cellulaires utilisées sont les kératinocytes humains HaCaT, mélanocytes humains SK-MEL28, fibroblastes humains MRC-5, fibroblastes humains HS633T, les cellules rénales embryonnaires humaines HEK293T et les cellules rénales épithéliales de singe Vero (ATCC).

Le milieu de culture utilisé est du DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) ou du MEM (Modified Eagle's medium) auquel on ajoute 10 % de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur, 2 mM de L-glutamine, 100 $U.mL^{-1}$ de pénicilline, 0,1 $mg.mL^{-1}$ de streptomycine, 1 mM de sodium pyruvate et 250 $\mu g.mL^{-1}$ d'amphotéricine. Les cellules sont maintenues dans une atmosphère humide à 5 % CO_2 et à 37°C.

6. Test MTT

La viabilité est mesurée en utilisant le test colorimétrique au sel de tétrazolium MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Mosmann, 1983). Lorsque les cellules sont vivantes, l'enzyme mitochondriale succinate déshydrogénase réduit le MTT en cristaux de formazan

Les cellules HaCaT, SK-MEL-28, MRC-5, HEK293T, Vero sont ensemencées en plaques de 96 puits (1×10^4 cellules/puits). Après une nuit à 37°C, les cellules sont traitées pendant 21 h avec des concentrations croissantes en huile essentielle allant de 0,14 à 1130 $\mu g.mL^{-1}$. Les huiles essentielles sont solubilisées dans 0,4 % DMSO (Sigma). Afin d'optimiser le protocole, les plaques sont recouvertes d'un film adhésif (Dutscher).

A l'issu du traitement par l'huile essentielle, 20 µL d'une solution de MTT à 5 mg. mL^{-1} sont ajoutés sur les cellules. Après 1h à l'obscurité à 37°C, le milieu est retiré et remplacé par 100 µL de DMSO (Sigma). L'absorbance est ensuite mesurée à 570 nm avec une correction à 690 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Tecan Sunrise™.

Les concentrations cytotoxiques sont définies comme étant les concentrations en huile essentielle responsables de 50 % (CC_{50}) ou 10 % (CC_{10}) de mortalité par rapport au contrôle sans traitement par les huiles essentielles.

7. Test Cristal Violet

La viabilité des cellules représentant les cellules modèles de peau a aussi été déterminée par le test

colorimétrique au cristal violet, agent intercalant de l'ADN.

Les cellules HaCaT, SK-MEL-28, MRC-5 sont ensemencées en plaques de 96 puits (1×10^5 cellules/puits). Après une nuit à 37°C, les cellules sont traitées pendant 21h avec des concentrations croissantes en huile essentielle allant de 0,14 à 1130 $\mu g.mL^{-1}$. Les huiles essentielles sont solubilisées dans 0,4 % DMSO (Sigma). Afin d'optimiser le protocole, les plaques sont recouvertes d'un film adhésif (Dutscher).

A l'issu du traitement par l'huile essentielle, le milieu est retiré et 50 µL d'une solution de cristal violet (0,5 %) sont ajoutés sur les cellules pendant 10 minutes. Puis le cristal violet est retiré et remplacé par 100 µL de SDS (1 %). L'absorbance est ensuite mesurée à 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Tecan Sunrise™.

8. Coloration au bleu de trypan

La coloration au bleu de trypan permet de déterminer la viabilité cellulaire en comptant les cellules colorées, cellules mortes, dans lesquelles le bleu de trypan n'est pas relargué.

Les cellules HaCaT, SK-MEL-28, MRC-5 sont ensemencées en boîte de Pétri séparées (1×10^6 cellules par mL). Après une nuit à 37°C, les cellules sont traitées pendant 24 heures avec des concentrations croissantes en huile essentielle allant de 0,14 à 1130 $\mu g.mL^{-1}$. Les huiles essentielles sont solubilisées dans 0,4 % DMSO (Sigma). Les cellules vivantes (non colorées) sont ensuite comptées au microscope à l'aide d'une cellule de Malassez (Marienfeld).

9. Virus

Le virus Ross River est dérivé d'un clone infectieux de la souche T48 (RRV-T48), n° accession GenBank GQ433359, donné généreusement par le Professeur Richard J. Khun de l'université de Purdue.

Le virus recombinant RRV-T48 exprimant la *Renilla reniformis* luciférase au niveau des protéines non structurales a été obtenue comme précédemment décrit pour le virus du Chikungunya (Henrik Gad et al., 2012). De même pour le virus recombinant RRV-T48 exprimant la GFP au niveau des protéines structurales.

Ainsi les plasmides pRRV-*ren*Luc et pRRV-GFP sont linéarisés et l'ARN correspondant est transcrit *in vitro* en utilisant le kit mMESSAGE mMACHINEs (Ambion) avant d'être transfecté dans des cellules Vero afin d'obtenir les virus RRV- *ren*Luc et RRV-GFP (Krejbich-Trotot et al., 2016). Les surnageants sont collectés après 48h (premier passage) et sont amplifiés sur des cellules Vero (deuxième passage).

10. Titrage par plages de lyse

Les titres des virus sont déterminés grâce à la technique des plages de lyse. Celle-ci permet de quantifier le nombre de particules infectieuses dans une suspension virale. Une plage de lyse correspond donc à une zone de cellules lysées par une unité infectieuse virale (environ 300 particules physiques de virus).

Les cellules sont ensemencées sur des plaques 48 puits à une densité de 1×10^5 cellules par puits. Le lendemain les cellules sont incubées avec du 0,1 mL de milieu comprenant des dilutions de 10 en 10 des échantillons de virus pendant 2 h à 37°C. 0,1 mL de carboxymethylcellulose (CMC, Sigma) à 0,8 % est ensuite ajouté par-dessus les cellules et les suspensions virales. Après 48 h d'incubation à 37°C, la CMC est enlevée et la monocouche cellulaire est fixée avec 3,7 % de PFA pendant 10 min à température ambiante. Les cellules sont ensuite colorées avec 0,5 % d'une solution de cristal violet pendant 10 min. Puis le titre du virus est estimé dans chaque puit en comptant le nombre de plaques observées. Les résultats sont exprimés en PFU/mL (*plaque-formation unit* par mL).

11. Immunofluorescence

Les cellules HaCaT, SK-MEL-28, MRC-5, HS633T, HEK293T, Vero sont cultivées sur des lamelles de verre dans des plaques 24 puits. Après une nuit à 37°C, les cellules sont infectées par RRV-T48 ou RRV-GFP à différentes MOIs (0,01 ; 0,1 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10) pendant 2 h. Après 2 h, le milieu est retiré et remplacé par du milieu sans virus.

Après 24 ou 48 h à 37°C, les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde (PFA, 3,7 % en PBS) pendant 20 minutes. Les lamelles des cellules infectées par RRV-GFP sont directement montées sur des lames de microscopie avec du milieu de montage Vectashield.

Les autres cellules sont traitées par 50 mM NH_4Cl pendant 10 minutes. Après trois lavages par du PBS, les cellules sont perméabilisées avec 0,1 % triton X-100 en PBS pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite réhydratées dans du PBS avant d'être saturées au PBS, 1 % BSA, 0,1 % azide pendant 1 h à température ambiante.

Les lamelles ont ensuite été incubées pendant 30 minutes avec l'anticorps primaire (1 : 500) dans du PBS, 1 % BSA, 0,1 % azide. Après trois lavages au PBS, les lamelles sont incubées pendant 2 heures à l'obscurité avec l'anticorps secondaire (1 : 1000) et le DAPI (1 : 250) en PBS, 1 % BSA, 0,1 % azide. Les lamelles sont ensuite lavées trois fois avant d'être montées sur des lames à microscopie avec du milieu de montage Vectashield. Les images ont été acquises avec un microscope Nikon Eclips 80i.

12. Fluorescence

Le principe de ce test repose sur une construction d'un virus RRV-GFP auquel on a rajouté un gène rapporteur codant pour la GFP au niveau des gènes codant pour les protéines structurales. Lorsque le virus est répliqué et que les protéines structurales sont produites, on aura production de GFP.

Les cellules HEK293T sont ensemencées en plaques 96 puits (2×10^4 cellules par puits). Après qu'elles aient adhéré, on infecte les cellules par RRV- GFP à différentes MOI (2,5 ; 5 et 10). La fluorescence est lue à 6, 12, 18, 24, 36 et 48 h en remplaçant le surnageant par un volume minimal d'eau milliQ à l'aide d'un lecteur de plaque à fluorescence FLUOstar® Omega.

13. Bioluminescence

Le principe de ce test repose sur une construction d'un virus RRV-*ren*Luc auquel on a rajouté un gène rapporteur codant pour la luciférase au niveau des gènes codant pour les protéines non structurales. Lorsque le virus est répliqué, on aura production de luciférase.

Les cellules HEK293T sont ensemencées en plaques 96 puits (2×10^4 cellules par puits). Après qu'elles aient adhéré, on infecte les cellules par RRV- *ren*Luc à MOI 2. Le surnageant est récupéré à différents temps (6 ; 12 ; 18 ; 24 ; 30 ; 36 ; 42 et 48 h après infection) et les cellules sont lysées 10 minutes avec 20 µL de tampon de lyse (0,4 % CHAPS, 10 % glycérol, 1 mM EGTA, Tris-HCl). Puis 100 µL du substrat coelentérazine sont ajoutés et les plaques sont lues immédiatement avec lecteur de plaque à luminescence FLUOstar® Omega.

14. Traitement des clones moléculaires aux UV

Afin de vérifier que le signal en fluorescence ou en luminescence correspond à une production des clones moléculaires RRV-GFP et RRV-LUC, ces derniers ont été traités aux UV (0,05 ; 0,1 ; 0,15 ; 0,2 ; 0,3 et 0,4 Joules). Les solutions virales ont été déposées sur des cellules Vero cultivées en plaque 96 puits (1×10^4 cellules par puits) pendant 24 h. La fluorescence et la bioluminescence sont ensuite mesurées comme décrit précédemment.

15. Effet cytopathique des huiles essentielles

L'effet cytopathique des huiles essentielles de citronnelle, géranium et vétiver est mesuré sur les cellules HEK293T en utilisant le test MTT comme décrit précédemment. Les cellules HEK293T sont ensemencées sur des plaques 96 puits (2×10^4 cellules par puits). Après une nuit à 37°C, les cellules sont

infectées par RRV-T48 à une MOI2 ou par une solution contenant RRV-T48 à MOI2 et les huiles essentielles de citronnelle, géranium ou vétiver à une concentration non toxique (CC_{10}) pendant 2 h à 37°C. Puis le surnageant est retiré et remplacé par du milieu de culture ou l'huile essentielle ($1\times CC_{10}$) est ajouté. La viabilité cellulaire est ensuite mesurée à différents temps. Les contrôles correspondent aux cellules HEK293T infectées par RRV et non traitées par les huiles essentielles.

16. Activité virucide des huiles essentielles sur RRV-T48

L'activité virucide des huiles essentielles de citronnelle, géranium et vétiver sur RRV-T48 a été déterminée par PCR. Une solution contenant l'huile essentielle de citronnelle, géranium et vétiver à la concentration $0{,}1\times CC_{10}$ ou CC_{10}, ainsi que le virus RRV-T48 (1×10^5 PFU) est incubée pendant 1 h à 37°C.

L'ARN du virus de ces solutions est extrait au Trizol Reagent (Life Technologies) selon le protocole recommandé par le fournisseur. Puis l'enzyme M-MLV (Promega) est utilisée pour synthétiser l'ADN complémentaire par rétro-transcription à 37°C pendant 1 h. Cet ADN est amplifié par PCR en 30 cycles de 30 s à 95°C, puis 30s à 64°C, puis 30s à 72°C. Les amorces utilisées sont listées dans le Tableau 16. Les produits PCR sont ensuite déposés sur gel d'agarose (1 %). Puis le gel est révélé aux UV après migration à 100 V.

Tableau 16 Amorces utilisées

Gène	Amorce directe	Amorce inverse
GAPDH	GGGAGCCAAAAGGGTCATCA	TGATGGCATGGACTGTGGTC
nsP2	GGGCGGTGACTCCTTACATC	TCTCAGGACTCTAAAGGCGGA
E1	CCACACTTAACCTGGAGTACATTACC	AAACAGTAAGCTCCACCCCACAT

17. Détermination de l'effet des huiles essentielles sur l'entrée du virus

Une solution contenant l'huile essentielle de citronnelle, géranium ou vétiver à la concentration $0{,}1\times CC_{10}$ ou CC_{10}, ainsi que le virus RRV-T48 (1×10^5 PFU) est incubée pendant 1 h à 37°C. L'activité résiduelle est titrée sur des Vero par plage de lyse, comme décrit précédemment.

Des cellules Vero sont ensemencées en plaque 48 puits à une densité de 1×10^5 cellules par puits. Le lendemain les cellules sont prétraitées 1 h à 37°C. Puis l'infectivité résiduelle de RRV-T48 est

déterminée grâce au titrage par plages de lyse, en infectant les cellules Vero avec des dilutions de 10 en 10 de virus, comme décrit précédemment.

18. Temps d'addition – différents scénarios

Afin de déterminer l'effet des huiles essentielles sur la réplication du RRV, les cellules HEK293T sont ensemencées en plaque 96 puits (2×10^4 cellules par puits). Le lendemain, lorsqu'elles ont adhérées, les cellules sont infectées par RRV-*ren*Luc à une MOI 2 en présence de l'huile essentielle à une concentration non toxique (CC_{10}) selon plusieurs scénarios (Figure 32). Soit l'huile essentielle est ajoutée :

- 3 h avant l'incubation du virus puis est rajoutée après les 2 h de l'incubation du virus (prétraitement)
- pendant les 2 h d'incubation du virus et est rajoutée après avoir enlevé le milieu contenant le virus (co-traitement)
- 2 h, 4 h ou 6 h après l'incubation du virus (post-traitement)

Pour chacun des scénarios, l'activité luciférase est mesurée six fois pour trois expériences indépendantes comme décrit précédemment. La production de virions infectieux est déterminée à partir des surnageants par titrage par plages de lyse.

Les mesures de l'activité luciférase ainsi que la production de virions infectieux se font 24 h après infection. Les contrôles consistent en des cellules HEK293T infectées par RRV-*ren*Luc mais non traitées par les huiles essentielles.

19. Dosage des cytokines par qRT-PCR

Les cellules HEK293T sont ensemencées en boîte de Pétri séparées ($0,5\times10^6$ cellules par mL). Après une nuit à 37°C, les cellules sont infectées par RRV-LUC à une MOI 2 et traitées par les huiles essentielles de citronnelle, géranium et vétiver à une concentration CC_{10} (co-traitement) pendant 24 h ou seulement traitées par les huiles essentielles (contrôle). Le surnageant est récolté pour le dosage par ELISA.

Les ARN sont ensuite extraits au Trizol Reagent (Life Technologies) selon le protocole recommandé par le fournisseur. Puis l'enzyme M-MLV (Promega) est utilisée pour synthétiser l'ADN complémentaire par rétro-transcription à 37°C pendant 1 h. Cet ADN est amplifié par PCR en temps réel en 40 cycles de 15 s à 95°C, puis de 1 min à 60°C en utilisant le GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) selon les

instructions du fournisseur. Les résultats ont été analysés selon la méthode ΔΔCt et normalisés par rapport au gène GAPDH. Les amorces utilisées sont listées dans la (Tableau 17).

Tableau 17 Amorces utilisées pour le dosage des cytokines par qRT-PCR

Gène	Amorce directe	Amorce inverse
Hu IL-6	AAAGCTGCGCAGAATGAGAT	AAAGAGGCACTGGCAGAAAA
Hu IL-8	ATGACTTCCAAGCTGGCCGTG	TGCACCCAGTTTTCCTTGGGG
Hu MCP1	CAATAGGAAGATCTCAGTGC	GTGTTCAAGTCTTCGGAGTT
Hu ISG15	TTTGCCAGTACAGGAGCTTGTG	GGGTGATCTGCGCCTTCA
Hu ISG54	CTGGTCACCTGGGGAAACTA	GAGCCTTCTCAAAGCACACC
Hu ISG56	GAGGAGCCTGGCTAAGCAAA	GCATTTCATCGTCATCAATGGA

20. Quantification des cytokines par ELISA

La cytokine IL-6 a été quantifiée dans le surnageant des cellules HEK293T en utilisant le kit ELISA Human IL-6 Ready-Set-Go ! (e-Bioscience) selon les recommandations du fournisseur. Les plaques préalablement recouvertes d'anticorps de capture et saturées sont incubées 2 h avec les échantillons de surnageant. Après trois lavages, les plaques sont incubées avec les anticorps secondaires pendant 1 h. Après lavages, l'enzyme peroxydase (HRP) couplée à l'avidine est ajoutée pendant 30 min. La révélation se fait ensuite par ajout de TMB (tétraméthylbenzidine) et la réaction de coloration est stoppée par ajout de HCl. L'absorbance est ensuite mesurée à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Tecan Sunrise™. Une gamme étalon est utilisée pour la quantification.

21. Système de gène rapporteur pour la voie NF-κB

Afin de suivre l'activation de la voie de signalisation NF-κB, des cellules HEK Blue™ NF-κB (InvivoGen) ont été utilisées. Ces cellules possèdent un gène rapporteur de la phosphatase alcaline sécrétée (SEAP) induit lorsque la voie NF-κB est activée. Les cellules HEK Blue NF-κB sont cultivées en plaque 96 puits (1×10^4 cellules/puits). Après une nuit à 37°C, les cellules sont soit infectées par RRV-LUC (MOI 2) et traitées par les huiles essentielles de citronnelle, géranium et vétiver (co-traitement) ou traitées par TNF-α et les huiles essentielles citronnelle, géranium et vétiver pendant 24 h.

Afin de vérifier que les huiles essentielles de citronnelle, géranium et vétiver n'interagissent pas avec

la phosphatase alcaline, une gamme de concentration de phosphatase alcaline a été réalisée à laquelle on ajoute la citronnelle, le géranium et le vétiver à une concentration CC_{10}.

L'activité extracellulaire de la phosphatase alcaline est ensuite mesurée au spectrophotomètre Tecan Sunrise™ à l'aide du réactif Quanti-blue (InvivoGen) selon les recommandations du fournisseur.

22. Analyse statistique

Les valeurs sont exprimées comme moyenne erreur standard à la moyenne (SEM) d'au moins trois expériences indépendantes. Les valeurs de CC_{50} et CC_{10} sont déterminées par une courbe dose-réponse et sont déterminées graphiquement en utilisant le logiciel GraphPad Prism.

Bibliographie

Aarthi, N., Murugan, K., 2012. Effect of Vetiveria zizanioides L. Root extracts on the malarial vector, Anopheles stephensi Liston. Asian Pac. J. Trop. Dis. 2, 154–158. doi:10.1016/S2222-1808(12)60035-8

Aarthi, N., Murugan, K., others, 2010. Larvicidal and repellent activity of Vetiveria zizanioides L, Ocimum basilicum Linn and the microbial pesticide spinosad against malarial vector, Anopheles stephensi Liston (Insecta: Diptera: Culicidae). J. Biopestic. 3, 199–204.

Aaskov, J., Williams, L., Yu, S., 1997. A candidate Ross River virus vaccine: preclinical evaluation. Vaccine 15, 1396–1404. doi:10.1016/S0264-410X(97)00051-0

Aaskov, J.G., Ross, P.V., Harper, J.J., Donaldson, M.D., 1985. Isolation of Ross River virus from epidemic polyarthritis patients in Australia. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci 63, 587–597.

Abagli, A.Z., Alavo, T.B.C., Avlessi, F., Moudachirou, M., 2012. Potential of the Bush Mint, Hyptis suaveolens Essential Oil for Personal Protection Against Mosquito Biting. J. Am. Mosq. Control Assoc. 28, 15–19. doi:10.2987/11-6181.1

Abdelnabi, R., Amrun, S.N., Ng, L.F.P., Leyssen, P., Neyts, J., Delang, L., 2017. Protein kinases C as potential host targets for the inhibition of chikungunya virus replication. Antiviral Res. 139, 79–87. doi:10.1016/j.antiviral.2016.12.020

Abdelnabi, R., Neyts, J., Delang, L., 2015. Towards antivirals against chikungunya virus. Antiviral Res. 121, 59–68. doi:10.1016/j.antiviral.2015.06.017

Abiy, E., Gebre-Michael, T., Balkew, M., Medhin, G., 2015. Repellent efficacy of DEET, MyggA, neem (Azedirachta indica) oil and chinaberry (Melia azedarach) oil against Anopheles arabiensis, the principal malaria vector in Ethiopia. Malar. J. 14. doi:10.1186/s12936-015-0705-4

Adams, R.P., 2004. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Allured Pub. Corp., Carol Stream, Ill.

Adams, R.P., Pandey, R.N., Dafforn, M.R., James, S.A., 2003. Vetiver DNA-Fingerprinted Cultivars: Effects of Environment on Growth, Oil Yields and Composition. J. Essent. Oil Res. 15, 363–371. doi:10.1080/10412905.2003.9698612

Adams, T.F., Wongchai, C., Chaidee, A., Pfeiffer, W., 2016. "Singing in the Tube"—audiovisual assay of plant oil repellent activity against mosquitoes (Culex pipiens). Parasitol. Res. 115, 225–239. doi:10.1007/s00436-015-4739-x

Ahola, T., Couderc, T., Ng, L.F.P., Hallengärd, D., Powers, A., Lecuit, M., Esteban, M., Merits, A., Roques, P., Liljeström, P., 2015. Therapeutics and Vaccines Against Chikungunya Virus. Vector-Borne Zoonotic Dis. 15, 250–257. doi:10.1089/vbz.2014.1681

Ahola, T., Pohjala, L., Kaukinen, P., Utt, A., Varjak, M., Merits, A., Tammela, P., 2011. Identification of Alphavirus Inhibitors by Using Virus-Based Assays and a Chikungunya Replicon Cell Line. Antiviral Res. 90, A52–A53. doi:10.1016/j.antiviral.2011.03.094

Aichinger, G., Ehrlich, H.J., Aaskov, J.G., Fritsch, S., Thomasser, C., Draxler, W., Wolzt, M., Müller, M., Pinl, F., Van Damme, P., Hens, A., Levy, J., Portsmouth, D., Holzer, G., Kistner, O., Kreil, T.R., Barrett, P.N., 2011. Safety and immunogenicity of an inactivated whole virus Vero cell-derived Ross River virus vaccine: A randomized trial. Vaccine 29, 9376–9384. doi:10.1016/j.vaccine.2011.09.125

Ajayi, E.O., Sadimenko, A.P., Afolayan, A.J., 2016. GC–MS evaluation of Cymbopogon citratus (DC) Stapf oil obtained using modified hydrodistillation and microwave extraction methods. Food Chem. 209, 262–266. doi:10.1016/j.foodchem.2016.04.071

Albulescu, I.C., van Hoolwerff, M., Wolters, L.A., Bottaro, E., Nastruzzi, C., Yang, S.C., Tsay, S.-C., Hwu, J.R., Snijder, E.J., van Hemert, M.J., 2015. Suramin inhibits chikungunya virus replication through multiple mechanisms. Antiviral Res. 121, 39–46. doi:10.1016/j.antiviral.2015.06.013

Amer, A., Mehlhorn, H., 2006a. Repellency effect of forty-one essential oils against Aedes, Anopheles, and Culex mosquitoes. Parasitol. Res. 99, 478. doi:10.1007/s00436-006-0184-1

Amer, A., Mehlhorn, H., 2006b. The sensilla of Aedes and Anopheles mosquitoes and their importance in repellency. Parasitol. Res. 99, 491–499. doi:10.1007/s00436-006-0185-0

Ansari, M.A., Razdan, R.K., 1994. Repellent action of Cymbopogan martinii martinii Stapf var. sofia oil

against mosquitoes. Indian J. Malariol. 31, 95–102.
Ansari, M.J., Al-Ghamdi, A., Usmani, S., Khan, K.A., Alqarni, A.S., Kaur, M., Al-Waili, N., 2016. In vitro evaluation of the effects of some plant essential oils on Ascosphaera apis, the causative agent of Chalkbrood disease. Saudi J. Biol. Sci. doi:10.1016/j.sjbs.2016.04.016
Aplamedom, 2013. Zerbaz Péi - Pratique et utilisation des tisanes à l'île de la Réunion. Azalées éditions.
Assi, M., Thon-Hon, V.G., Jaffar-Bandjee, M.-C., Martinez, A., Gasque, P., 2015. Regulation of type I-interferon responses in the human epidermal melanocyte cell line SKMEL infected by the Ross River alphavirus. Cytokine 76, 572–576. doi:10.1016/j.cyto.2015.07.003
Assunção-Miranda, I., Cruz-Oliveira, C., Poian, A.T.D., 2013. Molecular Mechanisms Involved in the Pathogenesis of Alphavirus-Induced Arthritis. BioMed Res. Int. 2013. doi:10.1155/2013/973516
Astani, A., Reichling, J., Schnitzler, P., 2011. Screening for Antiviral Activities of Isolated Compounds from Essential Oils. Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2011, enep187. doi:10.1093/ecam/nep187
Astani, A., Reichling, J., Schnitzler, P., 2010. Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. Phytother. Res. PTR 24, 673–679. doi:10.1002/ptr.2955
Astani, A., Schnitzler, P., 2014. Antiviral activity of monoterpenes beta-pinene and limonene against herpes simplex virus in vitro. Iran. J. Microbiol. 6, 149–155.
Aubry, M., Finke, J., Teissier, A., Roche, C., Broult, J., Paulous, S., Desprès, P., Cao-Lormeau, V.-M., Musso, D., 2015. Silent Circulation of Ross River Virus in French Polynesia. Int. J. Infect. Dis. 37, 19–24. doi:10.1016/j.ijid.2015.06.005
Auysawasdi, N., Chuntranuluck, S., Phasomkusolsil, S., Keeratinijakal, V., 2016. Improving the effectiveness of three essential oils against Aedes aegypti (Linn.) and Anopheles dirus (Peyton and Harrison). Parasitol. Res. 115, 99–106. doi:10.1007/s00436-015-4725-3
Avoseh, O., Oyedeji, O., Rungqu, P., Nkeh-Chungag, B., Oyedeji, A., 2015. Cymbopogon Species; Ethnopharmacology, Phytochemistry and the Pharmacological Importance. Molecules 20, 7438–7453. doi:10.3390/molecules20057438
Bahnemann, H.G., 1990. Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine. Vaccine 8, 299–303. doi:10.1016/0264-410X(90)90083-X
Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. Food Chem. Toxicol. 46, 446–475. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106
Bala Murugan, S., Sathishkumar, R., 2016. Chikungunya infection: A potential re-emerging global threat. Asian Pac. J. Trop. Med. 9, 933–937. doi:10.1016/j.apjtm.2016.07.020
Bansod, S., Rai, M., 2008. Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic Aspergillus fumigatus and A. niger. World J. Med. Sci. 3, 81–88.
Baranauskienė, R., Rutkaitė, R., Pečiulytė, L., Kazernavičiūtė, R., Venskutonis, P.R., 2016. Preparation and characterization of single and dual propylene oxide and octenyl succinic anhydride modified starch carriers for the microencapsulation of essential oils. Food Funct. 7, 3555–3565. doi:10.1039/c6fo00775a
Barber, B., Denholm, J.T., Spelman, D., 2009. Ross River virus. Aust. Fam. Physician 38, 586–589.
Barnard, D.R., 2005. BIOLOGICAL ASSAY METHODS FOR MOSQUITO REPELLENTS. J. Am. Mosq. Control Assoc. 21, 12–16. doi:10.2987/8756-971X(2005)21[12:BAMFMR]2.0.CO;2
Barraza, S.J., Delekta, P.C., Sindac, J.A., Dobry, C.J., Xiang, J., Keep, R.F., Miller, D.J., Larsen, S.D., 2015. Discovery of anthranilamides as a novel class of inhibitors of neurotropic alphavirus replication. Bioorg. Med. Chem. 23, 1569–1587. doi:10.1016/j.bmc.2015.01.054
Barton, A.J., Bielefeldt-Ohmann, H., 2017. Clinical presentation, progression and management of 5 cases of Ross River virus infection in performance horses located in southeast Queensland: A longitudinal case series. J. Equine Vet. Sci. doi:10.1016/j.jevs.2016.12.010
Bassetto, M., De Burghgraeve, T., Delang, L., Massarotti, A., Coluccia, A., Zonta, N., Gatti, V., Colombano,

G., Sorba, G., Silvestri, R., Tron, G.C., Neyts, J., Leyssen, P., Brancale, A., 2013. Computer-aided identification, design and synthesis of a novel series of compounds with selective antiviral activity against chikungunya virus. Antiviral Res. 98, 12–18. doi:10.1016/j.antiviral.2013.01.002

Benelli, G., Pavela, R., Canale, A., Cianfaglione, K., Ciaschetti, G., Conti, F., Nicoletti, M., Senthil-Nathan, S., Mehlhorn, H., Maggi, F., 2017. Acute larvicidal toxicity of five essential oils (Pinus nigra, Hyssopus officinalis, Satureja montana, Aloysia citrodora and Pelargonium graveolens) against the filariasis vector Culex quinquefasciatus: Synergistic and antagonistic effects. Parasitol. Int. doi:10.1016/j.parint.2017.01.012

Bernard, E., Hamel, R., Neyret, A., Ekchariyawat, P., Molès, J.-P., Simmons, G., Chazal, N., Desprès, P., Missé, D., Briant, L., 2015. Human keratinocytes restrict chikungunya virus replication at a post-fusion step. Virology 476, 1–10. doi:10.1016/j.virol.2014.11.013

Blackburn, N.K., Besselaar, T.G., 1991. A study of the effect of chemical inactivants on the epitopes of Rift Valley fever virus glycoproteins using monoclonal antibodies. J. Virol. Methods 33, 367–374. doi:10.1016/0166-0934(91)90036-Y

Blanco, M.M., Costa, C.A.R.A., Freire, A.O., Santos, J.G., Costa, M., 2009. Neurobehavioral effect of essential oil of Cymbopogon citratus in mice. Phytomedicine 16, 265–270. doi:10.1016/j.phymed.2007.04.007

Bohbot, J.D., Fu, L., Le, T.C., Chauhan, K.R., Cantrell, C.L., Dickens, J.C., 2011. Multiple activities of insect repellents on odorant receptors in mosquitoes. Med. Vet. Entomol. 25, 436–444. doi:10.1111/j.1365-2915.2011.00949.x

Bossou, A.D., Mangelinckx, S., Yedomonhan, H., Boko, P.M., Akogbeto, M.C., De Kimpe, N., Avlessi, F., Sohounhloue, D.C.K., 2013. Chemical composition and insecticidal activity of plant essential oils from Benin against Anopheles gambiae (Giles). Parasit. Vectors 6, 337. doi:10.1186/1756-3305-6-337

Boukhatem, M.N., Ferhat, M.A., Kameli, A., Saidi, F., Kebir, H.T., 2014. Lemon grass (Cymbopogon citratus) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. Libyan J. Med. 9. doi:10.3402/ljm.v9.25431

Boukhatem, M.N., Kameli, A., Ferhat, M.A., Saidi, F., Mekarnia, M., 2013a. Rose geranium essential oil as a source of new and safe anti-inflammatory drugs. Libyan J. Med. 8. doi:10.3402/ljm.v8i0.22520

Boukhatem, M.N., Kameli, A., Saidi, F., 2013b. Essential oil of Algerian rose-scented geranium (Pelargonium graveolens): Chemical composition and antimicrobial activity against food spoilage pathogens. Food Control 34, 208–213. doi:10.1016/j.foodcont.2013.03.045

Boukhris, M., Hadrich, F., Chtourou, H., Dhouib, A., Bouaziz, M., Sayadi, S., 2015. Chemical composition, biological activities and DNA damage protective effect of Pelargonium graveolens L'Hér. essential oils at different phenological stages. Ind. Crops Prod. 74, 600–606. doi:10.1016/j.indcrop.2015.05.051

Boukhris, M., Simmonds, M.S.J., Sayadi, S., Bouaziz, M., 2013. Chemical Composition and Biological Activities of Polar Extracts and Essential Oil of Rose-scented Geranium, Pelargonium graveolens. Phytother. Res. 27, 1206–1213. doi:10.1002/ptr.4853

Braks, M.A.H., Takken, W., 1999. Incubated Human Sweat but not Fresh Sweat Attracts the Malaria Mosquito Anopheles gambiae sensu stricto. J. Chem. Ecol. 25, 663–672. doi:10.1023/A:1020970307748

Briolant, S., Garin, D., Scaramozzino, N., Jouan, A., Crance, J.M., 2004. In vitro inhibition of Chikungunya and Semliki Forest viruses replication by antiviral compounds: synergistic effect of interferon-α and ribavirin combination. Antiviral Res. 61, 111–117. doi:10.1016/j.antiviral.2003.09.005

Brown, M., Hebert, A.A., 1997. Insect repellents: an overview. J. Am. Acad. Dermatol. 36, 243–249.

Byler, K.G., Collins, J.T., Ogungbe, I.V., Setzer, W.N., 2016. Alphavirus protease inhibitors from natural sources: A homology modeling and molecular docking investigation. Comput. Biol. Chem. 64, 163–184. doi:10.1016/j.compbiolchem.2016.06.005

Cal, K., Sznitowska, M., 2003. Cutaneous absorption and elimination of three acyclic terpenes—in vitro

studies. J. Controlled Release 93, 369–376. doi:10.1016/j.jconrel.2003.09.002
Campbell, N., Reece, J., 2007. Biologie (7ème édition). Pearson Education France.
Carbajal, D., Casaco, A., Arruzazabala, L., Gonzalez, R., Tolon, Z., 1989. Pharmacological study of< i> Cymbopogon citratus</i> leaves. J. Ethnopharmacol. 25, 103–107.
Caumes, E., Camus, D., 2015. Recommandations sanitaires pour les voyageurs, 2015//Health recommendations for travellers, 2015. Bulletin épidémiologique hebdomadaire.
Ćavar, S., Maksimović, M., 2012. Antioxidant activity of essential oil and aqueous extract of Pelargonium graveolens L'Her. Food Control 23, 263–267. doi:10.1016/j.foodcont.2011.07.031
Chahal, K.K., Bhardwaj, U., Kaushal, S., Sandhu, A.K., 2015. Chemical composition and biological properties of Chrysopogon zizanioides (L.) Roberty syn. Vetiveria zizanioides (L.) Nash- A Review. Indian J. Nat. Prod. Resour. IJNPR Former. Nat. Prod. Radiance NPR 6, 251–260.
Champagnat, P., Figueredo, G., Chalchat, J.-C., Carnat, A.-P., Bessière, J.-M., 2006. A Study on the Composition of Commercial Vetiveria zizanioides Oils from Different Geographical Origins. J. Essent. Oil Res. 18, 416–422. doi:10.1080/10412905.2006.9699129
Chauhan, A., Verma, R.S., 2010. Cultivation potential of three rose-scented Geranium (Pelargonium graveolens) cultivars in the Kumaon Region of Western Himalayas. Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology 4, 77–79.
Chopra, A., Saluja, M., Venugopalan, A., 2014. Effectiveness of Chloroquine and Inflammatory Cytokine Response in Patients With Early Persistent Musculoskeletal Pain and Arthritis Following Chikungunya Virus Infection. Arthritis Rheumatol. 66, 319–326. doi:10.1002/art.38221
Chou, S.-T., Lai, C.-P., Lin, C.-C., Shih, Y., 2012. Study of the chemical composition, antioxidant activity and anti-inflammatory activity of essential oil from Vetiveria zizanioides. Food Chem. 134, 262–268. doi:10.1016/j.foodchem.2012.02.131
Choumet, V., Attout, T., Chartier, L., Khun, H., Sautereau, J., Robbe-Vincent, A., Brey, P., Huerre, M., Bain, O., 2012. Visualizing Non Infectious and Infectious Anopheles gambiae Blood Feedings in Naive and Saliva-Immunized Mice. PLOS ONE 7, e50464. doi:10.1371/journal.pone.0050464
Ciapetti, G., Granchi, D., Verri, E., Savarino, L., Stea, S., Savioli, F., Gori, A., Pizzoferrato, A., 1998. False positive results in cytotoxicity testing due to unexpectedly volatile compounds. J. Biomed. Mater. Res. 39, 286–291.
Claflin, S.B., Webb, C.E., 2015. Ross River Virus: Many Vectors and Unusual Hosts Make for an Unpredictable Pathogen. PLoS Pathog 11, e1005070. doi:10.1371/journal.ppat.1005070
Condon, R.J., Rouse, I.L., 1995. Acute symptoms and sequelae of Ross River virus infection in South-Western Australia: A follow-up study. Clin. Diagn. Virol. 3, 273–284. doi:10.1016/S0928-0197(94)00043-3
Conti, B., Benelli, G., Flamini, G., Cioni, P.L., Profeti, R., Ceccarini, L., Macchia, M., Canale, A., 2012. Larvicidal and repellent activity of Hyptis suaveolens (Lamiaceae) essential oil against the mosquito Aedes albopictus Skuse (Diptera: Culicidae). Parasitol. Res. 110, 2013–2021. doi:10.1007/s00436-011-2730-8
Corbel, V., Stankiewicz, M., Pennetier, C., Fournier, D., Stojan, J., Girard, E., Dimitrov, M., Molgó, J., Hougard, J.-M., Lapied, B., 2009. Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent deet. BMC Biol. 7, 47. doi:10.1186/1741-7007-7-47
Cox, M.A., Kahan, S.M., Zajac, A.J., 2013. Anti-viral CD8 T cells and the cytokines that they love. Virology, 2013 Reviews Issue 435, 157–169. doi:10.1016/j.virol.2012.09.012
Croft, A.M., 2010. Malaria: prevention in travellers. BMJ Clin. Evid. 2010.
Dagupen, M.K.T., Tagarino, D., Januszewska, R., Lino, L.L., Viaene, J., Arguelles, R., Bautista, R., 2009. Consumer Behavior Towards Lemongrass (Cymbopogon citratus) Tea in Benguet Province, Northern Philippines. BANWA Arch. 2004-2013 6, 1–12.
Dampc, A., Luczkiewicz, M., 2013. Rhododendron tomentosum (Ledum palustre). A review of traditional use based on current research. Fitoterapia 85, 130–143. doi:10.1016/j.fitote.2013.01.013

Das, N.G., Baruah, I., Talukdar, P.K., Das, S.C., 2003. Evaluation of botanicals as repellents against mosquitoes. J. Vector Borne Dis. 40, 49–53.

Das, N.G., Dhiman, S., Talukdar, P.K., Rabha, B., Goswami, D., Veer, V., 2015. Synergistic mosquito-repellent activity of Curcuma longa, Pogostemon heyneanus and Zanthoxylum limonella essential oils. J. Infect. Public Health 8, 323–328. doi:10.1016/j.jiph.2015.02.005

Debboun, M., Frances, S.P., Strickman, D., 2006. Insect repellents: principles, methods, and uses. CRC Press.

Delang, L., Segura Guerrero, N., Tas, A., Querat, G., Pastorino, B., Froeyen, M., Dallmeier, K., Jochmans, D., Herdewijn, P., Bello, F., Snijder, E.J., de Lamballerie, X., Martina, B., Neyts, J., van Hemert, M.J., Leyssen, P., 2014. Mutations in the chikungunya virus non-structural proteins cause resistance to favipiravir (T-705), a broad-spectrum antiviral. J. Antimicrob. Chemother. doi:10.1093/jac/dku209

Dell, I.T., 2009. Composition containing p-menthane-3, 8-diol and its use as insect repellent.

Delogu, I., Pastorino, B., Baronti, C., Nougairède, A., Bonnet, E., de Lamballerie, X., 2011. In vitro antiviral activity of arbidol against Chikungunya virus and characteristics of a selected resistant mutant. Antiviral Res. 90, 99–107. doi:10.1016/j.antiviral.2011.03.182

Dhama, K., Kapoor, S., Pawaiya, R.V.S., Chakraborty, S., Tiwari, R., Verma, A.K., 2014. Ross River Virus (RRV) infection in horses and humans: a review. Pak. J. Biol. Sci. PJBS 17, 768–779.

Dickens, J.C., Bohbot, J.D., 2013. Mini review: Mode of action of mosquito repellents. Pestic. Biochem. Physiol. 106, 149–155. doi:10.1016/j.pestbp.2013.02.006

Ditzen, M., Pellegrino, M., Vosshall, L.B., 2008. Insect odorant receptors are molecular targets of the insect repellent DEET. Science 319, 1838–1842.

Doherty, R.L., Standfast, H.A., Domrow, R., Wetters, E.J., Whitehead, R.H., Carley, J.G., 1971. Studies of the epidemiology of arthropod-borne virus infections at Mitchell River Mission, Cape York Peninsula, North Queensland. IV. Arbovirus infections of mosquitoes and mammals, 1967-1969. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 65, 504–513.

Doherty, R.L., Whitehead, R.H., Gorman, B.M., O'Gower, A.K., 1963. The Isolation of a Third Group A Arbovirus in Australia, with Preliminary Observations on its Relationship to Epidemic Polyarthritis. Australian J. Sci. 26, 183–184.

Dorman, H.J.D., Deans, S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol. 88, 308–316. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x

Dua, V.K., Gupta, N.C., Pandey, A.C., Sharma, V.P., 1996. Repellency of Lantana camara (Verbenaceae) flowers against Aedes mosquitoes. J. Am. Mosq. Control Assoc. 12, 406–408.

Dupuis-Maguiraga, L., Brun, S., Noret, M., Gras, G., Roques, P., 2011. Physiopathologie du chikungunya : les marqueurs de l'infection de la phase aigüe à l'atteinte chronique. Virologie 15, 251–268. doi:10.1684/vir.2011.0412

Dutertre, J.M.-J., 2011. Enquête prospective au sein de la population consultant dans les cabinets de médecine générale sur l'île de la Réunion : à propos des plantes médicinales, utilisation, effets, innocuité et lien avec le médecin généraliste. Université Bordeaux 2.

Dzamic, Sokovic, Ristic, Grujic, Mileski, Marin, 2013. Chemical composition, antifungal and antioxidant activity of Pelargonium graveolens essential oil. J. Appl. Pharm. Sci. doi:10.7324/JAPS.2014.40301

Ehteshami, M., Tao, S., Zandi, K., Hsiao, H.-M., Jiang, Y., Hammond, E., Amblard, F., Russell, O.O., Merits, A., Schinazi, R.F., 2017. Characterization of β-D-N4-hydroxycytidine as a Novel Inhibitor of Chikungunya Virus. Antimicrob. Agents Chemother. AAC.02395-16. doi:10.1128/AAC.02395-16

Ekpenyong, C.E., Akpan, E., Nyoh, A., 2015. Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of Cymbopogon citratus (DC.) Stapf extracts. Chin. J. Nat. Med. 13, 321–337. doi:10.1016/S1875-5364(15)30023-6

Elmann, A., Mordechay, S., Rindner, M., Ravid, U., 2010. Anti-neuroinflammatory effects of geranium oil in microglial cells. J. Funct. Foods 2, 17–22. doi:10.1016/j.jff.2009.12.001

Erler, F., Ulug, I., Yalcinkaya, B., 2006. Repellent activity of five essential oils against Culex pipiens.

Fitoterapia 77, 491–494. doi:10.1016/j.fitote.2006.05.028
Essid, R., Rahali, F.Z., Msaada, K., Sghair, I., Hammami, M., Bouratbine, A., Aoun, K., Limam, F., 2015. Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medicinal plants in Northern Tunisia. Ind. Crops Prod. 77, 795–802. doi:10.1016/j.indcrop.2015.09.049
Fang, F., Candy, K., Melloul, E., Bernigaud, C., Chai, L., Darmon, C., Durand, R., Botterel, F., Chosidow, O., Izri, A., Huang, W., Guillot, J., 2016. In vitro activity of ten essential oils against Sarcoptes scabiei. Parasit. Vectors 9. doi:10.1186/s13071-016-1889-3
Filipov, A., 1994. Medicinal plants of the Pilagá of Central Chaco. J. Ethnopharmacol. 44, 181–193. doi:10.1016/0378-8741(94)01185-0
Filippi, J.-J., Belhassen, E., Baldovini, N., Brevard, H., Meierhenrich, U.J., 2013. Qualitative and quantitative analysis of vetiver essential oils by comprehensive two-dimensional gas chromatography and comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1288, 127–148. doi:10.1016/j.chroma.2013.03.002
Flamini, G., Smaili, T., Zellagui, A., Gherraf, N., Cioni, P.L., 2013. Effect of growth stage on essential-oil yield and composition of Daucus sahariensis. Chem. Biodivers. 10, 2014–2020. doi:10.1002/cbdv.201300052
Foster, B.C., Arnason, J.T., Briggs, C.J., 2005. Natural Health Products and Drug Disposition. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 45, 203–226. doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095950
Fradin, M.S., Day, J.F., 2002. Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. N. Engl. J. Med. 347, 13–18.
Francisco, V., Costa, G., Figueirinha, A., Marques, C., Pereira, P., Miguel Neves, B., Celeste Lopes, M., García-Rodríguez, C., Teresa Cruz, M., Teresa Batista, M., 2013. Anti-inflammatory activity of Cymbopogon citratus leaves infusion via proteasome and nuclear factor-κB pathway inhibition: Contribution of chlorogenic acid. J. Ethnopharmacol. 148, 126–134. doi:10.1016/j.jep.2013.03.077
Francisco, V., Figueirinha, A., Neves, B.M., García-Rodríguez, C., Lopes, M.C., Cruz, M.T., Batista, M.T., 2011. Cymbopogon citratus as source of new and safe anti-inflammatory drugs: Bio-guided assay using lipopolysaccharide-stimulated macrophages. J. Ethnopharmacol. 133, 818–827. doi:10.1016/j.jep.2010.11.018
Franz, A.R., Knaak, N., Fiuza, L.M., 2011. Toxic effects of essential plant oils in adult Sitophilus oryzae (Linnaeus) (Coleoptera, Curculionidae). Rev. Bras. Entomol. 55, 116–120. doi:10.1590/S0085-56262011000100018
Frosch, P.J., Johansen, J.D., Menne, T., Pirker, C., Rastogi, S.C., Andersen, K.E., Bruze, M., Goossens, A., Lepoittevin, J.P., White, I.R., 2002. Further important sensitizers in patients sensitive to fragrances. Contact Dermatitis 47, 279–287.
Gañán, N., Brignole, E.A., 2013. Supercritical carbon dioxide fractionation of T. minuta and S. officinalis essential oils: Experiments and process analysis. J. Supercrit. Fluids 78, 12–20. doi:10.1016/j.supflu.2013.03.019
Gillij, Y.G., Gleiser, R.M., Zygadlo, J.A., 2008. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. Bioresour. Technol. 99, 2507–2515. doi:10.1016/j.biortech.2007.04.066
Gilling, D.H., Kitajima, M., Torrey, J.R., Bright, K.R., 2014. Mechanisms of Antiviral Action of Plant Antimicrobials against Murine Norovirus. Appl. Environ. Microbiol. 80, 4898. doi:10.1128/AEM.00402-14
Hadis, M., Lulu, M., Mekonnen, Y., Asfaw, T., 2003. Field trials on the repellent activity of four plant products against mainlyMansonia population in western Ethiopia. Phytother. Res. 17, 202–205. doi:10.1002/ptr.1051
Harker, J.A., Lewis, G.M., Mack, L., Zuniga, E.I., 2011. Late Interleukin-6 escalates T follicular helper cell responses and controls a chronic viral infection. Science 334, 825–829. doi:10.1126/science.1208421
Harley, D., Bossingham, D., Purdie, D.M., Pandeya, N., Sleigh, A.C., 2002. Ross River virus disease in

tropical Queensland: evolution of rheumatic manifestations in an inception cohort followed for six months. Med. J. Aust. 177.

Harley, D., Sleigh, A., Ritchie, S., 2001. Ross River Virus Transmission, Infection, and Disease: a Cross-Disciplinary Review. Clin. Microbiol. Rev. 14, 909–932. doi:10.1128/CMR.14.4.909-932.2001

Hayes, A.J., Markovic, B., 2003. Toxicity of Australian essential oil Backhousia citriodora (lemon myrtle). Part 2. Absorption and histopathology following application to human skin. Food Chem. Toxicol. 41, 1409–1416. doi:10.1016/S0278-6915(03)00159-5

Henrik Gad, H., Paulous, S., Belarbi, E., Diancourt, L., Drosten, C., Kümmerer, B.M., Plate, A.E., Caro, V., Desprès, P., 2012. The E2-E166K substitution restores Chikungunya virus growth in OAS3 expressing cells by acting on viral entry. Virology 434, 27–37. doi:10.1016/j.virol.2012.07.019

Herrero, L.J., Nelson, M., Srikiatkhachorn, A., Gu, R., Anantapreecha, S., Fingerle-Rowson, G., Bucala, R., Morand, E., Santos, L.L., Mahalingam, S., 2011. Critical role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in Ross River virus-induced arthritis and myositis. Proc. Natl. Acad. Sci. 108, 12048–12053. doi:10.1073/pnas.1101089108

Holzer, G.W., Coulibaly, S., Aichinger, G., Savidis-Dacho, H., Mayrhofer, J., Brunner, S., Schmid, K., Kistner, O., Aaskov, J.G., Falkner, F.G., Ehrlich, H., Barrett, P.N., Kreil, T.R., 2011. Evaluation of an inactivated Ross River virus vaccine in active and passive mouse immunization models and establishment of a correlate of protection. Vaccine 29, 4132–4141. doi:10.1016/j.vaccine.2011.03.089

Hwang, Y.S., Wu, K.H., Kumamoto, J., Axelrod, H., Mulla, M.S., 1985. Isolation and identification of mosquito repellents inArtemisia vulgaris. J. Chem. Ecol. 11, 1297–1306. doi:10.1007/BF01024117

Hwu, J.R., Kapoor, M., Tsay, S.-C., Lin, C.-C., Hwang, K.C., Horng, J.-C., Chen, I.-C., Shieh, F.-K., Leyssen, P., Neyts, J., 2015. Benzouracil–coumarin–arene conjugates as inhibiting agents for chikungunya virus. Antiviral Res. 118, 103–109. doi:10.1016/j.antiviral.2015.03.013

Index de la flore [WWW Document], 2017. URL http://mascarine.cbnm.org/index.php/flore/index-de-la-flore/nom?code_taxref=632480 (accessed 1.11.17).

I.S. Akande, T.A. Samuel, U. Agbazue, B.L. Olowolagba, 2011. Comparative proximate analysis of ethanolic and water extracts of Cymbopogon citratus (Lemon grass) and four tea brands. Plant Sciences Research 3, 29–35.

Isman, M.B., 2006. Botanical Insecticides, Deterrents, and Repellents in Modern Agriculture and an Increasingly Regulated World. Annu. Rev. Entomol. 51, 45–66. doi:10.1146/annurev.ento.51.110104.151146

Ives, A.R., Paskewitz, S.M., 2005. Testing vitamin b as a home remedy against mosquitoes. J. Am. Mosq. Control Assoc. 21, 213–217. doi:10.2987/8756-971X(2005)21[213:TVBAAH]2.0.CO;2

Jadav, S.S., Sinha, B.N., Hilgenfeld, R., Pastorino, B., de Lamballerie, X., Jayaprakash, V., 2015. Thiazolidone derivatives as inhibitors of chikungunya virus. Eur. J. Med. Chem. 89, 172–178. doi:10.1016/j.ejmech.2014.10.042

Jaenson, T.G.T., Garboui, S., Pålsson, K., 2006a. Repellency of Oils of Lemon Eucalyptus, Geranium, and Lavender and the Mosquito Repellent MyggA Natural to Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae) in the Laboratory and Field. J. Med. Entomol. 43, 731–736. doi:10.1093/jmedent/43.4.731

Jaenson, T.G.T., Pålsson, K., Borg-Karlson, A.-K., 2006b. Evaluation of Extracts and Oils of Mosquito (Diptera: Culicidae) Repellent Plants from Sweden and Guinea-Bissau. J. Med. Entomol. 43, 113–119. doi:10.1093/jmedent/43.1.113

Jassim, S. a. A., Naji, M.A., 2003. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. J. Appl. Microbiol. 95, 412–427.

Jiang, H., Wang, J., Song, L., Cao, X., Yao, X., Tang, F., Yue, Y., 2016. GC×GC-TOFMS Analysis of Essential Oils Composition from Leaves, Twigs and Seeds of Cinnamomum camphora L. Presl and Their Insecticidal and Repellent Activities. Molecules 21, 423. doi:10.3390/molecules21040423

Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., Daszak, P., 2008. Global trends in emerging infectious diseases. Nature 451, 990–993. doi:10.1038/nature06536

Jordana, M., Särnstrand, B., Sime, P.J., Ramis, I., 1994. Immune-inflammatory functions of fibroblasts. Eur. Respir. J. 7, 2212–2222. doi:10.1183/09031936.94.07122212

Journal officiel de l'Union européenne, 2012. Règlement (UE) n°528/2012 du parlement européen et du conseil.

Kamaraj, C., Rahuman, A.A., Bagavan, A., Elango, G., Zahir, A.A., Santhoshkumar, T., 2011. Larvicidal and repellent activity of medicinal plant extracts from Eastern Ghats of South India against malaria and filariasis vectors. Asian Pac. J. Trop. Med. 4, 698–705. doi:10.1016/S1995-7645(11)60177-6

Katz, T.M., Miller, J.H., Hebert, A.A., 2008. Insect repellents: Historical perspectives and new developments. J. Am. Acad. Dermatol. 58, 865–871. doi:10.1016/j.jaad.2007.10.005

Kaur, P., Chu, J.J.H., 2013. Chikungunya virus: an update on antiviral development and challenges. Drug Discov. Today 18, 969–983. doi:10.1016/j.drudis.2013.05.002

Kawai, T., Akira, S., 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nat. Immunol. 11, 373–384. doi:10.1038/ni.1863

Keil, D.E., McGuinn, W.D., Dudley, A.C., EuDaly, J.G., Gilkeson, G.S., Peden-Adams, M.M., 2009. N, N,-diethyl-m-toluamide (DEET) suppresses humoral immunological function in B6C3F1 mice. Toxicol. Sci. kfp001.

Keswani, R.K., Bellare, J.R., 2006. A Review of Mosquito Attraction Studies: Important Parameters and Techniques. Research Journal of Parasitology 1, 31–41. doi:10.3923/jp.2006.31.41

Khan, M., Santhosh, S. r., Tiwari, M., Lakshmana Rao, P. v., Parida, M., 2010. Assessment of in vitro prophylactic and therapeutic efficacy of chloroquine against chikungunya virus in vero cells. J. Med. Virol. 82, 817–824. doi:10.1002/jmv.21663

Kistner, O., Barrett, N., Brühmann, A., Reiter, M., Mundt, W., Savidis-Dacho, H., Schober-Bendixen, S., Dorner, F., Aaskov, J., 2007. The preclinical testing of a formaldehyde inactivated Ross River virus vaccine designed for use in humans. Vaccine 25, 4845–4852. doi:10.1016/j.vaccine.2007.01.103

Klapsing, P., MacLean, J.D., Glaze, S., McClean, K.L., Drebot, M.A., Lanciotti, R.S., Campbell, G.L., 2005. Ross River virus disease reemergence, Fiji, 2003-2004. Emerg. Infect. Dis. 11, 613–615. doi:10.3201/eid1104.041070

Klauck, V., Pazinato, R., Stefani, L.M., Santos, R.C., Vaucher, R.A., Baldissera, M.D., Raffin, R., Boligon, A., Athayde, M., Baretta, D., others, 2014. Insecticidal and repellent effects of tea tree and andiroba oils on flies associated with livestock. Med. Vet. Entomol. 28, 33–39.

Knols, B.G., 1996. On human odour, malaria mosquitoes, and Limburger cheese. The Lancet 348, 1322. doi:10.1016/S0140-6736(05)65812-6

Knope, K.E., Muller, M., Kurucz, N., Doggett, S.L., Feldman, R., Johansen, C.A., Hobby, M., Bennett, S., Lynch, S., Sly, A., Currie, B.J., National Arbovirus and Malaria Advisory Committee, 2016. Arboviral diseases and malaria in Australia, 2013-14: Annual report of the National Arbovirus and Malaria Advisory Committee. Commun. Dis. Intell. Q. Rep. 40, E401–E436.

Koba, K., Sanda, K., Guyon, C., Raynaud, C., Chaumont, J.-P., Nicod, L., 2008. In vitro cytotoxic activity of Cymbopogon citratus L. and Cymbopogon nardus L. essential oils from Togo. Bangladesh J. Pharmacol. 4. doi:10.3329/bjp.v4i1.1040

Kohlert, C., Rensen, I. van, März, R., Schindler, G., Graefe, E.U., Veit, M., 2000. Bioavailability and Pharmacokinetics of Natural Volatile Terpenes in Animals and Humans. Planta Med. 66, 495–505. doi:10.1055/s-2000-8616

Kpoviessi, S., Bero, J., Agbani, P., Gbaguidi, F., Kpadonou-Kpoviessi, B., Sinsin, B., Accrombessi, G., Frédérich, M., Moudachirou, M., Quetin-Leclercq, J., 2014. Chemical composition, cytotoxicity and in vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four Cymbopogon species from Benin. J. Ethnopharmacol. 151, 652–659. doi:10.1016/j.jep.2013.11.027

Krejbich-Trotot, P., Belarbi, E., Ralambondrainy, M., El-Kalamouni, C., Viranaicken, W., Roques, P., Desprès, P., Gadea, G., 2016. The growth of arthralgic Ross River virus is restricted in human

monocytic cells. Virus Res. 225, 64–68. doi:10.1016/j.virusres.2016.09.007
Kulkarni, R.N., Baskaran, K., Ramesh, S., Kumar, S., 1997. Intra-clonal variation for essential oil content and composition in plants derived from leaf cuttings of rose-scented geranium (Pelargonium sp.). Ind. Crops Prod. 6, 107–112. doi:10.1016/S0926-6690(96)00169-0
Kuo, S.-C., Wang, Y.-M., Ho, Y.-J., Chang, T.-Y., Lai, Z.-Z., Tsui, P.-Y., Wu, T.-Y., Lin, C.-C., 2016. Suramin treatment reduces chikungunya pathogenesis in mice. Antiviral Res. 134, 89–96. doi:10.1016/j.antiviral.2016.07.025
Kweka, E.J., Mosha, F., Lowassa, A., Mahande, A.M., Kitau, J., Matowo, J., Mahande, M.J., Massenga, C.P., Tenu, F., Feston, E., Lyatuu, E.E., Mboya, M.A., Mndeme, R., Chuwa, G., Temu, E.A., 2008. Ethnobotanical study of some of mosquito repellent plants in north-eastern Tanzania. Malar. J. 7, 152. doi:10.1186/1475-2875-7-152
Lalko, J., Api, A.M., 2006. Investigation of the dermal sensitization potential of various essential oils in the local lymph node assay. Food Chem. Toxicol. 44, 739–746. doi:10.1016/j.fct.2005.10.006
Lamballerie, X.D., Boisson, V., Reynier, J.-C., Enault, S., Charrel, R.N., Flahault, A., Roques, P., Grand, R.L., 2008. On Chikungunya Acute Infection and Chloroquine Treatment. Vector-Borne Zoonotic Dis. 8, 837–840. doi:10.1089/vbz.2008.0049
Lani, R., Hassandarvish, P., Chiam, C.W., Moghaddam, E., Chu, J.J.H., Rausalu, K., Merits, A., Higgs, S., Vanlandingham, D., Abu Bakar, S., Zandi, K., 2015. Antiviral activity of silymarin against chikungunya virus. Sci. Rep. 5, 11421. doi:10.1038/srep11421
Lani, R., Hassandarvish, P., Shu, M.-H., Phoon, W.H., Chu, J.J.H., Higgs, S., Vanlandingham, D., Abu Bakar, S., Zandi, K., 2016. Antiviral activity of selected flavonoids against Chikungunya virus. Antiviral Res. 133, 50–61. doi:10.1016/j.antiviral.2016.07.009
Lavergne, R., 2004. Les plantes médicinales réunionnaises d'aujourd'hui. Orphie.
Lavergne, R., Véra, R., 1989. Étude ethnobotanique des plantes utilisées dans la pharmacopée traditionnelle à La Réunion, Médecine traditionnelle et pharmacopée. Agence de coopération culturelle et technique.
Lawrence, B.M., 2009. A Preliminary Report on the World Production of Some Selected Essential Oils and Countries. Skin Inc 34.
Leal, W.S., 2014. The enigmatic reception of DEET – the gold standard of insect repellents. Curr. Opin. Insect Sci. 6, 93–98. doi:10.1016/j.cois.2014.10.007
Leal, W.S., Uchida, K., 1998. Application of GC-EAD to the Determination of Mosquito Repellents Derived from a Plant, Cymbopogon citratus. J. Asia-Pac. Entomol. 1, 217–221. doi:10.1016/S1226-8615(08)60022-9
Lee, H.J., Jeong, H.S., Kim, D.J., Noh, Y.H., Yuk, D.Y., Hong, J.T., 2008. Inhibitory effect of citral on NO production by suppression of iNOS expression and NF-κB activation in RAW264.7 cells. Arch. Pharm. Res. 31, 342–349. doi:10.1007/s12272-001-1162-0
Leite, J., De Lourdes V. Seabra, M., Maluf, E., Assolant, K., Suchecki, D., Tufik, S., Klepacz, S., Calil, H.M., Carlini, E.A., 1986. Pharmacology of lemongrass (Cymbopogon citratus Stapf). III. Assessment of eventual toxic, hypnotic and anxiolytic effects on humans. J. Ethnopharmacol. 17, 75–83. doi:10.1016/0378-8741(86)90074-7
Libermann, T.A., Baltimore, D., 1990. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. Mol. Cell. Biol. 10, 2327–2334.
Lin, P.-C., Lee, J.J., Chang, I.-J., 2016. Essential oils from Taiwan: Chemical composition and antibacterial activity against Escherichia coli. J. Food Drug Anal. 24, 464–470. doi:10.1016/j.jfda.2015.12.006
Lindsay, S., Ansell, J., Selman, C., Cox, V., Hamilton, K., Walraven, G., 2000. Effect of pregnancy on exposure to malaria mosquitoes. The Lancet 355, 1972. doi:10.1016/S0140-6736(00)02334-5
Lu, Y., Zhu, W.-Y., Tan, C., Yu, G.-H., Gu, J.-X., 2002. Melanocytes are Potential Immunocompetent Cells: Evidence from Recognition of Immunological Characteristics of Cultured Human Melanocytes. Pigment Cell Res. 15, 454–460. doi:10.1034/j.1600-0749.2002.02065.x
Lucas, R.E., Qiao, M., 1999. A case of encephalitis in central Australia due to Ross River virus? Aust. N.

Z. J. Med. 29, 268–270. doi:10.1111/j.1445-5994.1999.tb00695.x
Lupi, E., Hatz, C., Schlagenhauf, P., 2013. The efficacy of repellents against Aedes, Anopheles, Culex and Ixodes spp. – A literature review. Travel Med. Infect. Dis. 11, 374–411. doi:10.1016/j.tmaid.2013.10.005
Machado, M., Pires, P., Dinis, A.M., Santos-Rosa, M., Alves, V., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Sousa, M.C., 2012. Monoterpenic aldehydes as potential anti-Leishmania agents: Activity of Cymbopogon citratus and citral on L. infantum, L. tropica and L. major. Exp. Parasitol. 130, 223–231. doi:10.1016/j.exppara.2011.12.012
Mackenzie, J.S., Lindsay, M.D., Coelen, R.J., Broom, A.K., Hall, R.A., Smith, D.W., 1994. Arboviruses causing human disease in the Australasian zoogeographic region. Arch. Virol. 136, 447–467.
Magnon, G.J., Robert, L.L., Kline, D.L., Roberts, L.W., 1991. Repellency of two deet formulations and Avon Skin-So-Soft against biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in Honduras. J. Am. Mosq. Control Assoc. 7, 80–82.
Maia, M.F., Moore, S.J., 2011. Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. Malar. J. 10, S11. doi:10.1186/1475-2875-10-S1-S11
Mallavarapu, G.R., Syamasundar, K.V., Ramesh, S., Rao, B.R., 2012. Constituents of south Indian vetiver oils. Nat. Prod. Commun. 7, 223–225.
Martinez, J., Rosa, P.T.V., Menut, C., Leydet, A., Brat, P., Pallet, D., Meireles, M.A.A., 2004. Valorization of Brazilian Vetiver (Vetiveria zizanioides (L.) Nash ex Small) Oil. J. Agric. Food Chem. 52, 6578–6584. doi:10.1021/jf049182x
Mateo, L., La Linn, M., McColl, S.R., Cross, S., Gardner, J., Suhrbier, A., 2000. An arthrogenic alphavirus induces monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8. Intervirology 43, 55–60. doi:25023
Matsuda, B.M., Surgeoner, G.A., Heal, J.D., Tucker, A.O., Maciarello, M.J., 1996. Essential oil analysis and field evaluation of the citrosa plant “Pelargonium citrosum” as a repellent against populations of Aedes mosquitoes. J. Am. Mosq. Control Assoc. 12, 69–74.
McBride, C.S., 2016. Genes and Odors Underlying the Recent Evolution of Mosquito Preference for Humans. Curr. Biol. 26, R41–R46. doi:10.1016/j.cub.2015.11.032
McIver, S.B., 1974. Fine structure of antennal grooved pegs of the mosquito, Aedes aegypti. Cell Tissue Res. 153, 327–337. doi:10.1007/BF00229162
Meijerink, J., Braks, M. a. H., Brack, A.A., Adam, W., Dekker, T., Posthumus, M.A., Beek, T.A.V., Loon, J.J.A.V., 2000. Identification of Olfactory Stimulants for Anopheles gambiae from Human Sweat Samples. J. Chem. Ecol. 26, 1367–1382. doi:10.1023/A:1005475422978
Meneses, R., Ocazionez, R.E., Martínez, J.R., Stashenko, E.E., 2009. Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication in vitro. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 8, 8. doi:10.1186/1476-0711-8-8
Menut, C., Bessiére, J.M., Samaté, D., Djibo, A.K., Buchbauer, G., Schopper, B., 2000. Aromatic Plants of Tropical West Africa. XI. Chemical Composition, Antioxidant and Antiradical Properties of the Essential Oils of Three Cymbopogon Species from Burkina Faso. J. Essent. Oil Res. 12, 207–212. doi:10.1080/10412905.2000.9699499
Minami, M., Kita, M., Nakaya, T., Yamamoto, T., Kuriyama, H., Imanishi, J., 2003. The Inhibitory Effect of Essential Oils on Herpes Simplex Virus Type-1 Replication In Vitro. Microbiol. Immunol. 47, 681–684. doi:10.1111/j.1348-0421.2003.tb03431.x
Ministère des affaires sociales et de la santé, 2016. Répulsifs pour la protection contre les piqûres d’arthropodes (hors araignées, scorpions, scolopendres et hyménoptères).
Minker, C., 2007. La flore médicinale réunionnaise et le chikungunya (Thèse d’exercice). Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.
M.N. Nurul Aini, M.I. Said, I. Nazlina, M.N. Hanina, I.B. Ahmad, 2006. Screening for Antiviral Activity of Sweet Lemon Grass (Cymbopogon nardus (L.) Rendle) Fractions. J. Biol. Sci. 6, 507–510. doi:10.3923/jbs.2006.507.510
Mogensen, T.H., 2009. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses.

Clin. Microbiol. Rev. 22, 240–273. doi:10.1128/CMR.00046-08
Moore, S.J., Debboun, Mustapha, Debboun, M., Frances, S.P., Strickman, D., 2007a. History of insect repellents. Insect Repel. Princ. Methods Uses 3–29.
Moore, S.J., Hill, N., Ruiz, C., Cameron, M.M., 2007b. Field Evaluation of Traditionally Used Plant-Based Insect Repellents and Fumigants Against the Malaria Vector Anopheles darlingi in Riberalta, Bolivian Amazon. J. Med. Entomol. 44, 624–630. doi:10.1093/jmedent/44.4.624
Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65, 55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
Mousavi, E.S., Dehghanzadeh, H., Abdali, A., 2014. Chemical Composition and Essential Oils of Pelargonium graveolens (Geraniaceae) By Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC/MS). Bull Env Pharmacol Life Sci 3, 182–184.
Mukabana, W.R., Takken, W., Coe, R., Knols, B.G., 2002. Host-specific cues cause differential attractiveness of Kenyan men to the African malaria vector Anopheles gambiae. Malar. J. 1, 17. doi:10.1186/1475-2875-1-17
Mwangi, J.W., Addae-Mensah, I., Muriuki, G., Munavu, R., Lwande, W., and Hassanali, A., 1992. Essential oils of Lippia species in Kenya. IV: Maize weevil (Sitophilus zeamais) repellancy and larvicidal activity. Int. J. Pharmacogn. 30, 9–16.
Naeini, A.R., Nazeri, M., Shokri, H., 2011. Antifungal activity of Zataria multiflora, Pelargonium graveolens and Cuminum cyminum essential oils towards three species of Malassezia isolated from patients with pityriasis versicolor. J. Mycol. Médicale J. Med. Mycol. 21, 87–91. doi:10.1016/j.mycmed.2011.01.004
Narayana, M.R., Rao, E.V.S.P., Rao, B.R.R., Sastryx, K. p, 1986. Geranium Cultivation in India; Potentials &, Prospects. ResearchGate 8, 25–30.
Nerio, L.S., Olivero-Verbel, J., Stashenko, E., 2010. Repellent activity of essential oils: A review. Bioresour. Technol. 101, 372–378. doi:10.1016/j.biortech.2009.07.048
Nix, K.E., Henderson, G., Zhu, B.C.R., Laine, R.A., 2006. Evaluation of Vetiver Grass Root Growth, Oil Distribution, and Repellency Against Formosan Subterranean Termites. HortScience 41, 167–171.
Odalo, J.O., Omolo, M.O., Malebo, H., Angira, J., Njeru, P.M., Ndiege, I.O., Hassanali, A., 2005. Repellency of essential oils of some plants from the Kenyan coast against Anopheles gambiae. Acta Trop., Malaria Research in Africa - Multilateral Initiative on Malaria 95, 210–218. doi:10.1016/j.actatropica.2005.06.007
Old, J.M., Deane, E.M., 2005. Antibodies to the Ross River virus in captive marsupials in urban areas of eastern New South Wales, Australia. J. Wildl. Dis. 41, 611–614.
Omolo, M.O., Okinyo, D., Ndiege, I.O., Lwande, W., Hassanali, A., 2004. Repellency of essential oils of some Kenyan plants against Anopheles gambiae. Phytochemistry 65, 2797–2802. doi:10.1016/j.phytochem.2004.08.035
Onawunmi, G.O., Yisak, W.-A., Ogunlana, E.O., 1984. Antibacterial constituents in the essential oil of Cymbopogon citratus (DC.) Stapf. J. Ethnopharmacol. 12, 279–286. doi:10.1016/0378-8741(84)90057-6
Opdyke, D.L.J., 1973. Monographs on fragrance raw materials: Citronella oil. Food Cosmet. Toxicol. 11, 1067.
Pandey, A.K., Palni, U.T., Tripathi, N.N., 2014. Repellent activity of some essential oils against two stored product beetles Callosobruchus chinensis L. and C. maculatus F. (Coleoptera: Bruchidae) with reference to Chenopodium ambrosioides L. oil for the safety of pigeon pea seeds. J. Food Sci. Technol. 51, 4066–4071. doi:10.1007/s13197-012-0896-4
Papachristos, D.P., Karamanoli, K.I., Stamopoulos, D.C., Menkissoglu-Spiroudi, U., 2004. The relationship between the chemical composition of three essential oils and their insecticidal activity against Acanthoscelides obtectus (Say). Pest Manag. Sci. 60, 514–520. doi:10.1002/ps.798

Parashar, D., Paingankar, M.S., Kumar, S., Gokhale, M.D., Sudeep, A.B., Shinde, S.B., Arankalle, V.A., 2013. Administration of E2 and NS1 siRNAs Inhibit Chikungunya Virus Replication In Vitro and Protects Mice Infected with the Virus. PLoS Negl. Trop. Dis. 7. doi:10.1371/journal.pntd.0002405

Patel, R.V., Shaeer, K.M., Patel, P., Garmaza, A., Wiangkham, K., Franks, R.B., Pane, O., Carris, N.W., 2016. EPA-registered repellents for mosquitoes transmitting emerging viral disease. Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther. n/a-n/a. doi:10.1002/phar.1854

Pavela, R., Benelli, G., 2016. Ethnobotanical knowledge on botanical repellents employed in the African region against mosquito vectors – A review. Exp. Parasitol. 167, 103–108. doi:10.1016/j.exppara.2016.05.010

Peterson, C., Coats, J., 2001. Insect repellents - past, present and future. Pestic. Outlook 12, 154–158. doi:10.1039/b106296b

Pohjala, L., Utt, A., Varjak, M., Lulla, A., Merits, A., Ahola, T., Tammela, P., 2011. Inhibitors of Alphavirus Entry and Replication Identified with a Stable Chikungunya Replicon Cell Line and Virus-Based Assays. PLoS ONE 6. doi:10.1371/journal.pone.0028923

Pohlit, A., Lopes, N., Gama, R., Tadei, W., de Andrade Neto, V., 2011. Patent Literature on Mosquito Repellent Inventions which Contain Plant Essential Oils - A Review. Planta Med. 77, 598–617. doi:10.1055/s-0030-1270723

Prajapati, V., Tripathi, A.K., Aggarwal, K.K., Khanuja, S.P.S., 2005. Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against Anopheles stephensi, Aedes aegypti and Culex quinquefasciatus. Bioresour. Technol. 96, 1749–1757. doi:10.1016/j.biortech.2005.01.007

Pröll, S., Dobler, G., Pfeffer, M., Jelinek, T., Nothdurft, H.D., Löscher, T., 1999. [Persistent arthralgias in Ross-River-Virus disease after travel to the South Pacific]. Dtsch. Med. Wochenschr. 1946 124, 759–762. doi:10.1055/s-2007-1024409

Pushpanathan, T., Jebanesan, A., Govindarajan, M., 2006. Larvicidal, ovicidal and repellent activities of Cymbopogan citratus Stapf (Graminae) essential oil against the filarial mosquito Culex quinquefasciatus (Say)(Diptera: Culicidae). Trop Biomed 23, 208–212.

Qualls, W.A., Day, J.F., Xue, R., Bowers, D.F., 2012. Altered behavioral responses of Sindbis virus-infected Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) to DEET and non-DEET based insect repellents. Acta Trop. 122, 284–290. doi:10.1016/j.actatropica.2012.01.012

Qualls, W.A., Day, J.F., Xue, R.-D., Bowers, D.F., 2011. Altered Response to DEET Repellent After Infection of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) With Sindbis Virus. J. Med. Entomol. 48, 1226–1230. doi:10.1603/ME10163

Rana, V.S., Juyal, J.P., Amparo Blazquez, M., 2002. Chemical constituents of essential oil of Pelargonium graveolens leaves. Int. J. Aromather. 12, 216–218. doi:10.1016/S0962-4562(03)00003-1

Rao, R.R., Jamir, N.S., 1982. Ethnobotanical Studies in Nagaland. I. Medicinal Plants. Econ. Bot. 36, 176–181.

Raut, J.S., Karuppayil, S.M., 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. Ind. Crops Prod. 62, 250–264. doi:10.1016/j.indcrop.2014.05.055

Ravindra, N.S., Kulkarni, R.N., 2015. Essential oil yield and quality in rose-scented geranium: Variation among clones and plant parts. Sci. Hortic. 184, 31–35. doi:10.1016/j.scienta.2014.12.023

Ray, A., 2015. Reception of odors and repellents in mosquitoes. Curr. Opin. Neurobiol., Molecular biology of sensation 34, 158–164. doi:10.1016/j.conb.2015.06.014

Richard C. Russell, 2002. Ross River Virus : Ecology and Distribution. Annu. Rev. Entomol. 47, 1–31.

Rosato, A., Vitali, C., Gallo, D., Balenzano, L., Mallamaci, R., 2008. The inhibition of Candida species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. Phytomedicine 15, 635–638. doi:10.1016/j.phymed.2008.05.001

Rothan, H.A., Bahrani, H., Abdulrahman, A.Y., Mohamed, Z., Teoh, T.C., Othman, S., Rashid, N.N., Rahman, N.A., Yusof, R., 2016. Mefenamic acid in combination with ribavirin shows significant effects in reducing chikungunya virus infection in vitro and in vivo. Antiviral Res. 127, 50–56.

doi:10.1016/j.antiviral.2016.01.006
Rothan, H.A., Bahrani, H., Shankar, E.M., Rahman, N.A., Yusof, R., 2014. Inhibitory effects of a peptide-fusion protein (Latarcin–PAP1–Thanatin) against chikungunya virus. Antiviral Res. doi:10.1016/j.antiviral.2014.05.019
Rulli, N.E., Melton, J., Wilmes, A., Ewart, G., Mahalingam, S., 2007. The Molecular and Cellular Aspects of Arthritis Due to Alphavirus Infections. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1102, 96–108. doi:10.1196/annals.1408.007
Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., Bruni, R., 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. Food Chem. 91, 621–632. doi:10.1016/j.foodchem.2004.06.031
Samoisy, A.K., Mahomoodally, F., 2016. Ethnopharmacological appraisal of culturally important medicinal plants and polyherbal formulas used against communicable diseases in Rodrigues Island. J. Ethnopharmacol. 194, 803–818. doi:10.1016/j.jep.2016.10.041
Saotome, K., Morita, H., Umeda, M., 1989. Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs. Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA 3, 317–321.
Sathantriphop, S., White, S.A., Achee, N.L., Sanguanpong, U., Chareonviriyaphap, T., 2014. Behavioral responses of Aedes aegypti, Aedes albopictus, Culex quinquefasciatus, and Anopheles minimus against various synthetic and natural repellent compounds. J. Vector Ecol. 39, 328–339. doi:10.1111/jvec.12108
Schneider, B.S., Higgs, S., 2008. The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 102, 400–408. doi:10.1016/j.trstmh.2008.01.024
Schnitzler, P., Schön, K., Reichling, J., 2001. Antiviral activity of Australian tea tree oil and eucalyptus oil against herpes simplex virus in cell culture. Pharm. 56, 343–347.
Seaforth, C., Tikasingh, T., Gupta, M., St Rose, G., 2008. A study for the development of a handbook of selected Caribbean herbs for industry.
Shabman, R.S., Morrison, T.E., Moore, C., White, L., Suthar, M.S., Hueston, L., Rulli, N., Lidbury, B., Ting, J.P.-Y., Mahalingam, S., Heise, M.T., 2007. Differential Induction of Type I Interferon Responses in Myeloid Dendritic Cells by Mosquito and Mammalian-Cell-Derived Alphaviruses. J. Virol. 81, 237–247. doi:10.1128/JVI.01590-06
Shah, G., Shri, R., Panchal, V., Sharma, N., Singh, B., Mann, A.S., 2011. Scientific basis for the therapeutic use of Cymbopogon citratus, stapf (Lemon grass). J. Adv. Pharm. Technol. Res. 2, 3–8. doi:10.4103/2231-4040.79796
Sharma, R., Fatma, B., Saha, A., Bajpai, S., Sistla, S., Dash, P.K., Parida, M., Kumar, P., Tomar, S., 2016. Inhibition of chikungunya virus by picolinate that targets viral capsid protein. Virology 498, 265–276. doi:10.1016/j.virol.2016.08.029
Sharopov, F.S., Zhang, H., Setzer, W.N., 2014. Composition of geranium (Pelargonium graveolens) essential oil from Tajikistan. Am J Essent Oil Nat Prod 2, 13–16.
Shope, R.E., Anderson, S.G., 1960. The virus aetiology of epidemic exanthem and polyarthritis. Med. J. Aust. 47(1), 156–158.
Sienkiewicz, M., Poznańska-Kurowska, K., Kaszuba, A., Kowalczyk, E., 2014. The antibacterial activity of geranium oil against Gram-negative bacteria isolated from difficult-to-heal wounds. Burns 40, 1046–1051. doi:10.1016/j.burns.2013.11.002
Silva, O.S., Prophiro, J.S., Nogared, J.C., Kanis, L., Emerick, S., Blazius, R.D., Romão, P.R. t., 2006. Larvicidal effect of andiroba oil, carapa guianensis(meliaceae), against aedes aegypti. J. Am. Mosq. Control Assoc. 22, 699–701. doi:10.2987/8756-971X(2006)22[699:LEOAOC]2.0.CO;2
Singh, K., Rao, B.R.R., Kaul, P.N., Bhattacharya, A.K., Singh, C.P., 1999. Yield and quality of three varieties of rose-scented geranium (Pelargonium species) as influenced by height of harvesting. ResearchGate 21, 664–667.

Sinha, S., Jothiramajayam, M., Ghosh, M., Mukherjee, A., 2014. Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. Food Chem. Toxicol. 68, 71–77. doi:10.1016/j.fct.2014.02.036

Soares, S.F., Borges, L.M.F., de Sousa Braga, R., Ferreira, L.L., Louly, C.C.B., Tresvenzol, L.M.F., de Paula, J.R., Ferri, P.H., 2010. Repellent activity of plant-derived compounds against Amblyomma cajennense (Acari: Ixodidae) nymphs. Vet. Parasitol. 167, 67–73. doi:10.1016/j.vetpar.2009.09.047

Soden, M., Vasudevan, H., Roberts, B., Coelen, R., Hamlin, G., Vasudevan, S., La Brooy, J., 2000. Detection of viral ribonucleic acid and histologic analysis of inflamed synovium in Ross River virus infection. Arthritis Rheum. 43, 365–369. doi:10.1002/1529-0131(200002)43:2<365::AID-ANR16>3.0.CO;2-E

Solomon, B., Sahle, F.F., Gebre-Mariam, T., Asres, K., Neubert, R.H.H., 2012. Microencapsulation of citronella oil for mosquito-repellent application: Formulation and in vitro permeation studies. Eur. J. Pharm. Biopharm. 80, 61–66. doi:10.1016/j.ejpb.2011.08.003

Souza Formigoni, M.L.O., Lodder, H.M., Filho, O.G., Ferreira, T.M.S., Carlini, E.A., 1986. Pharmacology of lemongrass (Cymbopogon citratus Stapf). II. Effects of daily two month administration in male and female rats and in offspring exposed “in utero.” J. Ethnopharmacol. 17, 65–74. doi:10.1016/0378-8741(86)90073-5

Spring, M.A., 1989. Ethnopharmacologic analysis of medicinal plants used by Laotian Hmong refugees in Minnesota. J. Ethnopharmacol. 26, 65–91.

Sritabutra, D., Soonwera, M., 2013. Repellent activity of herbal essential oils against Aedes aegypti (Linn.) and Culex quinquefasciatus (Say.). Asian Pac. J. Trop. Dis. 3, 271–276. doi:10.1016/S2222-1808(13)60069-9

Sritabutra, Duangkamon, Soonwera, Mayura, Waltanachanobon, Sirirat, Poungjai, Supaporn, 2011. Evaluation of herbal essential oil as repellents against Aedes aegypti (L.) and Anopheles dirus Peyton & Harrion. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 124–128.

Staikowsky, F., Le ROUX, K., Schuffenecker, I., Laurent, P., Grivard, P., Develay, A., Michault, A., 2008. Retrospective survey of Chikungunya disease in Réunion Island hospital staff. Epidemiol. Infect. 136. doi:10.1017/S0950268807008424

Stanczyk, N.M., Brookfield, J.F.Y., Field, L.M., Logan, J.G., 2013. Aedes aegypti Mosquitoes Exhibit Decreased Repellency by DEET following Previous Exposure. PLoS ONE 8, e54438. doi:10.1371/journal.pone.0054438

Stawowczyk, M., Scoy, S.V., Kumar, K.P., Reich, N.C., 2011. The Interferon Stimulated Gene 54 Promotes Apoptosis. J. Biol. Chem. 286, 7257–7266. doi:10.1074/jbc.M110.207068

Strauss, J.H., Strauss, E.G., 1994. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. Microbiol. Rev. 58, 491–562.

Suhrbier, A., La Linn, M., 2004. Clinical and pathologic aspects of arthritis due to Ross River virus and other alphaviruses. Curr. Opin. Rheumatol. 16, 374–379.

Tawatsin, A., Wratten, S.D., Scott, R.R., Thavara, U., Techadamrongsin, Y., 2001. Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. J. Vector Ecol. J. Soc. Vector Ecol. 26, 76–82.

Thorsell, W., Mikiver, A., Malander, I., Tunón, H., 1998. Efficacy of plant extracts and oils as mosquito repellents. Phytomedicine 5, 311–323. doi:10.1016/S0944-7113(98)80072-X

Tiwari, M., Dwivedi, U.N., Kakkar, P., 2010. Suppression of oxidative stress and pro-inflammatory mediators by Cymbopogon citratus D. Stapf extract in lipopolysaccharide stimulated murine alveolar macrophages. Food Chem. Toxicol. 48, 2913–2919. doi:10.1016/j.fct.2010.07.027

Tiwary, M., Naik, S.N., Tewary, D.K., Mittal, P.K., Yadav, S., 2007. Chemical composition and larvicidal activities of the essential oil of Zanthoxylum armatum DC (Rutaceae) against three mosquito vectors. J. Vector Borne Dis. 44, 198.

Tobin, D.J., 2006. Biochemistry of human skin—our brain on the outside. Chem Soc Rev 35, 52–67. doi:10.1039/B505793K

Tofiño-Rivera, A., Ortega-Cuadros, M., Galvis-Pareja, D., Jiménez-Rios, H., Merini, L.J., Martínez-Pabón,

M.C., 2016. Effect of Lippia alba and Cymbopogon citratus essential oils on biofilms of Streptococcus mutans and cytotoxicity in CHO cells. J. Ethnopharmacol. 194, 749–754. doi:10.1016/j.jep.2016.10.044

Traboulsi, A.F., El-Haj, S., Tueni, M., Taoubi, K., Nader, N.A., Mrad, A., 2005. Repellency and toxicity of aromatic plant extracts against the mosquito Culex pipiens molestus (Diptera: Culicidae). Pest Manag. Sci. 61, 597–604. doi:10.1002/ps.1017

Trattner, A., David, M., Lazarov, A., 2008. Occupational contact dermatitis due to essential oils. Contact Dermatitis 58, 282–284.

Trongtokit, Y., Rongsriyam, Y., Komalamisra, N., Apiwathnasorn, C., 2005. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. Phytother. Res. 19, 303–309. doi:10.1002/ptr.1637

Trumble, J.T., 2002. Caveat emptor: safety considerations for natural products used in arthropod control. Am. Entomol.-LANHAM- 48, 7–13.

Turmagambetova, A., Sokolova, N., Zaitceva, I., Alexyuk, M., Bogoyavlenskiy, A., Berezin, V., 2015. Essential oils as antiviral preparations. J. Biotechnol., EUROPEAN BIOTECHNOLOGY CONGRESS 2015, Bucharest 208, Supplement, S93. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.06.291

Tyagi, B.K., Shahi, A.K., Kaul, B.L., 1998. Evaluation of repellent activities of Cymbopogon essential oils against mosquito vectors of Malaria, Filariasis and Dengue Fever in India. Phytomedicine 5, 324–329. doi:10.1016/S0944-7113(98)80073-1

Uter, Wolfgang, Schmidt, Erich, Geier, Johannes, Lessmann, Holger, Schnuch, Axel, Frosch, Peter, 2010. Contact allergy to essential oils : current patch test restults (2000-2008) from the Information Network of Departments of Dermatology (IVDK). Contact Dermatitis 63, 277–283.

Vale, T.G., Cloonan, M.J., Spratt, D.M., 1991. Serological evidence of arbovirus infection in native and domesticated mammals on the south coast of New South Wales. Aust. J. Zool.

Varghese, F.S., Kaukinen, P., Gläsker, S., Bespalov, M., Hanski, L., Wennerberg, K., Kümmerer, B.M., Ahola, T., 2016. Discovery of berberine, abamectin and ivermectin as antivirals against chikungunya and other alphaviruses. Antiviral Res. 126, 117–124. doi:10.1016/j.antiviral.2015.12.012

Varghese, F.S., Rausalu, K., Hakanen, M., Saul, S., Kümmerer, B.M., Susi, P., Merits, A., Ahola, T., 2017. Obatoclax Inhibits Alphavirus Membrane Fusion by Neutralizing the Acidic Environment of Endocytic Compartments. Antimicrob. Agents Chemother. 61, e02227-16. doi:10.1128/AAC.02227-16

Verma, R.., Verma, R.., Yadav, A.K., Chauhan, A., 2010. Changes in the essential oil composition of rose-scented geranium (Pelargonium graveolens L'Herit. ex Ait.) due to date of transplanting under hill conditions of Uttarakhand. Indian Journal of Natural Products and Resources 1, 367–370.

Vongsombath, C., Pålsson, K., Björk, L., Borg–Karlson, A.-K., Jaenson, T.G.T., 2012. Mosquito (Diptera: Culicidae) Repellency Field Tests of Essential Oils From Plants Traditionally Used in Laos. J. Med. Entomol. 49, 1398–1404. doi:10.1603/ME12025

Waarts, B.-L., Aneke, O.J.C., Smit, J.M., Kimata, K., Bittman, R., Meijer, D.K.F., Wilschut, J., 2005. Antiviral activity of human lactoferrin: inhibition of alphavirus interaction with heparan sulfate. Virology 333, 284–292. doi:10.1016/j.virol.2005.01.010

Wada, Y., Orba, Y., Sasaki, M., Kobayashi, S., Carr, M.J., Nobori, H., Sato, A., Hall, W.W., Sawa, H., 2017. Discovery of a novel antiviral agent targeting the nonstructural protein 4 (nsP4) of chikungunya virus. Virology 505, 102–112. doi:10.1016/j.virol.2017.02.014

Wang, J., Zhu, F., Zhou, X.M., Niu, C.Y., Lei, C.L., 2006. Repellent and fumigant activity of essential oil from Artemisia vulgaris to Tribolium castaneum (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). J. Stored Prod. Res. 42, 339–347. doi:10.1016/j.jspr.2005.06.001

Wang, Y.-M., Lu, J.-W., Lin, C.-C., Chin, Y.-F., Wu, T.-Y., Lin, L.-I., Lai, Z.-Z., Kuo, S.-C., Ho, Y.-J., 2016. Antiviral activities of niclosamide and nitazoxanide against chikungunya virus entry and transmission. Antiviral Res. 135, 81–90. doi:10.1016/j.antiviral.2016.10.003

Wannissorn, B., Jarikasem, S., Siriwangchai, T., Thubthimthed, S., 2005. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. Fitoterapia 76, 233–236.

doi:10.1016/j.fitote.2004.12.009
Weyerstahl, P., Marschall, H., Splittgerber, U., Wolf, D., Surburg, H., 2000. Constituents of Haitian vetiver oil. Flavour Fragr. J. 15, 395–412. doi:10.1002/1099-1026(200011/12)15:6<395::AID-FFJ930>3.0.CO;2-9
WHO | Fact sheets: tropical diseases [WWW Document], n.d. . WHO. URL http://www.who.int/topics/tropical_diseases/factsheets/en/ (accessed 8.25.17).
Wichit, S., Ferraris, P., Choumet, V., Missé, D., 2016. The effects of mosquito saliva on dengue virus infectivity in humans. Curr. Opin. Virol., Virus-vector interactions / Viral gene therapy vector 21, 139–145. doi:10.1016/j.coviro.2016.10.001
Wintachai, P., Thuaud, F., Basmadjian, C., Roytrakul, S., Ubol, S., Désaubry, L., Smith, D.R., 2015. Assessment of flavaglines as potential chikungunya virus entry inhibitors. Microbiol. Immunol. 59, 129–141. doi:10.1111/1348-0421.12230
World Health Organization, 2013. Guidelines for efficacy testing of spatial repellents.
Wressnigg, N., Velden, M.V.W. van der, Portsmouth, D., Draxler, W., O'Rourke, M., Richmond, P., Hall, S., McBride, W.J.H., Redfern, A., Aaskov, J., Barrett, P.N., Aichinger, G., 2015. An Inactivated Ross River Virus Vaccine Is Well Tolerated and Immunogenic in an Adult Population in a Randomized Phase 3 Trial. Clin. Vaccine Immunol. 22, 267–273. doi:10.1128/CVI.00546-14
Yang, Y.-C., Lee, E.H., Lee, H.S., Lee, D.K., Ahn, Y.J., 2004. Repellency of aromatic medicinal plant extracts and a steam distillate to Aedes aegypti. J. Am. Mosq. Control Assoc. 20, 146–149.
Yu, S., Aaskov, J.G., 1994. Development of a candidate vaccine against Ross River virus infection. Vaccine 12, 1118–1124.
Zhang, H., Han, T., Yu, C.-H., Jiang, Y.-P., Peng, C., Ran, X., Qin, L.-P., 2012. Analysis of the chemical composition, acute toxicity and skin sensitivity of essential oil from rhizomes of Ligusticum chuanxiong. J. Ethnopharmacol. 144, 791–796. doi:10.1016/j.jep.2012.10.010

Annexes

Communication orale :

"*Cymbopogon citratus* essential oil from Reunion island exerts antiviral effect against alphavirus"

M. Ralambondrainy, E. Belarbi, R. Baranauskienė, P. R. Venskutonis, P. Desprès, P. Roques, C. El Kalamouni and J. Sélambarom

2nd International Conference on Natural Products Utilization: from Plants to Pharmacy Shelf, 14-17 octobre 2015 ICNPU-2015, Plovdiv, Bulgaria).

Publications :

"The growth of arthralgic Ross Rvier is restricted in human monocytic cells", P. Krejbich-Trotot, E. Belarbi, **M. Ralambondrainy**, C.El Kalamouni, W. Viranaicken, P. Roques, P. Desprès, G. Gadea Virus research (publié)

"Antiviral activity *in vitro* of three common essential oils mosquito repellents against Ross River virus", **M. Ralambondrainy**, E. Belarbi, W. Viranaicken, R. Baranauskiene, P. Venskutonis, P. Desprès, P. Roques, C. El Kalamouni, J. Sélambarom (en soumission)

"Chemical composition and *in vitro* toxicity of *Cymbopogon citratus* essential oil for topical application", **M. Ralambondrainy**, R. Baranauskiene, P. Venskutonis, P. Roques, C. El Kalamouni, J. Sélambarom (en cours de rédaction)