



HAL
open science

Valorisation des éco-extraits de plantes médicinales réunionnaises dans la lutte contre les maladies virales émergentes de l'océan Indien

Elodie Clain

► **To cite this version:**

Elodie Clain. Valorisation des éco-extraits de plantes médicinales réunionnaises dans la lutte contre les maladies virales émergentes de l'océan Indien. Médicaments. Université de la Réunion, 2018. Français. NNT : 2018LARE0033 . tel-02059868

HAL Id: tel-02059868

<https://theses.hal.science/tel-02059868>

Submitted on 7 Mar 2019

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 en vue de l'obtention du grade de :

DOCTEUR EN BIOLOGIE MEDICALE SANTE

Par

Marie Elodie CLAIN

Valorisation des éco-extraits de plantes médicinales réunionnaises dans la lutte contre les maladies virales émergentes de l'Océan Indien.

Soutenue publiquement le 4 Décembre 2018 devant le jury composé de :

Dr. Pierre ROQUES	Université Paris-Saclay	Rapporteur
Pr. Johan NEYTS	Université de Leuven	Rapporteur
Pr. Jean-Luc WOLFENDER	Université de Genève	Examinateur
Pr. Marie-Paule GONTHIER	Université de la Réunion	Examinatrice
Dr. Catherine CETRE-SOSSAH	CIRAD, UMR ASTRE	Examinatrice
Dr. Chaker EL KALAMOUNI	Université de la Réunion	Co-directeur de thèse
Pr. Pascale GUIRAUD	Université de la Réunion	Directrice de thèse

Cette thèse a reçu le soutien financier de la Région Réunion et de l'Union Européenne - Fonds européen de développement régional (FEDER) PO 2014-2020.

Avant-propos

Cette thèse a été réalisée au sein de l'École Doctorale Sciences Technologies Santé de l'Université de la Réunion (ED542) et financée par une Allocation Régionale de Recherche de la Région Réunion. Les recherches ont été menées grâce au soutien financier de la Région Réunion et de l'Union Européenne.

Ces travaux de recherche ont été réalisés à partir de plantes, fraîchement récoltées, généreusement mises à disposition par la CAHEB (Coopérative Agricole des Huiles essentielles de Bourbon). Les extractions ont été réalisées en collaboration avec la start-up EDB (Extraits de Bourbon) au sein de leurs locaux.

Ces travaux de recherche ont débuté en décembre 2015 au sein de l'UMR PIMIT (Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, Université de la Réunion, INSERM U1187, CNRS 9192, IRD 249) dirigée par le Dr Patrick MAVINGUI. Ces travaux ont été menés en collaboration avec différents partenaires :

- Institut Pasteur, Paris, France ;
- Instituto Carlos Chagas, Fiocruz, Curitiba, Brésil ;
- Laboratoire Chimie Interface Biologie pour l'Environnement, la Santé et la Toxicologie (CIBEST), CEA Grenoble, Grenoble, France ;
- Département de Pharmacochimie Moléculaire, UMR CNRS 5063, Grenoble, France.

Remerciements

J'adresse mes remerciements au Dr Patrick Mavingui de m'avoir accueillie au sein de son équipe, dans l'unité mixte de recherche Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT).

Je tiens à remercier ma directrice de thèse, le Pr. Pascale Guiraud sans qui cette thèse n'aurait pas pu voir le jour. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée.

Je tiens également à remercier mon co-directeur de thèse, le Dr. Chaker El Kalamouni, de m'avoir accompagnée pendant ces trois années, de m'avoir supportée dans mes bons, comme dans mes mauvais jours. Merci pour ta patience envers moi, ta grande disponibilité, ton investissement dans ce travail et pour tout ce que tu m'as transmis.

Mes remerciements s'adressent également aux membres du jury de thèse. Pr. Johan Neyts et Dr. Pierre Roques merci d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Pr. Jean-Luc Wolfender, Pr. Marie-Paule Gonthier et Dr. Catherine Cetre-Sossah merci d'avoir bien voulu être mes examinateurs.

Merci à tous les membres de mon comité de suivi de thèse, le Pr. Philippe Desprès, le Dr. Nolwenn Jouvenet, le Dr. Pascale Krejbich-Trotot et le Dr. Claude Marodon pour tous vos conseils et votre soutien au fil de ces années.

Je remercie le Dr. Marie Watson et Laurent Janci de m'avoir accueillie dans les locaux de la start-up Extrait de bourbon (EDB), de m'avoir formée aux extractions aux micro-ondes. Merci également à vous de nous avoir fourni la matière végétale nécessaire à ce travail.

Merci à Claire Desvignes, de la start-up EcoEx, d'avoir accepté de mettre à notre disposition le lyophilisateur. Je te remercie également pour ton enthousiasme à toute épreuve et pour le soutien que tu m'as offert.

J'adresse des remerciements particuliers à tous nos collaborateurs de l'Institut Pasteur de Paris, au Dr. Nolwenn Jouvenet, au Dr. Laura Sinigaglia ainsi qu'à Mr Olivier Gorgette d'avoir contribué à enrichir ce travail. Au Pr. Claudia Duarte Nunes dos Santos et au Dr. Andrea Cristine Koishi de l'Institut Carlos Chagas, Fiocruz au Brésil. Merci également au Pr. Ahcène Boumendjel du département de pharmacochimie de l'université de Grenoble de nous avoir permis d'avancer dans la caractérisation chimique de nos extraits.

Je tiens également à remercier le Pr. Pascale Delangle de m'avoir accueillie dans son équipe Chimie Interface Biologie pour l'Environnement, la Santé et la Toxicologie (CIBEST) au sein du CEA de Grenoble. Merci au Dr. Walid Rachidi de m'avoir accordé votre confiance pendant ce stage de recherche. Merci particulièrement à Mr. David Beal de m'avoir

accompagné et aidé tout au long de ce stage. Je remercie également toute l'équipe CIBEST pour votre accueil chaleureux, pour vos sourires, pour votre humanité, pour ce fabuleux repas de Noël que j'ai eu la chance de partager avec vous. Merci à toi, Morgane Rivol pour ton soutien, ta bonne humeur et ta fascination pour l'île de La Réunion.

Mes remerciements s'adressent ensuite au Pr. Philippe Desprès, merci de m'avoir accueillie dans l'équipe I2T, pour vos conseils et votre soutien. A toute l'équipe I2T, un grand merci, ça a été un plaisir de travailler avec vous tous. Merci à tous d'avoir toujours été présents pour m'aider et répondre à mes questions. Merci au Dr. Wildriss Viranaicken, qui m'a soutenue même depuis la licence, merci pour tes conseils et de m'avoir écoutée. Merci au Dr. Marjolaine Roche pour sa bonne humeur et son écoute. Merci au Dr. Etienne Frumence pour nos discussions dans le P2+ et ta bonne humeur.

Je remercie vivement le futur docteur Colette Cordonin qui m'a soutenue et encouragée à tout moment. Merci pour tous les moments que tu as partagés avec moi. Et bon courage pour la suite. Merci au Dr. Anne Claire Dorsemans pour toutes ces discussions enrichissantes. A tous les docteurs, futurs docteurs, stagiaires avec qui j'ai partagé la boîte à sardine. Bonne continuation à vous, Léa, Sandra, Jonathan, Flora et Eva.

Merci à tous ceux avec qui j'ai travaillé, à tous ceux qui ont participé de loin ou de près à l'aboutissement de ce travail.

Je remercie infiniment toute ma famille, mes parents, ma sœur, mon frère et ma cousine pour leur soutien inconditionnel et à toute épreuve. Merci à vous d'avoir cru en moi jusqu'au bout.

Merci à toi Gaël, qui partage ma vie, pour ta patience infinie, ta compréhension, ta bonté et ton soutien. Merci de m'avoir encouragée et aidée dans les moments difficiles.

Et enfin je remercie tous ceux en qui je crois de m'avoir donnée la force et le courage pendant toutes ces années. Merci à Celui sans qui la vie serait impossible.

Table des matières

AVANT-PROPOS	3
REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIERES.....	7
ABREVIATIONS	9
LISTE DES FIGURES.....	13
LISTE DES TABLEAUX.....	15
RESUME.....	17
ABSTRACT	19
INTRODUCTION GENERALE	23
PARTIE 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	25
I. LES MALADIES VIRALES.....	27
<i>I.1 Les arboviroses et arbovirus.....</i>	<i>27</i>
I.1.1 Définition et Classification.....	27
I.1.2 Physiopathologie des arbovirus	29
<i>I.2 Flavivirus.....</i>	<i>30</i>
I.2.1 Classification.....	30
I.2.2 Biologie des Flavivirus	31
I.2.3 Mode de transmission.....	35
I.2.4 Physiopathologie	35
I.2.5 Épidémiologie	37
<i>I.3 Zika</i>	<i>39</i>
I.3.1 Historique et Généralités	39
I.3.2 Tropisme et physiopathologie du virus zika	41
I.3.3 Mode de transmission.....	42
I.3.4 Épidémiologie	43
I. LES STRATEGIES ANTIVIRALES	45
<i>II.1 La prévention primaire.....</i>	<i>45</i>
<i>II.2 Les vaccins.....</i>	<i>46</i>
<i>II.3 Les antiviraux et leur mode d'action.....</i>	<i>48</i>
II.3.1 Inhibition directe au niveau de la particule virale (action virostatique ou virucide).....	49
II.3.2 Inhibition des phases précoces du cycle viral	49
II.3.3 Inhibition des phases tardives du cycle viral.....	52
III. LES PLANTES MEDICINALES : SOURCE DE SUBSTANCES ANTI-INFECTIEUSES.....	57
<i>III.1 Les plantes médicinales réunionnaises</i>	<i>58</i>

III.2 Les plantes médicinales réunionnaises sélectionnées pour l'étude	63
III.2.1 Antirhea borbonica ou Bois d'osto	63
III.2.2 Aphloia theiformis ou Change écorce	64
III.2.3 Ayapana triplinervis ou Ayapana	67
III.2.4 Dodonae viscosa ou Bois d'arnette	68
III.2.5 Hubertia ambavilla ou Ambaville	70
III.2.6 Mussaenda arcuata ou Lingue café	71
III.2.7 Psiloxylon mauritianum ou Bois de pêche marron	72
III.3 Méthodes d'extraction des principes actifs	73
III.3.1 Extraction des composés volatiles	73
III.3.2 Extraction des composés non volatiles	76
PARTIE 2 : RESULTATS ET DISCUSSION	79
I. ÉCHANTILLONNAGE ET CRIBLAGE DES PLANTES MEDICINALES SELECTIONNEES	80
I.1 Échantillonnage des plantes médicinales réunionnaises sélectionnées	82
I.2 Cytotoxicité et activité antivirale des plantes médicinales sélectionnées	84
I.2.1 Évaluation de la cytotoxicité des éco-extraits	84
I.2.2 Évaluation de l'activité antivirale des éco-extraits	85
I.2.3 Détermination de la génotoxicité d'A. theiformis et de P. mauritianum	87
II. CARACTERISATION DE L'ACTIVITE ANTIVIRALE D'APHLOIA THEIFORMIS ET DE PSILOXYLON MAURITIANUM	90
II.1 Activité antivirale des extraits traditionnels d'A. theiformis	90
II.2 Mécanisme d'action de l'activité antivirale d'A. theiformis et de P. mauritianum	92
II.2.1 Inhibition de l'attachement viral par A. theiformis et P. mauritianum	93
II.2.2 Activité virucide d'A. theiformis et P. mauritianum	94
II.2.3 L'effet virucide est responsable de l'inhibition de l'attachement	102
II.3 Activité antivirale d'A. theiformis contre 4 sérotypes de la dengue	105
III. TENTATIVE D'IDENTIFICATION DES COMPOSES ACTIFS D'A. THEIFORMIS ET DE P. MAURITIANUM	109
III.1 Caractérisation chimique des éco-extraits bruts	109
III.2 Fractionnement bio-guidé des extraits d'A. theiformis et de P. mauritianum	115
PARTIE 3 : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	117
MATERIELS ET METHODES	123
REFERENCES	133
ANNEXES	169

Abréviations

A549	Cellule épithéliales pulmonaire humaine
ADN	A cide D ésoxyribo N ucléique
ANSM	A gence N ationale de S écurité du M édicament et des produits de santé
ARN	A cide R ibo N ucléique
ARNsb	A cide R ibo N ucléique simple b rin
ATCC	A merican T ype C ulture C ollection
BCIP	5- bromo-4-chloro-39-indolyphosphate p-toluidine salt
BGE	Bovin pituitary extract
BHK	Cellules de reins de hamster doré
BSA	Bovin serum albumine
C	Protéine de C apside
CC ₅₀	C oncentration C ytotoxique à 50%
IC ₅₀	C oncentration I nhibitrice à 50%
CH ₂ Cl ₂	Dichlorométhane
CHIKV	V irus C hikungunya
CMC	Carboxyméthylcellulose
CO ₂	Dioxyde de carbone
CONV	C omposés O rganiques N on V olatiles
COV	C omposés O rganiques V olatiles
CVB3	C oxackievirus B3
DAPI	4',6- d iamidino-2- p hénylindole
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-Integrin
DEET	N-N-diéthyl-m-toluamide
DENV	V irus de la D engue
DENSpm	Diéthylnorspermine
DH	D engue H émorragique
DMEM	D ulbecco's m odified e agle's m edium
DMNC	D ose m aximale n on c ytotoxique
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DSC	D engue avec s yndrome de c hoc
E	Protéine d' E nveloppe E
EDTA	A cide éthylène d iamine t étraacétique
EGCG	E pigallocatechine g allate
EGF	E pidermal G rowth F actor
eIF4A	E ukaryotic initiation factor 4A
ESSAM	E xtraction S ans S olvant A ssistée par M icro-ondes
EtOAc	Acétate d'éthyle
FDA	F ood and D rug A dministration
FFU	Foci forming unit
FISH	F luorescence I n S itu H ybridization
FMa	F ibroblast m amary cell
GAG	G lycoaminoglycane
Gas-6	G rowth- a rrest- s pecific 6
HBV	V irus de l' H épatite B

HCV	V irus de l' H épatite C
HEK	H uman e mbrionic k idney cells
HGV	V irus de l' H épatite G
HKPM	H uman k eratinocytes p lasty m ammary
H ₂ O	Eau
H ₂ O ₂	Peroxyde d'Hydrogène
Hsp	H eat s hock p rotein
HSV-1	H erpès s implex v irus t ype 1
Huh7	Cellule hépatique humaine
IFN	I nter f éron
IL-6	I nterleukine 6
IMPDH	I nosine m on p hosphate d éshydrogénase
ISG	I nterferon s timulated- g enes
JE-MB	J apanese E ncephalitis- M ousse b rain
JE-VC	J apanese E ncephalitis- V ero cells
JEV	V irus de l' E ncéphalite J aponaise
M	Protéine de m embrane M
M ₄ N	Acide tétra-O-méthyl nordiahydroguaiarétique
MCDK	M adin- D arby C anine K idney cells
MDA5	M elanoma D ifferentiation A ssociated protein 5
MEM	M odified E agle's m edium
MeOH	Méthanol
MF	M atière f raiche
MMPD	Mérimépodibe
MOI	M ultiplicity o f infection
MPA	A cide m yc p hénolique (mycophenolic acid)
MR766	Macaque Rhesus 766
MTase	Domaine m éthytran f érase N -terminal
MTT	Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NBT	Nitrobleu tetrazolium chloride
NDGA	Acide nordiahydroguaiarétique
NEAA	N on e ssential a mino a cid
NH ₄ Cl	Chlorure d'amonium
NS	Protéine N on s tructurales
ns	Non significatif
NTPase	N ucleoside- t ri p hos p hatase
OIE	Organisation mondiale de la santé animale
OMS	O rganisation M ondiale de la S anté
ORF	O pen R eadin F rame (cadre de lecture ouvert)
PAHO	P an A merican H ealth O rganizati O n
PBS	Phosphate buffer salin
PFA	Paraformaldéhyde
PF13	P olynésie F rançaise 2013
PFU	P laque F orming U nit
PKI	Inhibiteur de la protéine kinase A

PrM	Pr écurseur de la protéine M
RT-qPCR	R everse T ranscription- q uantitative P olymerase C hain R eaction
RE	Residual extract
RE	R éticulum E ndoplasmique
RdRp	Domaine ARN polymérase ARN dépendant C-terminal
RIG-1	R etinoic acid I nductible G ene 1
RSA	R elation S tructure A ctivité
RV	R otavirus
SDS	S odium d odécyle sulfate
sfRNA	ARN subgénomique
SI	Index de sélectivité
SOD	S uperoxyde d ismutase
SREBP	S terol r egulatory e lement b inding p rotein
SREV	V irus du récif de Saumarez
STAT2	S ignal t ransducer and a ctivator of t ranscription 2
SVF	S érum de v eau f oetal
TAM	Récepteur tyrosine kinase
TBEV	V irus de l'encéphalite à tiques
TGN	T rans- G olgi N etwork
TIM	T -cell immunoglobulin and m ucin domain
TLR3	T oll-like receptor 3
VACV	V irus v accinia
VIH	V irus de l'immunodéficience h umaine
WHO	W orld H ealth O rganisation
WI-38	Fibroblastes pulmonaires humains
WNV	V irus du Nil Occidental
WRAIR	Walter Reed Army Institut of Research
YFV	V irus de la Fièvre jaune
ZIKV	V irus Zika
ZIKV-GFP	Z ika V irus- G reen F luorescent P rotein

Liste des figures

<i>Figure 1 : Schéma de classification des arbovirus (adapté de Go, Balasuriya, et Lee 2014)</i>	28
<i>Figure 2 : Modes de transmission des arbovirus (Iranpour et al. 2016)</i>	29
<i>Figure 3 : Classification des Flavivirus selon leurs vecteurs</i>	31
<i>Figure 4 : Structure d'une particule virale de Flavivirus (Heinz et Stiasny 2012)</i>	32
<i>Figure 5 : Organisation du génome d'un Flavivirus</i>	33
<i>Figure 6 : Cycle de répliation d'un Flavivirus (adapté de Fernández-Sanlés et al. 2017)</i>	34
<i>Figure 7 : Distribution mondiale des Flavivirus d'intérêt médical majeur (adapté de Iranpour et al. 2016)</i>	38
<i>Figure 8 : Arbre phylogénique de ZIKV à partir d'alignement de nucléotides et d'acides aminés (Haddow et al. 2012)</i>	39
<i>Figure 9 : Propagation du ZIKV à travers le monde (Centers for Diseases Control and Prevention, Février 2016)</i>	43
<i>Figure 10 : Schéma de construction des vaccins recombinant selon la technique ChimeriVax (adapté de Guy et al. 2010)</i>	47
<i>Figure 11 : Les différentes cibles d'un antiviral lors d'un cycle viral d'un Flavivirus (adapté de Fernández-Sanlés et al. 2017)</i>	48
<i>Figure 12 : Structure de quelques molécules anti-ZIKV</i>	56
<i>Figure 13 : Méthodes d'extraction conventionnelles des composés organique volatils (Périno-Issartier et al. 2013)</i>	74
<i>Figure 14 : Schéma d'une extraction au CO₂ supercritique (Tai Technologies)</i>	75
<i>Figure 15 : Différentes méthodes d'extraction assistées par micro-ondes (Périno-Issartier et al. 2013)</i>	76
<i>Figure 16 : Extracteur Soxhlet (Lee et al. 2013)</i>	77
<i>Figure 17 : Principe de l'extraction assistée par micro-ondes (IDCO France)</i>	78
<i>Figure 18 : Évaluation de l'activité antivirale des éco-extraits des sept plantes médicinales réunionnaises sélectionnées.</i>	86
<i>Figure 19 : Cytotoxicité des éco-extraits d'A. theiformis et de P. mauritanum sur des lignées cellulaires humaines.</i>	87
<i>Figure 20 : Évaluation de la génotoxicité des éco-extraits d'A. theiformis et de P. mauritanum sur des cellules humaines.</i>	89
<i>Figure 21 : Cytotoxicité et activité antivirale des extraits traditionnels d'A. theiformis.</i>	91
<i>Figure 22 : Détermination du mode d'action des éco-extraits A. theiformis et P. mauritanum sur le virus ZIKV-GFP.</i>	92
<i>Figure 23 : Inhibition de l'attachement de ZIKV par les éco-extraits d'A. theiformis et de P. mauritanum</i>	94
<i>Figure 24 : Inactivation virale de ZIKV-GFP par les éco-extraits.</i>	95
<i>Figure 25 : Activité antivirale dose-dépendante des extraits d'A. theiformis et de P. mauritanum.</i>	96
<i>Figure 26 : Détermination du temps minimal d'inhibition de l'éco-extrait d'A. theiformis.</i>	97
<i>Figure 27 : Activité antivirale des extraits d'A. theiformis et de P. mauritanum contre les souches Africaine et Asiatique de ZIKV.</i>	99

<i>Figure 28 : Inhibition de l'infectivité des souches africaine et asiatique de ZIKV par les éco-extraits d'A. theiformis et de P. mauritianum.</i>	100
<i>Figure 29 : Inhibition de la réplication des souches africaine et asiatique de ZIKV par l'extrait d'A. theiformis.</i>	101
<i>Figure 30 : L'effet virucide de l'extrait d'A. theiformis inhibe l'attachement de ZIKV.</i>	103
<i>Figure 31 : Observation des particules virales de ZIKV en présence de l'éco-extrait d'A. theiformis.</i>	104
<i>Figure 32 : Activité antivirale de l'extrait d'A. theiformis contre les 4 sérotypes du virus de la dengue.</i>	106
<i>Figure 33 : Chromatogramme UPLC-DAD de l'éco-extrait d'A. theiformis à 260 nm.</i>	109
<i>Figure 34 : Structure de la mangiférine</i>	110
<i>Figure 35 : Activité antivirale de la mangiférine.</i>	110
<i>Figure 36 : Chromatogramme UPLC-MS de l'éco-extrait de P. mauritianum à 280 nm (A) et 360 nm (B).</i>	112
<i>Figure 37 : Structures de l'acide gallique, du kaempférol et de la quercétine.</i>	113
<i>Figure 38 : Schéma des différentes étapes du fractionnement bio-guidé.</i>	116

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Liste des plantes médicinales réunionnaises inscrites à la pharmacopée française (Aplamedom). ...</i>	<i>62</i>
<i>Tableau 2 : Liste des sept plantes médicinales réunionnaises sélectionnées, inscrites à la pharmacopée française en 2015.</i>	<i>81</i>
<i>Tableau 3 : Paramètres et rendements des extractions par micro-ondes pour les sept plantes médicinales réunionnaises sélectionnées.</i>	<i>82</i>
<i>Tableau 4 : Cytotoxicité des éco-extraits.</i>	<i>84</i>
<i>Tableau 5 : CC₅₀ et MNTC des éco-extraits d’A. theiformis et de P. mauritianum sur des lignées cellulaires humaines.</i>	<i>87</i>
<i>Tableau 6 : MNTC, CC₅₀, IC₅₀ et SI des extraits traditionnels d’A. theiformis.</i>	<i>91</i>
<i>Tableau 7 : CC₅₀, IC₅₀ et SI des extraits d’A. theiformis et de P. mauritianum.</i>	<i>96</i>
<i>Tableau 8 : Identification des polyphénols de l’extrait d’A. theiformis.</i>	<i>110</i>
<i>Tableau 9 : Identification des polyphénols de P. mauritianum.</i>	<i>113</i>

Résumé

Les maladies virales à transmission vectorielle émergentes et ré-émergentes comme la dengue, le chikungunya ou le zika sont responsables de nombreuses épidémies sévères à travers le monde. Récemment, la propagation rapide et très étendue du virus zika (ZIKV) ainsi que les complications neurologiques graves liées à l'infection par ZIKV ont incité l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) à déclarer le ZIKV comme une urgence de santé publique mondiale. Aujourd'hui, les mesures préventives ou curatives de l'infection par ZIKV sont quasiment inexistantes. D'autre part, la flore endémique de La Réunion est connue comme une source riche, renouvelable et prometteuse en produits naturels anti-infectieux. L'inscription à la pharmacopée française de 19 plantes médicinales réunionnaises souligne le potentiel thérapeutique des substances naturelles issues de la biodiversité locale.

Les travaux ont été consacrés à l'identification de substances naturelles anti-ZIKV issues d'une sélection de sept plantes médicinales réunionnaises inscrites à la pharmacopée française. Dans une première étape, une extraction sans solvant assistée par micro-ondes a été appliquée sur les sept plantes médicinales sélectionnées afin d'obtenir des éco-extraits. Dans une deuxième étape, le criblage de l'activité antivirale, en utilisant un clone moléculaire du ZIKV avec un gène rapporteur, a permis d'identifier deux éco-extraits actifs provenant de *Aphloia theiformis* et de *Psiloxylon mauritianum*. Après avoir vérifié l'absence de cytotoxicité et de génotoxicité des extraits actifs, l'activité antivirale a été aussi démontrée sur d'autres types d'extraits réalisés via des méthodes d'extractions traditionnelles (infusion, décoction et macération). L'activité antivirale a été validée sur différentes souches de ZIKV (historique et épidémique) ainsi que sur les 4 sérotypes du virus de la dengue. Enfin, le mode d'action des deux extraits actifs a été étudié. Il a été montré que les éco-extraits d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum* ciblent les phases précoces du cycle viral en inhibant l'attachement du virus à la cellule hôte. A l'aide de la microscopie électronique, il a été montré que l'éco-extrait d'*A. theiformis* déforme la particule virale empêchant cette dernière de s'attacher à la membrane de la cellule hôte.

Ces résultats démontrent l'importance des plantes médicinales réunionnaises comme source de substances naturelles anti-infectieuses.

Mots clés : Flavivirus, virus Zika, virus de la dengue, plantes médicinales, Aphloia theiformis, Psiloxylon mauritianum, activité antivirale, attachement, entrée virale.

Abstract

Emerging and re-emerging vector-borne viral diseases such as dengue, chikungunya or zika are responsible for many severe epidemics worldwide. Recently, the rapid spread of zika virus (ZIKV) worldwide and the serious neurological complications associated with ZIKV infection have prompted the World Health Organization (WHO) to declare ZIKV a public health emergency. Today, preventive or curative measures against ZIKV infection are almost non-existing. On the other hand, the endemic flora of Reunion Island is known as a rich, renewable and promising source of natural anti-infective products. The registration of 19 medicinal plants from Reunion Island in the French pharmacopoeia highlights the therapeutic potential of natural substances derived from local biodiversity.

The work was dedicated to the identification of natural anti-ZIKV substances from a selection of seven medicinal plants from La Reunion registered in the French pharmacopoeia. In a first step, in collaboration with a local start-up (Bourbon Extracts), a solvent-free microwave-assisted extraction was applied to the seven selected plants in order to obtain eco-extracts. In a second step, the screening for antiviral activity, using a ZIKV molecular clone with a reporter gene, allowed the identification of two candidate plants: *Aphloia theiformis* and *Psiloxylon mauritianum*. After verifying the absence of cytotoxicity and genotoxicity of the active extracts, the antiviral activity was also demonstrated on other types of extracts using traditional extraction methods (infusion, decoction and maceration). The antiviral activity has been validated on different strains of ZIKV (historical and epidemic) as well as on the four serotypes of the dengue virus. Finally, the mode of action of the two active extracts has been studied. It has been shown that the eco-extracts from *A. theiformis* and *P. mauritianum* target the early steps of the viral cycle by inhibiting the attachment of the virus to the host cell. Using electron microscopy, it has been shown that the eco-extract of *A. theiformis* deforms the viral particle preventing its attachment to the membrane of the host cell.

These results demonstrate the importance of medicinal plants from Reunion Island as a source of natural anti-infectious substances.

Key words: Flavivirus, Zika virus, dengue virus, medicinal plants, Aphloia theiformis, Psiloxylon mauritianum, antiviral activity, attachment, viral entry.

« Contre chaque maladie il y a une plante qui pousse »

Abbé Kneipp

Introduction générale

L'île de La Réunion, située au cœur de l'Océan Indien, dans une zone tropicale est un lieu de prédisposition à de nombreuses maladies infectieuses. Ces dernières peuvent être causées par des microorganismes pathogènes : bactéries, champignons ou virus. On retrouve parmi elles les arboviroses qui sont transmises à l'Homme par la piqûre d'un arthropode hématophage, comme le moustique, lors de son repas de sang. On recense notamment la présence de moustiques du genre *Aedes* sur l'île ; *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti* en particulier. Les moustiques du genre *Aedes* font partie des plus grands vecteurs de nombreux arbovirus d'intérêt médical majeur, tels que les virus de la dengue, du chikungunya, de la fièvre jaune, et de zika pouvant causer des épidémies sévères. Nous pouvons citer l'exemple du chikungunya qui a touché plus d'un tiers de la population réunionnaise lors de l'épidémie de 2005-2006. Plus récemment, l'épidémie de dengue sévit depuis le début de l'année 2018 sur l'île, avec plus de 6595 cas autochtones recensés au mois de septembre.

Le virus zika découvert pour la première fois en Ouganda en 1947, a ré-émergé dans le Pacifique en 2007 avec sa première épidémie en Micronésie, puis en Polynésie Française en 2013 et a causé en 2015 au Brésil des millions d'infections. Ces épidémies s'accompagnent de désordres neurologiques comme le syndrome de Guillain Barré, ou de malformations congénitales chez le fœtus, telles que les microcéphalies. Du fait de la propagation du virus également en Afrique (Cap-vert, Côte d'Ivoire) et dans d'autres pays de la zone Océan Indien comme l'Inde et les Maldives, l'île de La Réunion fait partie des pays à fort risque d'émergence pour le virus zika. De plus, cette propagation peut être facilitée par la présence d'un de ses potentiels vecteurs *Aedes albopictus* sur l'île.

Outre la lutte anti-vectorielle qui vise à cibler directement les vecteurs responsables de la propagation du virus, la vaccination et les antiviraux sont les principaux moyens de lutte spécifiquement dirigés contre les virus. Les vaccins vont permettre d'activer une réaction immunitaire chez un individu par introduction du virus « non pathogène » ou de certains antigènes viraux. Ainsi lors d'une infection par l'agent pathogène, l'immunité acquise va permettre une réaction rapide du système immunitaire capable de protéger l'individu. Les antiviraux sont principalement issus de deux origines, les antiviraux synthétiques et les antiviraux naturels. De façon générale ces antiviraux, quelle que soit leur nature, vont pouvoir intervenir à différents niveaux, soit au niveau du cycle viral en ciblant différentes enzymes virales, soit directement sur la particule virale. Les antiviraux naturels peuvent être issus de plantes médicinales connues ou non pour une utilisation traditionnelle antivirale.

De par la position géographique de l'île de La Réunion, son climat est adapté à une grande diversité d'espèces végétales. En effet, l'île est connue pour être un *hot spot* de biodiversité, avec une faune et une flore riches en espèces endémiques et indigènes. En 2015, 19 plantes médicinales réunionnaises ont été inscrites à la Pharmacopée Française montrant ainsi, le potentiel de la flore locale dans le traitement et la prévention de maladies. L'utilisation de plantes médicinales locales est encore ancrée dans la culture réunionnaise. Ces plantes sont généralement utilisées pour les petits maux du quotidien : problèmes de digestion, plaies,

douleurs, inflammation ; mais elles peuvent aussi être utilisées dans le cas de maladies plus graves, comme le diabète, ou encore les maladies infectieuses. L'utilisation de certaines plantes lors de l'épidémie de chikungunya a été décrite. Certaines d'entre elles, communes de la zone Océan Indien, font partie de formulation de « tisanes » contre le paludisme (ou malaria) par exemple.

L'objectif de cette étude est de valoriser les plantes médicinales réunionnaises dans un contexte infectieux en tant que substances naturelles antivirales. Mon sujet de thèse vise à évaluer le potentiel antiviral des plantes médicinales réunionnaises inscrites en 2015 à la Pharmacopée Française contre le virus zika.

Différents critères de sélections, détaillés plus tard dans le manuscrit, ont permis d'établir une liste de sept plantes candidates : *Antirhea borbonica*, *Aphloia theiformis*, *Ayapana triplinervis*, *Dodonaea viscosa*, *Hubertia ambavilla*, *Mussaenda arcuata* et *Psiloxylon mauritanum*. Une extraction sans solvant assistée par micro-ondes, respectant les aspects écologiques et économiques de la chimie verte, a été appliquée afin d'obtenir des éco-extraits.

Un clone moléculaire du virus zika avec le gène rapporteur GFP (ZIKV-GFP) a été utilisé afin de cribler l'activité antivirale des sept éco-extraits. Les plantes retenues à l'issue de ces tests ont fait l'objet d'études plus poussées sur leur cytotoxicité et génotoxicité sur des cellules primaires et des lignées cellulaires humaines. L'activité antivirale a été aussi évaluée sur d'autres types d'extraits obtenus via des méthodes d'extraction traditionnelles (infusion, décoction et macération). Enfin, le mode d'action antivirale des éco-extraits actifs a été illustré par diverses techniques immuno-virologiques et microscopiques. Ainsi, ces travaux de thèse se divisent en trois grandes parties :

- La première partie qui est composée d'un état des lieux concernant les *Flavivirus* et plus particulièrement le virus zika ainsi que les moyens de lutte antivirale ; une synthèse sous forme de monographies concernant les connaissances sur chacune des plantes sélectionnées a été établie ;
- La deuxième partie qui reprend les résultats et discussion de la partie expérimentale, avec l'élucidation du mécanisme d'action des éco-extraits ;
- La troisième partie qui correspond une discussion générale et des perspectives dégagées par nos travaux.

Partie 1 : Étude bibliographique

I. Les maladies virales

Les maladies virales ou viroses sont des maladies causées par un virus. Selon le virus, la transmission de ces maladies virales peut se faire par différents modes : par la salive, lors d'un rapport sexuel, via certains aliments ou encore par certains vecteurs. Elles peuvent être plus ou moins graves avec une période d'incubation de quelques heures à plusieurs mois. Le virus va ensuite se propager à l'organisme en attaquant un ou plusieurs organes. Parmi les maladies virales, on retrouve la grippe, l'angine, la rougeole, la varicelle, les hépatites, la dengue, la fièvre jaune, l'encéphalite japonaise ou encore le zika.

Certaines de ces maladies sont des maladies virales dites émergentes ou ré-émergentes. Selon le *Code sanitaire pour les animaux terrestre* de l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE), une maladie émergente désigne « une nouvelle apparition, chez un animal, d'une maladie, d'une infection, ou d'une infestation ayant des répercussions significatives sur la santé animale ou humaine et résultant : a) de la modification d'un agent pathogène connu ou de sa propagation à une nouvelle aire géographique ou à une nouvelle espèce ou b) d'un agent pathogène non identifié antérieurement ou d'une maladie diagnostiquée pour la première fois ».

Cette définition peut également s'appliquer à l'Homme et à de nombreuses maladies lorsqu'il y a changement d'hôte, de vecteur, de pathogénicité ou de souche entraînant généralement une augmentation de leur incidence par rapport à leur situation épidémiologique habituelle. Ainsi, une maladie ré-émergente peut se définir comme une maladie qui a déjà été émergente et qui le devient à nouveau.

Parmi ces maladies virales émergentes et/ou ré-émergentes on retrouve notamment les arboviroses.

I.1 Les arboviroses et arbovirus

I.1.1 Définition et Classification

Les arboviroses sont des maladies virales transmises par morsures ou piqûres d'arthropodes hématophages tels que les tiques, les moustiques, phlébotomes ou culicoïdes qui constituent ainsi les vecteurs (Iranpour et al., 2016). Ces derniers transmettent donc des *arthropod-borne virus* plus couramment appelés arbovirus. Les arboviroses sont des zoonoses, c'est à dire des maladies transmissibles naturellement des animaux vertébrés à l'Homme ou inversement.

Les arbovirus peuvent être classés en trois grands groupes selon la nature de leur génome, les virus à ARN simple brin positif, les virus à ARN simple brin négatif et les virus à ARN double brin (figure 1).

Parmi ces trois groupes, on distingue cinq grandes familles d'arbovirus (Iranpour et al., 2016):

- *Togaviridae* avec le genre *Alphavirus* auquel appartient le virus du chikungunya ;

- *Flaviviridae*, tels que les virus de la fièvre jaune ou de la dengue appartenant au genre *Flavivirus* ;
- *Bunyaviridae* parmi lesquels on retrouve le virus de la fièvre de la vallée du Rift ;
- *Reoviridae*, comme les *Rotavirus* responsables des gastro-entérites ;
- *Rhabdoviridae* auquel appartient le genre *Lyssavirus* comme le virus de la rage ;

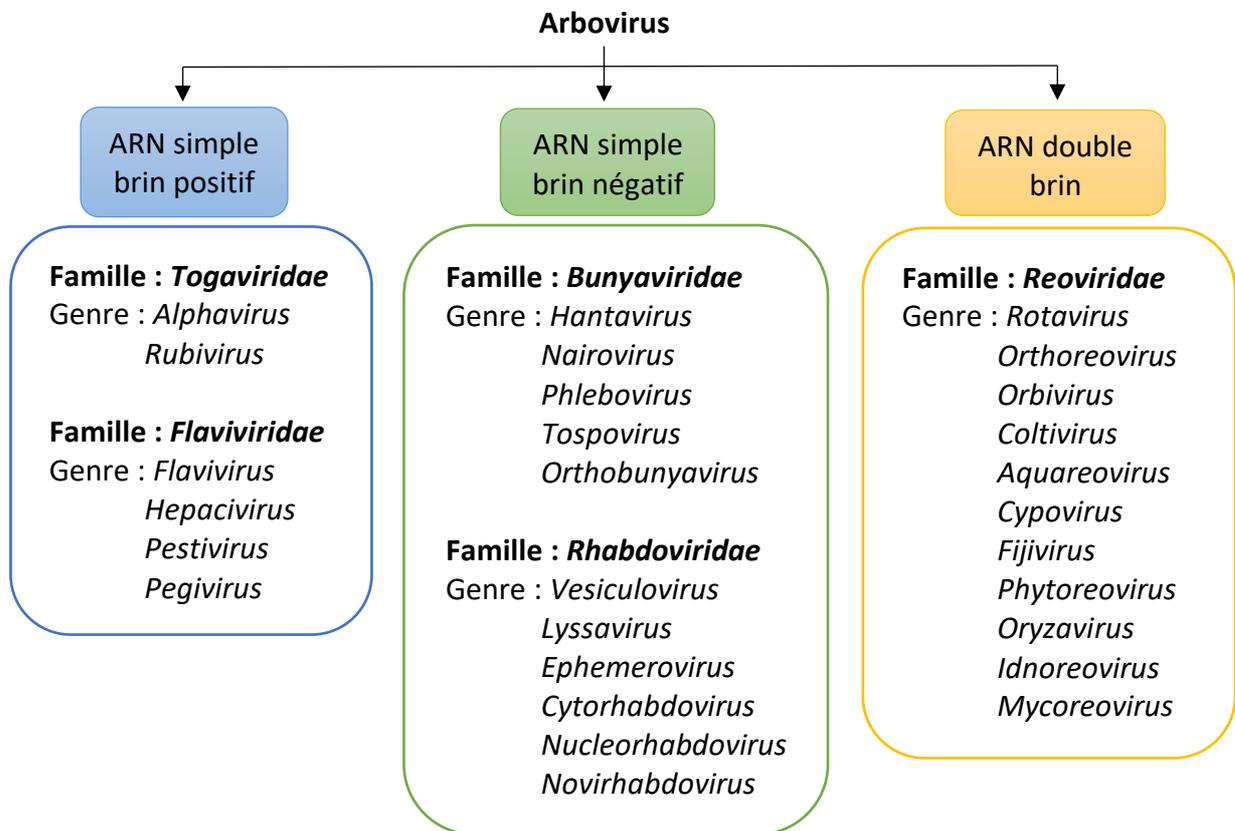


Figure 1 : Schéma de classification des arbovirus (adapté de (Go et al., 2014))

Les virus sont maintenus dans un cycle de transmission faisant intervenir trois acteurs : le virus, le vecteur, et l'hôte vertébré. On peut distinguer plusieurs niveaux dans le cycle de transmission des arbovirus.

Un cycle sylvatique où l'infection est maintenue entre le vecteur et l'hôte vertébré sauvage naturel (généralement des oiseaux, des rongeurs ou des primates). Dans ce cas, l'infection peut être « terminale » lorsque le vertébré ne peut transmettre le virus, qu'il ait développé ou non la maladie.

Un cycle d'amplification dans lequel certains arbovirus importants en termes de santé publique sont impliqués. Ce dernier va modifier le cycle classique de transmission des arbovirus (figure 2). En effet, l'hôte vertébré va servir de réservoir au virus, s'il développe une virémie importante. Cela signifie que le vertébré infecté va être la source d'infection de vecteurs sains qui vont à leur tour répliquer le virus et propager l'infection à un autre vertébré sain lors d'un repas de sang. A partir de ce scénario, il émerge deux nouveaux cycles :

Un cycle rural, où le vecteur va transmettre le virus à des animaux domestiques ou le bétail, permettant une nouvelle amplification de l'infection.

Un cycle épidémique se met en place directement par la piqûre ou morsure du vecteur infecté à l'Homme, qui est un hôte accidentel. Lorsque l'individu infecté se fait piquer par de nouveaux vecteurs sains, le virus sera alors transmis à ces derniers, qui vont eux-mêmes transmettre à nouveau le virus à d'autres individus sains et ainsi créer une épidémie.

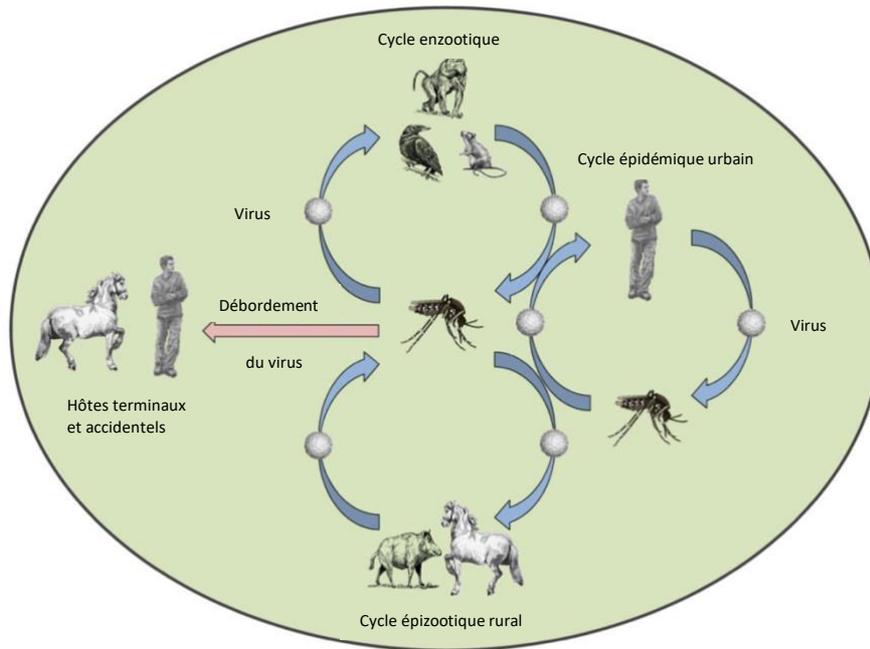


Figure 2 : Modes de transmission des arbovirus (Iranpour et al., 2016)

1.1.2 Physiopathologie des arbovirus

L'infection arbovirale se développe chez un vertébré sain suite à l'injection de salive lors de la piqûre d'un arthropode infestant. Le virus se retrouve ainsi dans la circulation sanguine. Il va se répliquer à proximité du point d'inoculation, puis dans les ganglions lymphatiques et pouvoir se disséminer dans l'organisme jusqu'aux organes cibles. L'infection entraîne ainsi une réponse immunitaire (Petersen et al., 2013).

La majorité des infections par les arbovirus sont soit asymptomatiques, soit bénignes. Néanmoins, il est possible de regrouper les arbovirus selon le type de manifestations cliniques principales qu'ils provoquent :

- Les polyalgies fébriles (ou syndrome *dengue-like*) ;
- Les fièvres hémorragiques ;
- Les méningo-encéphalites.

Différents arbovirus peuvent être responsables de l'apparition de symptômes identiques. Les virus de la dengue et de la fièvre jaune provoquent des fièvres sévères. A l'inverse, un même virus peut provoquer, plusieurs types de symptômes, comme dans le cas du virus de la

dengue. En effet, ce virus peut être responsable de nombreux symptômes de type grippal ou encore de fièvres hémorragiques.

On répertorie aujourd'hui plus de 130 arbovirus pathogènes pour l'Homme. Parmi ces derniers, on retrouve les *Alphavirus* et les *Flavivirus*. Je détaillerai par la suite uniquement les *Flavivirus*.

I.2 Flavivirus

I.2.1 Classification

Les *Flavivirus* appartiennent à la famille des *Flaviviridae*. Cette famille de virus tient son nom du virus de la fièvre jaune qui tient son origine du mot latin *flavus* signifiant jaune, car il cause la jaunisse chez les patients infectés.

La famille des *Flaviviridae* compte plus d'une centaine d'espèces actuellement. Elle est divisée en 4 grands genres (Simmonds et al., 2017) :

- *Hepacivirus*, tel que l'hépatite C ;
- *Pestivirus* qui comprend le virus de la diarrhée virale bovine ;
- *Pegivirus* incluant le virus de l'hépatite G (HGV) ;
- *Flavivirus* comme le virus de la dengue et le virus zika.

Selon la classification de Baltimore, les *Flavivirus* appartiennent aux virus du groupe V, possédant un ARN simple brin positif et sont actuellement le genre le plus représenté de la famille des *Flaviviridae*. Le genre *Flavivirus* contient plus de 70 espèces, dont les principales sont les virus de la fièvre jaune (YFV), de la dengue (DENV), de l'encéphalite japonaise (JEV), du Nil occidental (WNV) ou encore zika (ZIKV).

Des études phylogénétiques ont permis de diviser les *Flavivirus* en deux grands groupes. Ceux dont le vecteur est inconnu et ceux dont le vecteur est connu. Parmi les virus dont le vecteur est connu, on distingue ceux transmis par les tiques et ceux transmis par les moustiques (Billoir et al., 2000; Kuno et al., 1998)(figure 3).

Au sein des virus transmis par les moustiques, on distingue à nouveau deux groupes (figure 3):

- les virus neurotropes, causant des encéphalites chez l'Homme et le bétail ;
- les virus non neurotropes, associés à des hémorragies chez l'Homme, (Gaunt et al., 2001).

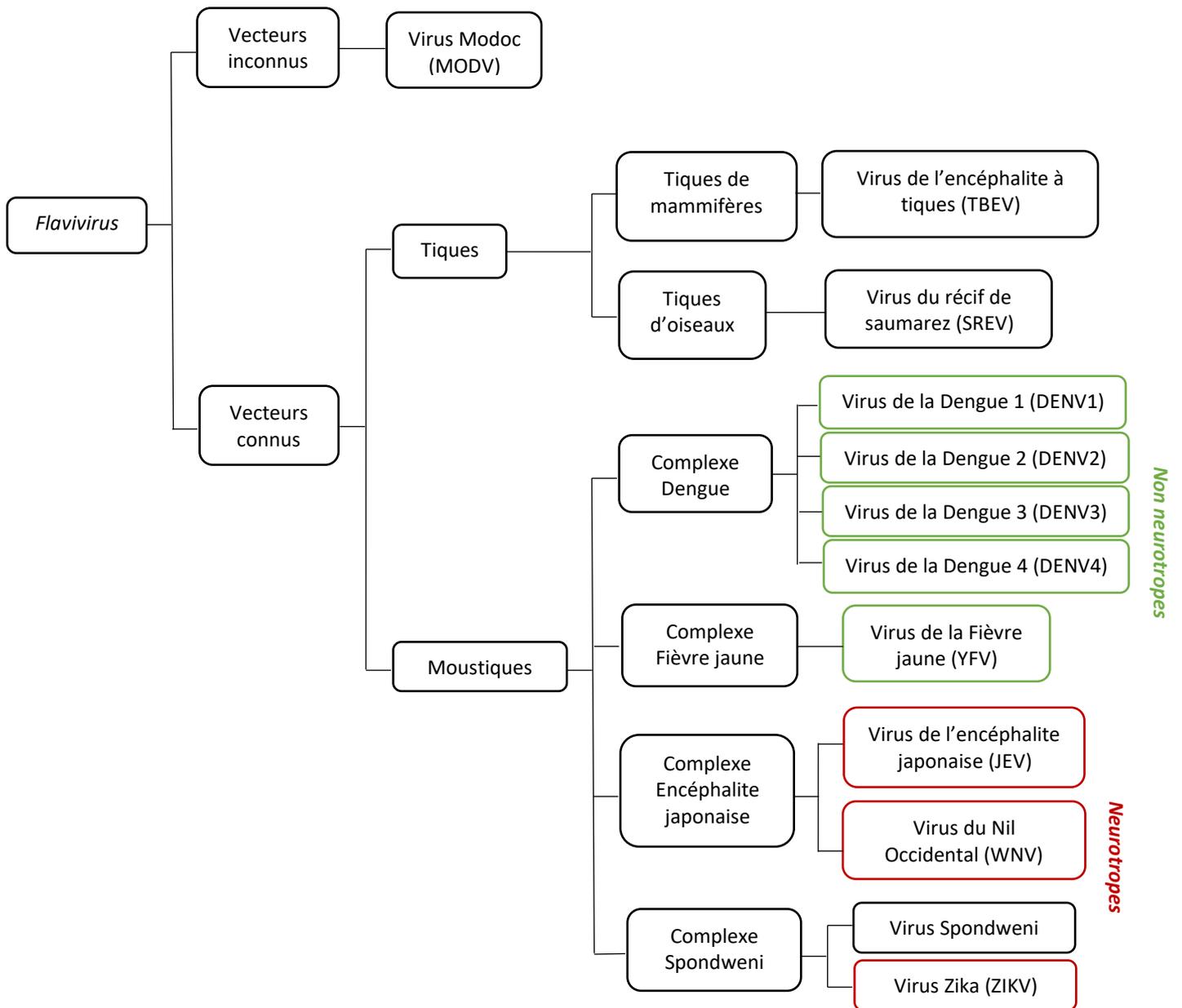


Figure 3 : Classification de quelques Flavivirus selon leurs vecteurs

1.2.2 Biologie des Flavivirus

a) Structure du virion

Les virions des *Flavivirus* possèdent une forme sphérique avec un diamètre de 40 à 60 nm. Ils sont constitués d'un simple brin d'ARN à polarité positive, protégé par une capsidie et d'une bicouche lipidique dans laquelle deux protéines d'enveloppe sont incluses (figure 4) (Simmonds et al., 2017)

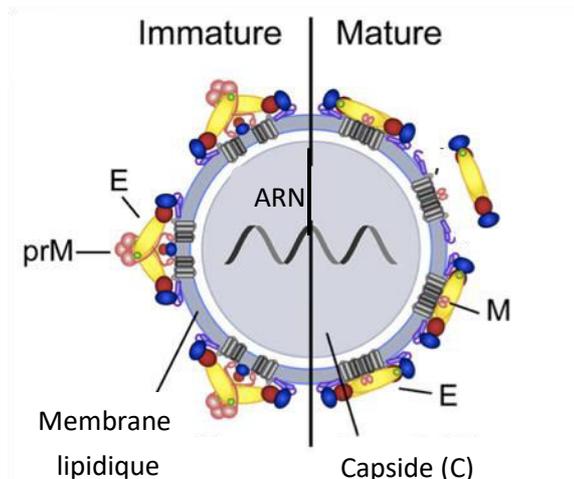


Figure 4 : Structure d'une particule virale de Flavivirus (Heinz and Stiasny, 2012)

prM : précurseur de la protéine de membrane ; *E* protéine d'enveloppe ; *M* : protéine de membrane ; *C* : capside.

La capside est composée de 120 acides aminés, elle est impliquée dans l'empaquetage du génome viral et la formation du noyau nucléocapsidique (Mukhopadhyay et al., 2005).

Les protéines d'enveloppe *prM* et *E* sont des glycoprotéines possédant deux hélices transmembranaires. Les protéines *prM* sont présentes sur les virions immatures, et interviennent comme chaperonnes dans le repliement et l'assemblage des protéines *E* (Lorenz et al., 2002). Elles sont ensuite clivées pendant la maturation afin de donner des virions matures constitués des protéines *M* et *E*.

Les dimères de protéines *E* possèdent un (des) site(s) de liaison au récepteur cellulaire et un peptide de fusion, permettant ainsi l'entrée des virions dans la cellule hôte (Lorenz et al., 2002; Mukhopadhyay et al., 2005).

b) Le génome viral

Le génome des *Flavivirus* est composé d'un simple brin d'ARN à polarité positive d'environ 9,2-11 kb. Il possède un seul cadre de lecture ouvert ou ORF (Open Reading Frame) délimité par des extrémités 5' et 3' non codante. Ces dernières forment des structures secondaires nécessaires à la réplication et à la traduction.

L'ARN viral est traduit en un seul polypeptide qui, une fois clivé par différentes protéases, donne dix protéines :

- trois protéines structurales : la protéine de capside (*C*), la protéine d'enveloppe (*E*) et la protéine de membrane (*M*) ;
- sept protéines non structurales : NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5 (figure 5).

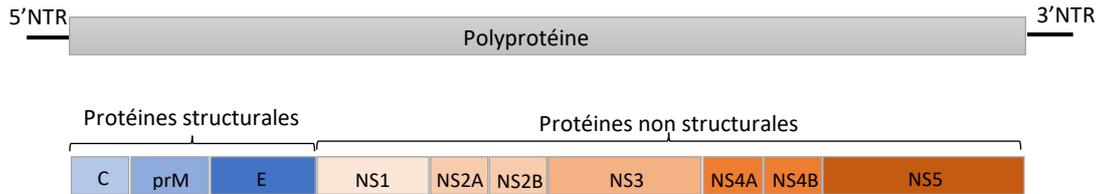


Figure 5 : Organisation du génome d'un Flavivirus

La traduction est permise grâce à la présence d'une coiffe à l'extrémité 5' (Simmonds et al., 2017). L'extrémité 3' ne possède pas de queue poly(A) mais forme une structure en boucle, conduisant à la formation d'un ARN subgénomique (sRNA) (Chapman et al., 2014). Cet ARN subgénomique joue un rôle essentiel dans la pathogénicité et intervient dans la modulation de la réponse antivirale des cellules (Heinz and Stiasny, 2012; Chapman et al., 2014; Manokaran et al., 2015).

c) Cycle de réplication

Le processus infectieux débute par l'attachement de la particule virale sur la membrane de la cellule hôte (figure 6). Il s'effectue par interaction et liaison à des récepteurs cellulaires, notamment avec les glycoaminoglycanes (GAGs) tels que les héparanes sulfates présents à la surface cellulaire. Dans le cas de la dengue (DENV) cet attachement se fait via l'interaction entre les motifs de liaison aux glycoaminoglycanes, présents sur la partie C terminale de la protéine d'enveloppe E et les héparanes sulfates (Chen et al., 1997; Hilgard and Stockert, 2000; Germi et al., 2002; Kroschewski et al., 2003; Okamoto et al., 2012). Récemment, une étude a pu montrer que la protéine d'enveloppe E de ZIKV est capable d'interagir avec les glycoaminoglycanes présents à la surface de cellules placentaires humaines (Kim et al., 2017).

Ce mécanisme est également décrit dans le cas de la fièvre jaune (Germi et al., 2002). De même, l'inhibition de l'infection des virus du Nil Occidental (WNV) ou de l'encéphalite japonaise (JEV) lors de l'utilisation d'héparine montre que ces derniers utilisent également les GAGs dans leur processus d'entrée (Su et al., 2001; Lee et al., 2006).

D'autres récepteurs potentiels ont été décrits dans la littérature, tels que les heat shock protéines (Hsp70/90) décrits pour DENV et JEV à la fois sur des cellules humaines (Jindadamrongwech et al., 2004; Reyes-Del Valle et al., 2005; Cabrera-Hernandez et al., 2007; Das et al., 2009; Zhu et al., 2012a; Thongtan et al., 2012) et dans les cellules de moustiques (Salas-Benito et al., 2007; Cabrera-Hernandez et al., 2007; Zhu et al., 2012a; Vega-Almeida et al., 2013). Le récepteur intégrine alpha 5 bêta 3 peut également jouer un rôle dans le processus d'entrée dans le cas de WNV et de JEV (Chu and Ng, 2004; Bogachek et al., 2010; Fan et al., 2017).

Les récepteurs lectines calcium dépendants interviennent dans l'entrée des virus tels que DENV et JEV dans les cellules humaines ou encore pour WNV dans les cellules de moustiques

(Navarro-Sanchez et al., 2003; Davis et al., 2006; Miller et al., 2008; Dejnirattisai et al., 2011; Wang et al., 2016; Liu et al., 2017).

Enfin, on retrouve aussi les récepteurs tyrosine kinase comme les TAM. Ils comprennent les récepteurs AXL et TYRO3, qui interviennent dans les infections par DENV (Kuadkitkan et al., 2010; Meertens et al., 2012; Perera-Lecoin et al., 2013) mais principalement par le ZIKV (Hamel et al., 2015; Nowakowski et al., 2016; Liu et al., 2016a; Meertens et al., 2017). En effet ces récepteurs seraient impliqués dans la reconnaissance des résidus phosphatidyl-sérine présents à la surface du virion via l'intervention de Gas-6 (Perera-Lecoin et al., 2013; Moller-Tank and Maury, 2014). Cependant selon des études *in vivo*, ces récepteurs TAM ne sont pas nécessaires à l'infection par le ZIKV chez la souris (Hastings et al., 2017; Wang et al., 2017c).

Dans le cas de ZIKV, d'autres récepteurs peuvent également être impliqués dans le processus d'attachement et/ou d'entrée, tels que les récepteurs TIM (T-cell immunoglobulin and mucin domain) ou encore les récepteurs DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-Integrin) (Hamel et al., 2015).

Pour la majorité des *Flavivirus*, la voie principale d'entrée des virions dans la cellule s'effectue par endocytose clathrine-dépendante (figure 6). L'acidification de l'endosome entraîne un changement conformationnel de la protéine E et permet la fusion entre la membrane de l'endosome et celle de la particule virale, libérant ainsi le matériel génétique du virion (figure 6) (Allison et al., 1995; Mukhopadhyay et al., 2005; Stiasny and Heinz, 2006).

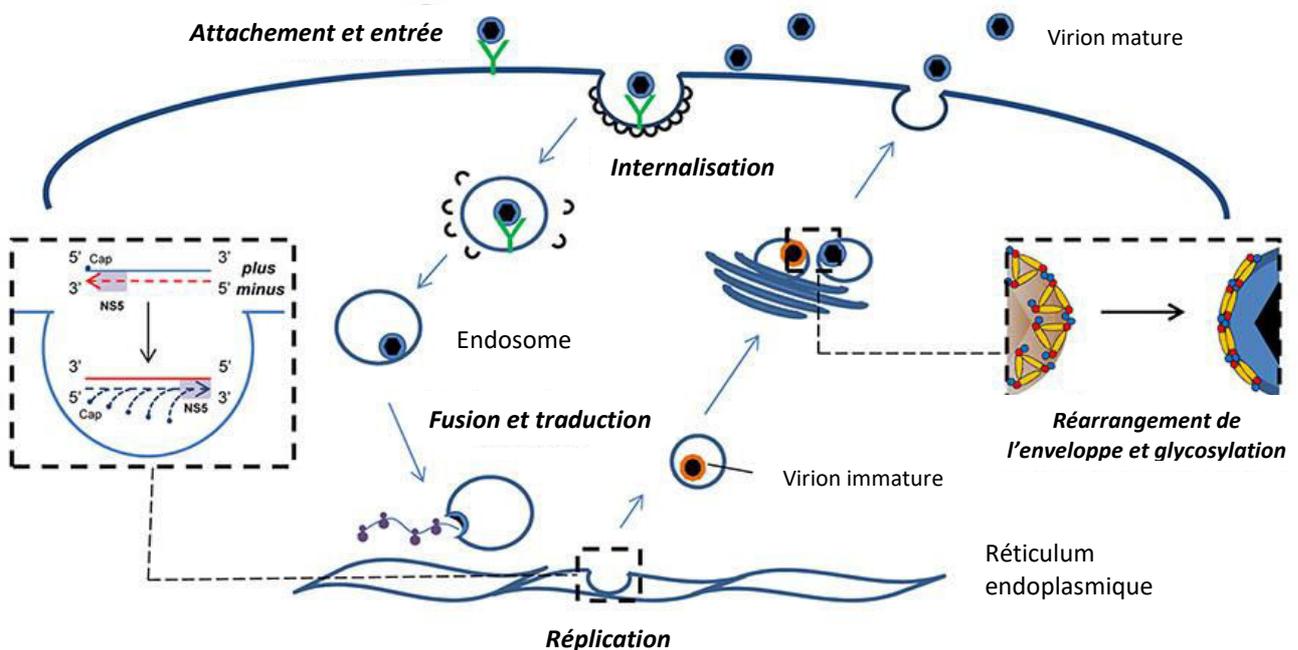


Figure 6 : Cycle de réplication d'un Flavivirus (adapté de (Fernández-Sanlés et al., 2017))

L'ARN simple brin est ensuite traduit en une seule polyprotéine. Cette dernière est ensuite clivée par des protéases virales et cellulaires afin de donner les trois protéines

structurales (C, prM (précurseur de M) et E) et les sept protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5).

La réplication de l'ARN et l'assemblage des protéines virales se déroulent au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Les nouvelles particules virales immatures, constituées des protéines structurales et d'ARN, vont bourgeonner et migrer jusqu'à l'appareil de Golgi. Les protéines prM des particules non infectieuses vont ensuite être clivées par des protéases cellulaires, les furines, permettant ainsi la formation de virions matures infectieux. Ces derniers seront relargués dans le milieu extra cellulaire par exocytose (figure 6).

1.2.3 Mode de transmission

Les arthropodes tels que les moustiques et les tiques sont les principaux vecteurs des *Flavivirus*. De façon générale, le cycle de transmission des *Flavivirus* est très semblable à celui des arbovirus (figure 1).

La grande majorité des *Flavivirus* d'intérêt médical sont transmis principalement par les moustiques du genre *Aedes* et *Culex*.

1.2.4 Physiopathologie

Les principaux *Flavivirus* d'intérêt médical humains (YFV, JEV, WNV, DENV et ZIKV) sont le plus souvent asymptomatiques ou entraînent certains symptômes bénins de type pseudo grippal. Dans la minorité des cas symptomatiques, de pourcentage variable selon les populations touchées, ces virus peuvent induire des pathologies plus ou moins sévères qui sont classées en trois types de syndromes : les syndromes aigus fébriles (DENV, WNV et ZIKV), les syndromes encéphaliques (JEV, WNV, ZIKV) et les syndromes hémorragiques (DENV, YFV). Il est difficile de pouvoir classer ces différents virus par types de pathologies associées. Dans le cas de DENV par exemple elle ne peut être définie comme une maladie hémorragique car il ne s'agit que d'un faible pourcentage de cas. La définition de maladie sévère par l'OMS a variée au fil du temps (Flamand et al., 2017; da Silva et al., 2018). Ces classifications sont utiles surtout en usages cliniques dans la prise en charge des patients.

La dengue est une maladie de type grippal à manifestations normales à sévères survenant après une incubation du virus de 4 à 10 jours. La maladie peut évoluer de différentes façons et donne ainsi trois formes de dengue possibles :

- Une dengue classique, avec une forte fièvre (40°C) associée à des céphalées, des douleurs musculaires, articulaires, oculaires, des nausées, des vomissements, une éruption cutanée. Elle dure dans ce cas environ une semaine.
- Une dengue sévère ou hémorragique (DH), elle survient généralement entre 3 à 7 jours après les premiers symptômes de la maladie conjointement à une chute de fièvre chez l'enfant (entre 2 et 14 ans). Elle est caractérisée par l'apparition d'hémorragies surtout digestives.

- Une dengue avec syndrome de choc (DSC), c'est une complication qui peut survenir suite à une dengue hémorragique. Elle résulte d'une fuite plasmatique massive et soudaine (épanchement pleural, élévation de l'hématocrite > 20%). Le risque de développer une DSC est trois fois supérieur lors d'une ré-infection. Dans 20% des cas, la mort survient dans les 24 à 48h (Guzman and Harris, 2015a; WHO, 2018a).

La fièvre jaune est une hépatonéphrite hémorragique. Le virus incube silencieusement pendant 3 à 6 jours et de nombreuses personnes infectées ne présentent aucun symptôme. Cependant lorsqu'il y a symptômes, la maladie évolue en deux phases :

- Une phase dite « rouge » (de 2 à 4 jours) avec une montée brutale de fièvre, des yeux injectés de sang, des céphalées, des rachialgies, une soif vive, des vomissements. Dans la plupart des cas, ces symptômes disparaissent après 3 à 4 jours.
- Une phase dite « jaune » qui survient chez 15% des patients 24h après la phase de rémission, avec une nouvelle montée de fièvre, des vomissements noirs marc de café (*vomito negro*), des hémorragies digestives, une protéinurie importante, une adynamie.

C'est au cours de cette phase que les patients peuvent développer la jaunisse. La mort survient ensuite dans les 7 à 10 jours dans 50% des cas suite aux hémorragies et aux myocardites par exemple (Monath and Vasconcelos, 2015).

Dans le cas de l'encéphalite japonaise, on n'observe le plus souvent aucuns symptômes. Uniquement 1 cas sur 250 s'avère symptomatique après 5 à 15 jours d'incubation silencieuse. La maladie peut se manifester soit par une fièvre aiguë sans gravité associée à une migraine, soit sous sa forme plus sévère. Dans ce cas, on observe une rapide montée de fièvre, des raideurs au niveau de la nuque, avec l'apparition d'une méningite sans atteinte encéphalique ou encore une encéphalite avec ou sans atteinte méningée (le liquide céphalo-rachidien étant normal dans 30 à 50% des cas).

Le taux de mortalité est généralement supérieur à 30% dans les cas où la maladie provoque des symptômes. Parmi les patients qui survivent, 20 à 30% développent des troubles neurologiques et/ou comportementaux permanents tels que des paralysies, des troubles de la mémoire ou même une incapacité de parler (Unni et al., 2011; Yun and Lee, 2014).

Lors d'une infection par le virus du Nil Occidental on observe une période d'incubation de 3 à 14 jours et environ 80% des infections sont asymptomatiques. Cependant dans 20% des cas l'infection peut également provoquer une simple fièvre, des nausées, des éruptions cutanées et le renflement des ganglions lymphatiques. Les symptômes retrouvés dans les formes sévères sont des signes neurologiques (coma, désorientation), des paralysies flasques, des convulsions avec un risque important de mort. Dans 1 cas sur 150, les sujets de plus de 50 ans ou les personnes immunodéprimées peuvent développer une forme dite neuro-invasive. Aux États-Unis, 20% des infections par le WNV entraînent une néphropathie (Petersen et al., 2013).

1.2.5 Épidémiologie

L'émergence ou la ré-émergence des *Flavivirus* ces dernières années pourrait s'expliquer par la capacité des virus à s'adapter à de nouvelles espèces de vecteurs et d'hôtes, l'urbanisation, les changements climatiques et bien d'autres facteurs, déclenchant ainsi des épidémies dans des zones jusqu'à lors non concernées (Go et al., 2014).

Le virus de la dengue (DENV) a été isolé pour la première fois en 1943 au Japon (Hotta, 1952). Il existe 4 sérotypes différents de DENV. La dengue est présente dans plus de 128 pays actuellement à travers l'Afrique, le continent Américain, l'Asie du Sud-Est ou encore dans l'Ouest du Pacifique (figure 7A)(Guzman and Harris, 2015b; Iranpour et al., 2016). Ce virus est le seul arbovirus qui a pu s'adapter entièrement à l'Homme comme hôte privilégié, ne nécessitant plus de cycle sylvatique pour se propager (Iranpour et al., 2016).

D'après l'OMS il y a environ 390 millions d'infections par le DENV par an dans le monde entier avec en moyenne 96 millions de cas cliniques. Chaque année environ 500000 personnes développent une dengue sévère nécessitant une hospitalisation avec un taux de mortalité de 2,5% (WHO, 2018a).

Depuis le début de l'année 2018, l'île de La Réunion, subit une épidémie de dengue. On recense au mois de Septembre 6573 cas confirmés d'infection par le DENV avec seulement 8 cas importés. Le seul sérotype actuellement identifié sur l'île parmi les cas autochtones est DENV-2. On reporte également 4 décès, dont 3 directement liés à DENV et 1 indirectement lié à la maladie (Cire Océan Indien, 2018).

Le virus de la fièvre jaune (Yellow Fever Virus, YFV ou encore virus Amaril) est endémique d'Amérique du Sud et d'Afrique (figure 7B) où il a été isolé pour la première fois en 1927 (Barrett and Higgs, 2007) . Cette maladie concerne 47 pays, ce qui représente environ 900000 personnes infectées.

En 2013, une étude de l'OMS estime à 200000 le nombre de nouveaux cas de fièvre jaune chaque année, avec environ 30000 décès suite à l'infection. En 2015, on recensait 970 cas avérés et 140 décès en Angola. Puis en 2017, le Brésil a été sévèrement touché avec 800 nouveaux cas et plus de 250 morts (WHO, 2018b).

Le virus du Nil Occidental (West Nile Virus, WNV) a été isolé pour la première fois en Ouganda en 1937 (Smithburn et al., 1940). Il cause sa première épidémie sur le continent américain en 1999. Les Hommes et les autres grands mammifères comme les chevaux sont considérés comme des impasses épidémiologiques (Go et al., 2014). Désormais, ce virus circule en Europe, en Amérique et en Asie et semble avoir une distribution globale proche de celle de la dengue, notamment avec une présence dans des zones tropicales ou subtropicales (Asie du Sud-Est et Pacifique) (figure 7C) (Go et al., 2014; Iranpour et al., 2016).

Entre 1999 et 2006, on a recensé plus de 23000 cas de WNV sur le continent américain dont 41% de formes graves et 982 décès suite à l'infection. Il ré-émerge en France entre les

années 2000 à 2008 avec une dizaine de cas humains et 120 cas d'encéphalites équine recensés. Deux cas d'encéphalites ont été également décrits à Madagascar en 2001-2002. De même, à La Réunion un cas d'encéphalite a été diagnostiqué chez une femme de retour de Madagascar (Tantely et al., 2016).

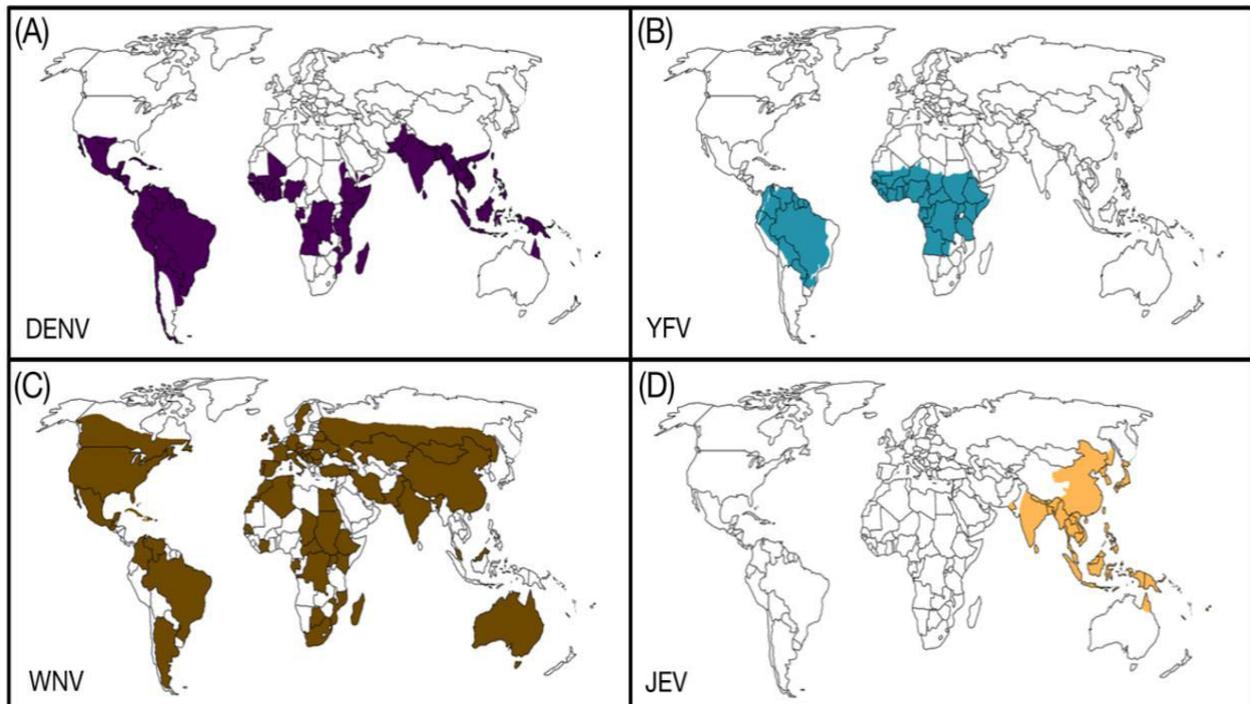


Figure 7 : Distribution mondiale des Flavivirus d'intérêt médical majeur (adapté de (Iranpour et al., 2016)).

Le virus de l'encéphalite japonaise (Japanese Encephalitis Virus, JEV) est isolé pour la première fois en 1935 (Lewis and Taylor, 1947). Ce virus est présent en Asie du Sud et de l'Est (figure 7D)(Iranpour et al., 2016), c'est à dire qu'il circule dans plus de 24 pays et concerne plus de 3 milliards de personnes. En 1995, JEV cause pour la première fois une épidémie en Inde (Kabilan et al., 2004; Tiwari et al., 2012). Ce virus touche des individus de tout âge, mais infecte principalement les enfants. En effet, de nombreux adultes vivant dans les zones endémiques sont déjà immunisés depuis l'enfance.

L'OMS estime à 68000 le nombre de cas cliniques chaque année. Lors de complications sévères, on observe un taux de mortalité jusqu'à 30% (WHO, 2015).

I.3 Zika

I.3.1 Historique et Généralités

a) Historique

Le virus zika (ZIKV) a été isolé pour la première fois en 1947 à partir du sang d'un singe Rhesus sentinelle (*Macaca mulatta*) en Ouganda dans la forêt Zika (Dick et al., 1952). Un second isolement fut effectué à partir d'un moustique *Aedes africanus* sur le même site en 1948 (Dick, 1952; Haddow et al., 2012). Le ZIKV appartient à la famille des *Flaviviridae*, au genre *Flavivirus* et au serocomplex Spondweni. Des études ont pu mettre en évidence différentes souches du virus, une souche Africaine et une souche Asiatique, en se basant sur des alignements de séquences nucléotidiques et des acides aminés (figure 8) (Haddow et al., 2012). Une autre étude montre que la souche africaine pourrait être à nouveau divisée en deux autres souches : Afrique de l'Est et Afrique de l'Ouest en se basant sur les séquences d'acides nucléiques du gène de la protéines NS5 (Lanciotti et al., 2008).

La souche Asiatique aurait évolué à partir d'un ancêtre commun avec la souche Africaine apportant avec ses mutations une plus grande pathogénicité et un potentiel épidémique plus important. La souche Asiatique serait à l'origine de la première épidémie de zika, survenue en Micronésie dans les Iles de Yap en 2007.

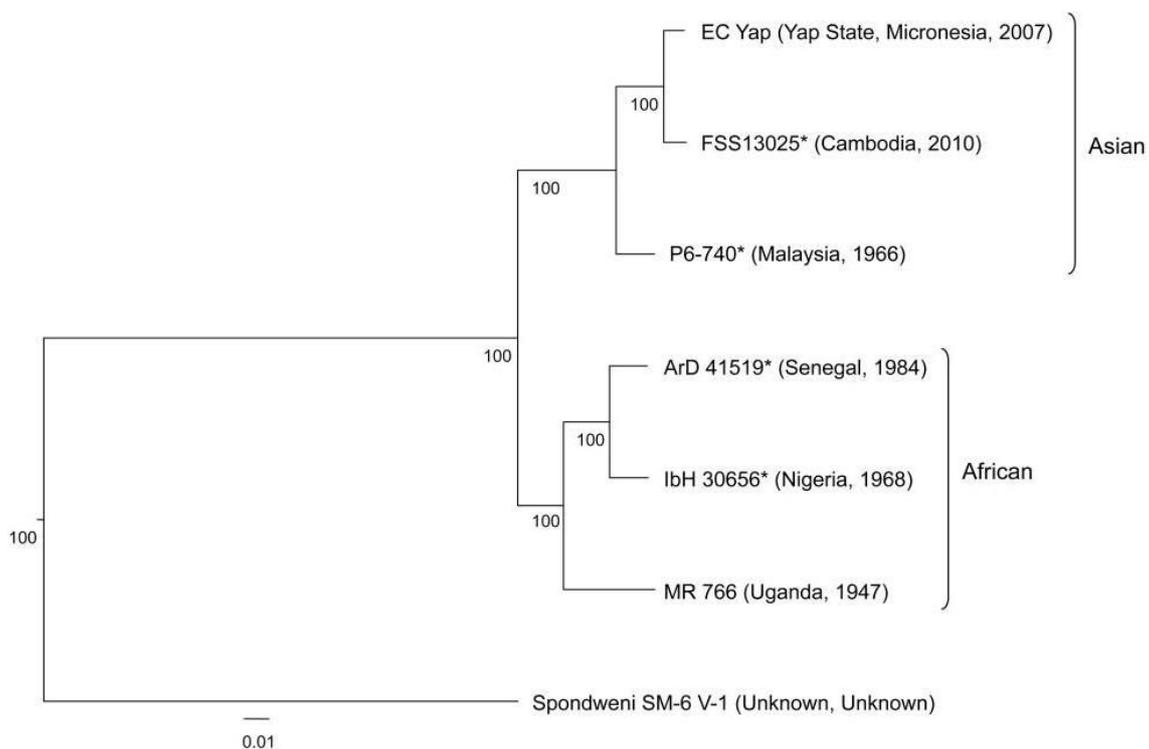


Figure 8 : Arbre phylogénétique de ZIKV à partir d'alignement de nucléotides et d'acides aminés (Haddow et al., 2012)

b) Structure et génome du virus zika

Le génome du ZIKV, comme les autres *Flavivirus* est constitué, d'un ARN simple brin positif qui code pour une seule polyprotéine. Une fois clivée, elle produit trois protéines structurales (pré-M, E et la capsid C) et sept protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (figure 5). Ces protéines structurales et non structurales sont essentielles au bon fonctionnement de la particule virale afin de permettre sa propagation dans les cellules hôtes.

Sa particule virale observée en microscopie électronique, est semblable à celles de nombreux autres *Flavivirus*, avec en surface les protéines d'enveloppe (E) et de membrane (pré-M et M) (Sirohi et al., 2016). La protéine de capsid C joue un rôle primordial dans l'assemblage et la protection du génome viral et forme ainsi la nucléocapsid. La protéine d'enveloppe E est associée aux mécanismes d'attachement, d'internalisation et de fusion des particules infectieuses avec les cellules hôtes. Elle possède également un rôle dans l'inhibition de la mise en place du système immunitaire (Mottin et al., 2018). Il s'agit d'une cible primordiale dans la recherche d'antiviraux. Des antiviraux efficaces sur la protéine E empêcheraient l'attachement des virions sur la cellule et donc l'absence d'initiation du cycle viral. La protéine prM possède plusieurs rôles dans le cycle viral des *Flavivirus*, comme assurer le bon repliement des protéines E ou encore empêcher une exocytose prématurée des virions immatures (Mottin et al., 2018).

La glycoprotéine NS1, associée à des lipides sous forme homodimérique dans la cellule infectée est essentielle à l'infection et particulièrement à la réplication virale (Song et al., 2016). Elle peut également être sécrétée dans le cytoplasme sous une forme hexamérique. Cette forme est impliquée dans les processus de pathogénicité par interaction avec des composés impliqués dans la réponse immunitaire (Suthar et al., 2013). Cependant malgré les fortes ressemblances, la NS1 de ZIKV semble être totalement unique de par son interface électrostatique différente de celle de DENV ou de WNV, impliquant peut être une spécificité dans son rôle dans l'infection par le ZIKV et constituant potentiellement une cible pour une nouvelle approche thérapeutique (Song et al., 2016).

La protéine NS3 du ZIKV est relativement semblable à celle d'autres *Flavivirus*, avec la présence de deux domaines fonctionnels : un domaine protéase et un domaine hélicase, formant ainsi le complexe NS2B/NS3 essentiel à la formation de la polyprotéine finale avec des formes plus ou moins « ouvertes » pour permettre l'activité enzymatique (Lei et al., 2016; Zhang et al., 2016). Ce complexe apparaît donc comme une excellente cible pour la recherche d'antiviraux anti-*Flavivirus*.

La protéine NS5 essentielle à la réplication, est constituée également de deux domaines distincts : le domaine méthyltransférase N-terminal (MTase) responsable de la structure 5' « coiffée » afin d'assurer la stabilité et l'efficacité de la traduction ; le domaine ARN polymérase ARN dépendant C-terminal (RdRp), responsable de la réplication (Coloma et al., 2016; Duan et al., 2017; Zhao et al., 2017). De plus, la protéine NS5 est impliquée dans la réponse antivirale en agissant en tant qu'antagoniste de l'interféron de type I, par dégradation

de la protéine STAT2 directement ou indirectement (Grant et al., 2016; Kumar et al., 2016; Dar et al., 2017; Chaudhary et al., 2017). Malgré quelques différences dans la répartition des charges dans la structure C-terminale de NS5 (Godoy et al., 2017), la forte conservation de structure entre la protéine NS5 de ZIKV et de JEV permet de mieux comprendre le rôle de la protéine dans le cycle viral (Upadhyay et al., 2017). La conservation de structure de ces différentes protéines pourraient permettre le développement de molécules antivirales spécifiques à leurs sites actifs (Zhang et al., 2014; Wang et al., 2017a).

1.3.2 Tropisme et physiopathologie du virus zika

Depuis l'isolement de ZIKV en 1947 et jusqu'en 2007, quelques cas sporadiques ont été dénombrés avec des symptômes peu importants lorsque la maladie se manifeste, car la maladie est symptomatique dans 20% des cas seulement. Il s'agit de symptômes pseudo grippaux semblables à ceux décrits pour la dengue, avec de la fièvre, des douleurs articulaires et musculaires, des éruptions cutanées, des migraines ou encore des conjonctivites, qui peuvent durer quelques jours à une semaine (Petersen et al., 2016). Ces symptômes peuvent être expliqués en partie, par la permissivité de diverses cellules au virus, telles que les fibroblastes, les kératinocytes, les cellules dendritiques ou encore des cellules épithéliales pulmonaires humaines (Hamel et al., 2015; Frumence et al., 2016).

Cependant dans certains cas, notamment depuis la propagation de ZIKV et les nombreuses épidémies dans le monde entier, de nombreuses études ont mis en évidence un lien entre l'infection par ZIKV et l'apparition de complications neurologiques, telles que le syndrome de Guillain-Barré chez l'adulte (Oehler et al., 2014; Cao-Lormeau et al., 2016; Watrin et al., 2016) ou encore les microcéphalies chez les nourrissons (Calvet et al., 2016; Jouannic et al., 2016). En effet, une étude a mis en évidence une microcéphalie chez un fœtus dont la mère avait été infectée par ZIKV (Mlakar et al., 2016). Depuis de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont démontré le tropisme de ZIKV au niveau cérébral. Des dommages ont été observés dans diverses régions du cerveau suite à une infection chez des souris par ZIKV (Bell et al., 1971; Weinbren and Williams, 1958). De même *in vitro*, une infection de cellules progénitrices neurales par le ZIKV entraîne une perturbation du cycle cellulaire normal et une augmentation de la mort cellulaire ayant pour conséquence une diminution de leur prolifération (Tang et al., 2016). Ces dommages peuvent être causés par la traversée de la barrière hémato-encéphalique par le virus, permettant ainsi l'infection des cellules endothéliales du cerveau et des cellules neurales (Alimonti et al., 2018).

De nombreuses études, ont pu mettre en évidence la présence de ce virus dans les fluides corporels : le sang, la salive (Musso et al., 2015a), les urines (Fonseca et al., 2014; Gourinat et al., 2015; Shinohara et al., 2016), le lait maternel (Besnard et al., 2014; Dupont-Rouzeyrol et al., 2016). Une virémie très importante est aussi retrouvée dans le sperme (Mansuy et al., 2016). La présence de ZIKV dans d'aussi nombreux fluides corporels autres que le sang augmente les risques de transmission d'Homme à Homme.

L'infection des cellules pourrait se faire par l'intervention de nombreux récepteurs cellulaires, tels que DC-SIGN, les récepteurs TAM AXL et Tyro3 ou encore TIM-1, avec une prédominance pour le récepteur AXL (Hamel et al., 2015; Liu et al., 2016a). Par exemple, la présence du récepteur AXL au niveau des cellules de testicule ou de l'épididyme de souris, permet une infection par le virus entraînant une atrophie de ces tissus (Ma et al., 2016). La permissivité de ces cellules peut expliquer la présence du virus dans le sperme de certains patients et la possibilité d'une transmission sexuelle. De plus, ZIKV est capable de déclencher la réponse immunitaire via une interaction avec les récepteurs viraux TLR3, RIG-1 et MDA5 et la transcription de nombreux facteurs antiviraux, les ISG (interferon-stimulated genes) (Hamel et al., 2015). Cette réponse immunitaire a également été prouvée chez des patients infectés pendant la phase aiguë, avec l'augmentation de cytokines et une forte production de lymphocytes T activés (Tappe et al., 2016).

ZIKV est capable d'infecter d'autres types de cellules, plus particulièrement les cellules du placenta ou du cordon ombilical (Costa et al., 2016), montrant sa capacité à traverser la barrière placentaire et infecter le fœtus durant le premier trimestre de grossesse.

1.3.3 Mode de transmission

Le mode de transmission de ZIKV est semblable, à ceux d'autres *Flavivirus*, avec probablement un cycle sylvatique entre des primates et les moustiques du genre *Aedes*. Comme pour les autres *Flavivirus*, l'Homme est alors un hôte accidentel. Cependant, il arrive que la charge virale chez l'Homme soit suffisante pour permettre l'infection d'un nouveau vecteur qui va lui-même pouvoir infecter un nouvel individu, déclenchant ainsi une épidémie. Les moustiques les plus impliqués sont principalement les *Aedes aegypti* et de façon moins importante les *Aedes albopictus* (Wong et al., 2013; Marcondes and Ximenes, 2016).

Outre une transmission vectorielle, des suspicions de cas de transmissions sexuelles ont également été rapportés dès 2008 chez des sujets revenant du Sénégal, (Foy et al., 2011) chez des patients atteints lors de l'épidémie de Polynésie Française (Musso, et al. 2015), et à propos de cas autochtones en Italie en 2014 (Venturi et al., 2016).

Certains cas de transmission verticale, de mère à l'enfant, sont également suspectées lors d'une infection virale par le ZIKV pendant la grossesse (Besnard et al., 2014). Une étude a pu aussi montrer la possibilité d'une transmission prénatale, de façon trans-placentaire avec la présence de ZIKV dans les cellules placentaires et du cordon ombilical (Costa et al., 2016).

La possibilité d'une transmission périnatale a déjà été décrite pour de nombreux autres *Flavivirus*, pour le DENV, le YFV ou encore le WNV (Tan et al., 2008; Adam et al., 2010; Bentlin et al., 2011; Stewart et al., 2013). La transmission peut se faire de différentes façons, lors de l'accouchement, ou même lors du repas par le lait maternel.

La transfusion sanguine est également un mode de transmission possible de virus, d'Homme à Homme, déjà décrit notamment pour le DENV et le WNV (Stramer et al., 2005; Tambyah et al., 2008). Des études ont montré que des donneurs de sang avait été testés positifs pour ZIKV lors de l'épidémie, avec notamment l'apparition de symptômes le

lendemain du don de sang, apportant ainsi un risque de contamination lors de la transfusion chez les receveurs (Musso et al., 2014; Bierlaire et al., 2017).

1.3.4 Épidémiologie

Le véritable premier cas humain de zika a été décrit en 1952 en Ouganda. Puis uniquement quelques cas sporadiques sont recensés en Afrique équatoriale, au Nigéria ou encore en Indonésie (Pellissier, 1954; Fagbami, 1979; Olson et al., 1981).

La première épidémie est décrite en Micronésie dans les îles de Yap en 2007 (figure 9). On estime que plus de 73% de la population, soit environ 5000 personnes, aurait été infectée par le ZIKV (Duffy et al., 2009). Les symptômes retrouvés chez les patients infectés sont semblables à ceux décrits classiquement lors d'une infection par un autre arbovirus comme DENV.

En 2013, survient une nouvelle épidémie, cette fois en Polynésie Française (figure 9). Le taux d'infection de la population est estimé à 10% environ. En plus des symptômes classiques, lors de cette épidémie, on note l'apparition de complications neurologiques notamment le syndrome de Guillain-Barré (Oehler et al., 2014; Cao-Lormeau et al., 2016; Watrin et al., 2016). De plus, des études rétrospectives ont pu mettre en évidence des cas de malformations et de dysfonctionnement cérébral chez des nouveaux nés, mais également une augmentation du taux d'incidence de microcéphalies lors de cette épidémie (Besnard et al., 2016; Cauchemez et al., 2016).

Suite à cette épidémie, le virus a continué sa propagation dans le pacifique, avec de plus petites épidémies en Nouvelle Calédonie, dans les îles de Pâques, les îles Cook (Roth et al., 2014; Dupont-Rouzeyrol et al., 2015; Tognarelli et al., 2016). En 2015 également, au Vanuatu, dans les îles Solomon, Samua, et les Fiji. D'autres cas sont importés au Japon, au Canada, en Italie, en Allemagne et en Angleterre (Paixão et al., 2016).

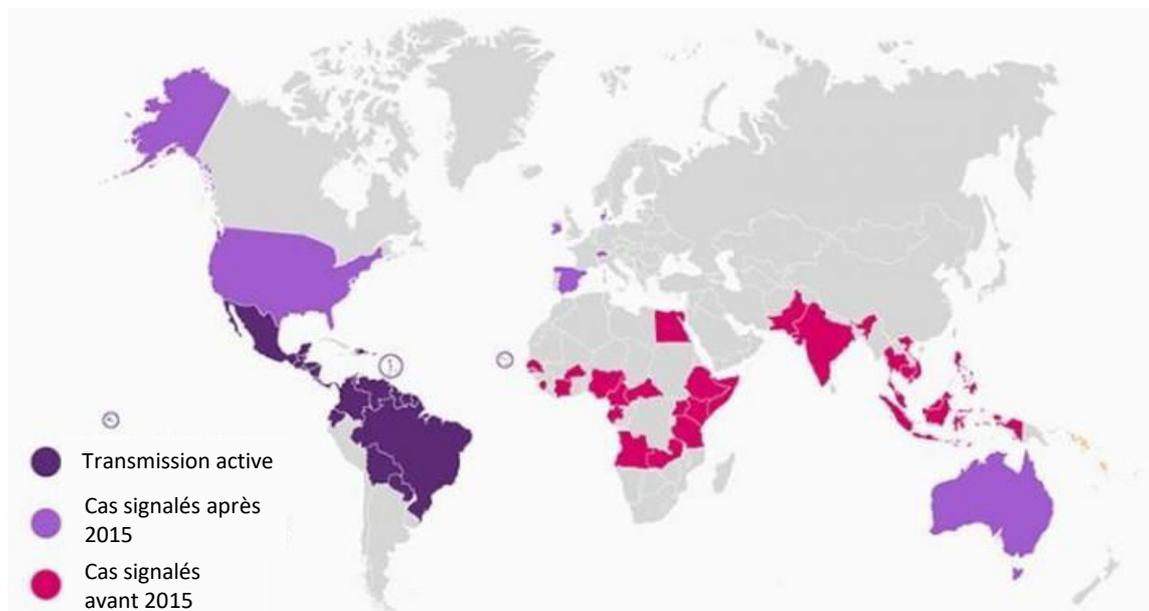


Figure 9 : Propagation du ZIKV à travers le monde (Centers for Diseases Control and Prevention, Février 2016)

C'est en mars 2015 que le virus gagne le continent américain, en touchant premièrement le Brésil (Zanluca et al., 2015) puis s'étend à la majorité du territoire. En 2016, l'OMS déclare zika comme une « urgence de santé publique mondiale ». De même qu'en Polynésie Française, on observe lors de cette épidémie une augmentation de l'incidence du nombre de complications neurologiques, avec une augmentation des cas de syndrome de Guillain-Barré chez l'adulte (Salinas et al., 2017) mais aussi du nombre de cas de microcéphalies chez les nouveaux nés, qui seraient liés à une infection de la mère pendant la grossesse (de Araújo et al., 2016; Cunha et al., 2017). Le lien entre les infections par le ZIKV et les microcéphalies a été renforcé par une étude récente qui a pu mettre en évidence une superposition géo spatiale entre les deux (Vissoci et al., 2018). On estime de nos jours à 1,3 millions le nombre de personnes touchées par le ZIKV, uniquement au Brésil.

Actuellement selon le dernier rapport de l'OMS/PAHO (Mitchell, 2017), on recense des cas autochtones confirmés dans 48 pays et/ou territoires des Amériques.

Au total, plus de 84 pays dans le monde ont recensé des transmissions du ZIKV sur leur territoire.

I. Les stratégies antivirales

Les différentes stratégies de lutte contre les arboviroses peuvent être divisées en 3 groupes selon leurs modes d'action et/ou leur mise en place par rapport au stade d'avancement de la maladie.

- La prévention primaire qui comprend la lutte anti-vectorielle et la protection individuelle par utilisation des répulsifs cutanés ;
- La vaccination ;
- Les antiviraux (le terme « antiviraux » désigne ici les agents qui perturbent le cycle viral).

II.1 La prévention primaire

La prévention primaire reste aujourd'hui l'une des stratégies les plus efficaces dans la lutte contre les arboviroses. Il s'agit ici d'un stade préventif, pour limiter le risque d'infection. La lutte anti-vectorielle consiste à réduire ou éliminer les populations de moustiques et ainsi diminuer les risques d'infection. Selon l'OMS, elle regroupe 3 méthodes :

- la gestion environnementale par réduction, élimination des habitats larvaires et des vecteurs ;
- la lutte chimique, il s'agit de la destruction des gîtes larvaires par l'utilisation de larvicides et d'insecticides ;
- et la lutte biologique qui est fondée sur l'introduction d'organismes qui s'attaquent aux vecteurs pour en réduire la densité (poissons et petits crustacés).

La protection individuelle consiste à limiter les surfaces d'exposition, par le port de vêtements longs, et/ou les contacts avec les vecteurs par des répulsifs afin de réduire les infections. Il existe différents types de répulsifs :

- les répulsifs physiques (essentiellement des ultrasons) ;
- les répulsifs oraux (vitamine B ou thiamine) ;
- les répulsifs de contacts et odorants qui sont les mieux tolérés actuellement.

L'efficacité des répulsifs physiques et oraux a cependant été remise en cause (Croft, 2010).

Les répulsifs de contacts peuvent être d'origine synthétique ou naturelle. Ils altèrent le comportement des moustiques en les détournant de leurs cibles. Le composé synthétique répulsif le plus utilisé dans les formulations et le plus efficace est le DEET (N-N-diéthyl-m-toluamide) (Patel et al., 2016). Les répulsifs naturels sont principalement des huiles essentielles issues de plantes dont les espèces *Cymbopogon*, *Eucalyptus* et *Ocimum*, qui sont les plus étudiées pour leur activité répulsive (Nerio et al., 2010).

II.2 Les vaccins

Dans la lutte contre les maladies infectieuses et notamment virales, la vaccination est un des moyens le plus utilisé et le plus efficace pour combattre et diminuer le nombre de décès lié à ces maladies. Il existe différents types de vaccins selon leur mode de préparation :

- les vaccins issus d'agents infectieux atténués ; les virus sont amplifiés jusqu'à la perte, naturellement ou par mutation, de leur pathogénicité. Comme ils conservent leurs antigènes, ils vont pouvoir déclencher une réaction immunitaire mais seront incapables d'engendrer la maladie (Kollaritsch and Rendi-Wagner, 2013) ;

- les vaccins issus d'agents infectieux inactivés ; les virus sont produits en grande quantité puis inactivés par la chaleur ou chimiquement par utilisation de formaldéhyde (formol), ou de psoralène. Le psoralène, suite à une exposition aux ultraviolets, s'intercale entre les acides nucléiques et forme des liaisons avec les pyrimidines. Les virus inactivés perdent ainsi leur pouvoir infectieux mais gardent leur capacité à induire une réaction immunitaire (Maves et al., 2010) ;

- les vaccins synthétiques ; il s'agit de virus sans matériel génétique, possédant uniquement les protéines d'enveloppe ou encore d'ADN recombinant capables d'induire une réaction immunitaire ;

Depuis l'émergence des *Flavivirus* d'intérêt médical, de nombreuses études ont été menées en vue de développer des vaccins pour lutter contre les maladies associées.

La plupart d'entre eux sont encore au stade d'études cliniques. On en retrouve seulement quelques-uns qui sont homologués et utilisés pour lutter contre les *Flavivirus* décrits précédemment.

Parmi les vaccins vivants atténués, il y a celui contre YFV, développé par Max Theiler, à partir de la souche 17D (Theiler and Smith, 1937a, 1937b). Ce vaccin permet une protection dans 95% des cas une semaine après la vaccination. Il est systématiquement appliqué, lors d'une mise en évidence d'une épidémie, aux populations qui vivent en zone d'endémisme mais également aux voyageurs qui se rendent dans ces zones (Verma et al., 2014). Actuellement deux souches vaccinales sont utilisées, la souche 17D-214 et la souche 17DD qui apparaît plus sûre et tout aussi efficace que la souche 17D-214 (Barrett and Higgs, 2007; Pereira et al., 2015).

Il existe également un vaccin recombinant atténué ChimeriVax-JE développé par Sanofi Pasteur homologué et utilisé en Asie (Halstead and Thomas, 2010).

Concernant les vaccins issus d'agents infectieux inactivés, uniquement ceux contre JEV sont actuellement utilisés. Ces vaccins sont homologués aux États-Unis, en Europe, en Australie, au Canada, en Thaïlande, et en Corée du Sud (Tauber et al., 2007; Chen et al., 2015) avec un taux de protection se rapprochant des 100%. Un vaccin pour le WNV est homologué pour les chevaux mais la recherche du vaccin pour l'Homme est toujours en phase clinique.

Actuellement aucun vaccin synthétique n'est homologué et/ou utilisé. La majorité d'entre eux sont encore en phase clinique pour des études plus approfondies.

Dans le cas de ZIKV, de nombreuses études sont en cours pour le développement d'une stratégie vaccinale, par l'utilisation de vaccins vivant atténués (Giel-Moloney et al., 2018; Touret et al., 2018; Xie et al., 2018), inactivés (Abbink et al., 2016) ou encore synthétiques (Tebas et al., 2017; Yi et al., 2017; Gaudinski et al., 2018; Prow et al., 2018).

Il y a également le cas particulier du vaccin recombinant vivant atténué contre DENV. Un vaccin recombinant est un vaccin chimérique obtenu à partir du vaccin YF-17D, dans lequel les régions codantes pour les protéines prM et E sont remplacées par celles d'un autre virus (figure 10).

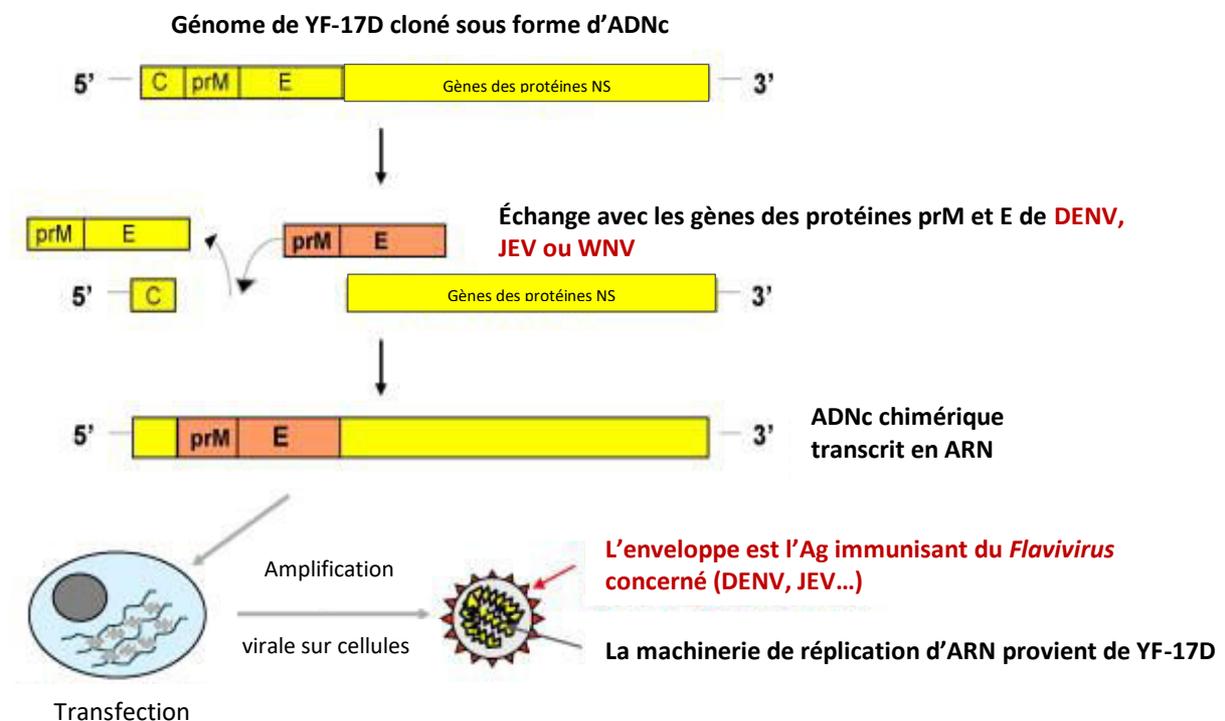


Figure 10 : Schéma de construction des vaccins recombinants selon la technique ChimeriVax (adapté de (Guy et al., 2010))

En 2015 le vaccin chimérique YF-17D-DENV développé par Sanofi Pasteur, Dengvaxia, est homologué au Mexique, puis aux Philippines et au Brésil. En 2016 Dengvaxia est alors homologué dans plus de 10 pays. Cependant, fin 2017, Sanofi Pasteur actualise les informations liées au vaccin et évoque des écarts de performance liés aux antécédents d'infection ou non des patients (Sanofi, 2017). En effet, si un individu n'ayant jamais contracté la maladie se fait vacciner, le risque de développer des formes graves suite à une infection par DENV augmente. Récemment, Sanofi a annoncé avoir obtenu un avis positif d'un comité de l'Agence européenne du médicament (EMA) pour mettre Dengvaxia sur le marché en Europe.

L'autorisation de mise sur le marché de la Commission européenne est attendue en décembre 2018 (Le Monde, 2018).

Même si les avancées des recherches sur les vaccins sont importantes et tendent vers des méthodes de plus en plus sûres, certaines polémiques comme celle concernant Dengvaxia (Barnéoud and Hecketsweiler, 2018) montrent l'importance de développer d'autres moyens de lutte efficaces mais surtout adaptés à des personnes fragiles, notamment les femmes enceintes ou les personnes âgées. Une des possibilités est par exemple l'utilisation des antiviraux.

II.3 Les antiviraux et leur mode d'action

Les antiviraux sont des molécules capables de perturber le cycle viral d'un ou plusieurs virus ralentissant ainsi l'infection. Ils peuvent agir à différents moments du cycle viral (figure 11) :

- Au niveau de la particule virale ;
- Au niveau des phases précoces du cycle, incluant l'attachement, l'entrée virale dans la cellule hôte ainsi que la fusion des virions et de la membrane cellulaire ;
- Au niveau des phases tardives, telles que la transcription, la réplication, l'assemblage et la maturation des différents éléments des particules virales ainsi que leur exocytose.

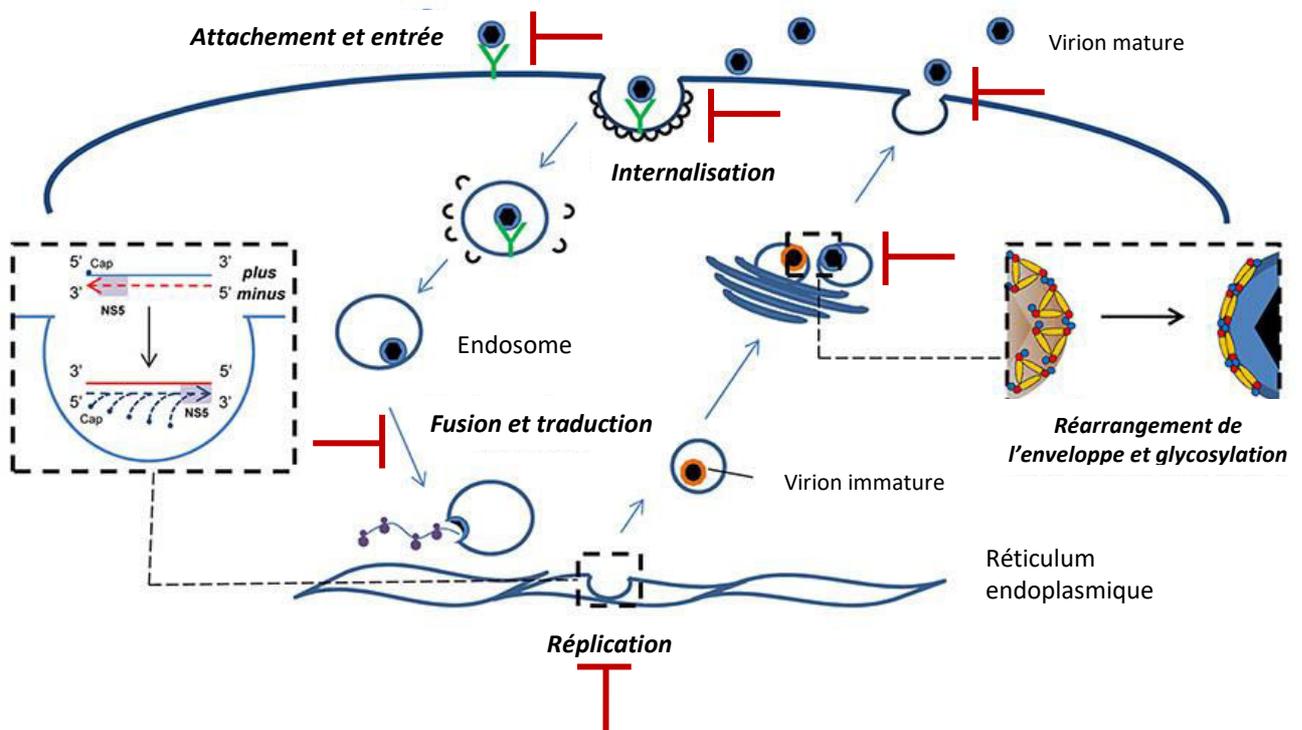


Figure 11 : Les différentes cibles d'un antiviral lors d'un cycle viral d'un Flavivirus (adapté de (Fernández-Sanlés et al., 2017))

Les antiviraux peuvent être d'origine synthétique ou naturelle. Les antiviraux naturels sont des molécules pures isolées à partir des plantes, des champignons, des levures ou encore des bactéries. On retrouve également certains extraits bruts de plantes qui démontrent d'importantes activités antivirales.

II.3.1 Inhibition directe au niveau de la particule virale (action virostatique ou virucide)

Parmi les modes d'action des antiviraux, on retrouve ceux qui agissent directement sur la particule physique virale. Ces antiviraux peuvent alors être définis comme virostatique ou virucide. Ces termes ne sont ici pris en considération que dans un contexte virus/cellule sachant qu'un virus n'est à proprement dit pas « vivant ». Une molécule ou substance virostatique ou virucide vont toutes les deux induire des modifications morphologiques d'une particule virale entraînant une perte de l'infectivité. Cependant lorsque que la molécule ou substance est virucide elle est également capable de provoquer des dommages à l'ARN ou ADN du virus.

L'efficacité d'un antiviral peut être déterminée par son index de sélectivité (SI) ou index thérapeutique (TI). Ces index permettent d'évaluer l'efficacité de la molécule comparativement à sa toxicité. Donc plus l'indice est élevé, plus la molécule est efficace et peu toxique. L'index thérapeutique est plus utilisé dans le cadre d'études *in vivo*.

L'épigallocatechine gallate (EGCG) (figure 12), un polyphénol appartenant à la famille des flavanols très abondant dans le thé, est décrit en tant qu'agent antiviral sur de nombreux *Flavivirus* d'intérêt médical comme le DENV et le WNV (Vázquez-Calvo et al., 2017). Depuis 2016, il a été décrit pour son activité anti-ZIKV où il agit soit directement sur la particule virale empêchant l'attachement de cette dernière sur la cellule (Carneiro et al., 2016; Vázquez-Calvo et al., 2017), soit par une interaction avec les protéines NS2B-NS3 (Lim et al., 2016).

De même, un autre polyphénol, la delphinidine a également été décrit pour son activité anti-ZIKV mais aussi sur d'autres *Flavivirus* comme le DENV et le WNV. Le mécanisme d'action est ici le même que dans le cas de l'EGCG avec une action directe sur la particule virale (Vázquez-Calvo et al., 2017). Ce mécanisme d'action a été décrit précédemment pour la delphinidine sur le virus de l'hépatite C (Calland et al., 2015).

II.3.2 Inhibition des phases précoces du cycle viral

Les phases précoces de l'infection se scindent en 3 étapes principales, l'attachement du virion sur la membrane cellulaire, l'entrée du virus par endocytose et la fusion de l'endosome permettant la libération du matériel génétique viral dans la cellule hôte.

a) Inhibition de l'attachement et/ou de l'entrée du virus

Comme décrit précédemment la première étape de l'infection est l'attachement du virion sur la membrane cellulaire. Cette étape est permise, dans le cas de ZIKV par différents

récepteurs, tels que certains membres de la famille des récepteurs tyrosine kinases (TAM) comme Tyro3 et Axl, les récepteurs TIM (T-cell immunoglobulin and mucin domain) ainsi que les récepteurs de type DC-SIGN (Lee et al., 2018). Ces molécules sont également des récepteurs impliqués dans l'infection par d'autres *Flavivirus* comme DENV ou WNV.

En se focalisant sur le ZIKV, depuis son importante propagation, de nombreuses molécules ont déjà fait l'objet d'études et montrent une capacité à inhiber l'attachement et/ou l'entrée de ZIKV dans la cellule.

On retrouve notamment la suramine qui est un anti parasite ayant déjà été décrit pour son activité antivirale contre le DENV (Chen et al., 1997; Basavannacharya and Vasudevan, 2014). Des études montrent que cette molécule possède également une activité anti-ZIKV. Elle bloque l'attachement du virus sur la cellule hôte, mais aussi le relargage de particules virales infectieuses. L'index de sélectivité (SI) de la suramine calculé dans l'une de ces études est de 48 (Albulescu et al., 2017; Tan et al., 2017).

D'autres molécules synthétiques ont été analysées pour leur potentiel antiviral contre ZIKV. Meertens et son équipe ont montré que deux autres molécules, R428 (une kinase inhibitrice d'Axl) qui va empêcher la phosphorylation du récepteur Axl, et MYD1 (récepteur avec une grande affinité pour Gas6) inhibent l'infection de ZIKV dans des cellules gliales. De même, une autre équipe démontre également l'activité de R428 et de la molécule cabozantinib (une autre molécule inhibitrice de la phosphorylation d'Axl) comme agent anti-ZIKV par inhibition de la phase précoce (Liu et al., 2016a; Meertens et al., 2017).

On peut également retrouver des molécules naturelles issues de plantes, comme la curcumine. Il s'agit du pigment polyphénolique principal du curcuma. Outre des activités antioxydante et anti-inflammatoire, la curcumine possède une importante activité antivirale. Son activité antivirale contre le ZIKV a été démontrée avec un mécanisme d'action direct sur la particule virale en empêchant son attachement sur la cellule hôte. Cette étude a permis de déterminer un index de sélectivité de la curcumine, égal à 6. C'est à dire que l'activité anti-ZIKV de la curcumine est seulement 6 fois supérieur à sa cytotoxicité, montrant ainsi une importante toxicité potentielle de cette molécule dans le cadre d'une administration en tant qu'antiviral (Mounce et al., 2017).

b) Inhibition de la fusion de l'endosome et/ou de l'internalisation

Suite à l'attachement, les virions sont internalisés dans la cellule par un mécanisme d'endocytose clathrine-dépendant. Le matériel génétique viral est libéré dans le cytoplasme par fusion des membranes virales et de l'endosome, permis par l'acidification du pH de l'endosome (figure 11). Cette étape d'internalisation et/ou de fusion de l'endosome peut être inhibée par diverses molécules.

On retrouve un antipsychotique, la chlorpromazine, qui possède une action anti-ZIKV en inhibant le mécanisme d'endocytose clathrine-dépendant (Persaud et al., 2018). L'arbidol (ou umifenovir), une molécule antivirale à large spectre, utilisée contre les virus influenza, démontre une activité anti-ZIKV significative avec une concentration efficace de

l'ordre de 11 μM et un index de sélectivité de 8 sur des cellules Vero (dérivées de cellules épithéliales de singe). Elle possède également une activité anti-ZIKV sur d'autres types de lignées cellulaires immortalisées telles que les cellules A549 dérivées des cellules épithéliales humaines, les cellules HuH7 dérivées d'hépatocytes humains ou encore des cellules épithéliales primaires. Son activité est liée à sa capacité à s'intercaler dans les membranes lipidiques, entraînant ainsi une incapacité des membranes cellulaires et virales à fusionner lors de l'endocytose (Fink et al., 2018; Haviernik et al., 2018). La daptomycine, un antibiotique, a également été décrite pour son activité anti-ZIKV suivant le même mécanisme d'action (Barrows et al., 2016).

La chloroquine, un agent bloquant de l'endocytose par inhibition de l'acidification des endosomes, est également largement décrite pour son activité antivirale, contre DENV, JEV ou encore contre WNV (Silva et al., 2007; Zhu et al., 2012b; Farias et al., 2014). Elle est notamment décrite pour son efficacité sur DENV à la fois *in vitro* et *in vivo* chez des singes (Farias et al., 2013, 2014, 2015). Des études ont également pu montrer l'efficacité de la chloroquine face à ZIKV en agissant sur les phases précoces du cycle viral avec une activité accrue sur des cellules souches neurales et des fibroblastes humains avec des index de sélectivité compris entre 8 et 14 selon le modèle cellulaire étudié (Delvecchio et al., 2016; Persaud et al., 2018). *In vivo*, elle est capable de diminuer le taux d'infection dans le placenta et chez les fœtus de souris, mais aussi le taux de mortalité chez des souris, en protégeant les souriceaux de microcéphalie. De plus, la chloroquine montre également une diminution de la transmission verticale chez des souris, avec une chute importante de la virémie dans les cerveaux des fœtus (Cao et al., 2017a; Li et al., 2017a; Shiryayev et al., 2017; Arumugasaamy et al., 2018).

D'autres molécules telles que le chlorure d'ammonium, le bafilomycine A1, la quinacrine, la méfloquine et le N-tert-butyl Isoquine (GSK369796), connues pour leur capacité à inhiber l'acidification de l'endosome, présentent une activité anti-ZIKV chez des cellules Vero et des fibroblastes humains (Balasubramanian et al., 2017; Persaud et al., 2018).

Des molécules anti-cancéreuses, telles que l'obatoclax, la saliphenylhalamide (SaliPhe) ou encore la gemcitabine, possèdent une activité antivirale significative contre ZIKV chez des cellules épithéliales humaines de l'œil, avec des index de sélectivité de 65, >200 et >1000 respectivement (Kuivanen et al., 2017). Des résultats similaires sont reportés par l'équipe de Adcock et al, pour la saliphénylhalamide avec notamment un index de sélectivité de 40 sur des cellules Vero (Adcock et al., 2017). Ces molécules interviennent en inhibant l'acidification de l'endosome lors du cycle viral.

L'amodiaquine, un antipaludéen, possède aussi une activité anti-ZIKV en agissant sur les phases précoces (Han et al., 2018). De même le citrate d'ammonium ferrique inhibe l'infection par ZIKV dans des cellules Vero et des neuroblastes humains (Wang et al., 2018).

La niclosamide, connue pour son activité d'inhibition sur l'acidification du pH de l'endosome, possède une activité anti-ZIKV *in vitro* sur des cellules épithéliales et neurales humaines et *in vivo* en réduisant le taux d'infection et le nombre de microcéphalies (Xu et al., 2016; Li et al., 2017b; Cairns et al., 2018). Cependant, certaines études montrent que la

niclosamide agirait plutôt sur les phases tardives lors de l'infection par ZIKV (Xu et al., 2016) par une interaction avec le complexe protéique NS2B-NS3 (Li et al., 2017b).

D'autres études montrent l'activité anti-ZIKV de molécules naturelles, comme l'isoquercitrine (Q3G) qui appartient à la famille des flavonoïdes. Q3G a la capacité d'inhiber l'internalisation du virus dans différentes lignées cellulaires humaines, avec des index de sélectivité compris entre 23,3 et 60 selon le type cellulaire (Gaudry et al., 2018). Le nanchangmycine, un antibiotique naturel issu de la bactérie *Streptomyces nanchangensis*, a été décrit pour bloquer l'entrée de ZIKV dans les cellules hôtes par inhibition de l'internalisation (Rausch et al., 2017).

II.3.3 Inhibition des phases tardives du cycle viral

Les phases tardives du cycle viral d'un *Flavivirus* tel que le ZIKV, comprennent de nombreuses étapes essentielles à la formation et à la multiplication de virions matures. Ces phases sont constituées des étapes de traduction et de transcription, ainsi que des étapes de réplication, d'assemblage et de maturation (figure 11).

a) Inhibition de la traduction et/ou de la transcription

Le génome viral est libéré dans le cytoplasme cellulaire suite à la fusion de l'endosome et de nouveaux ARN sont synthétisés. De nombreuses molécules inhibitrices interviennent dans cette phase du cycle viral. Le N-(4-hydroxyphenyl) retinamide (4-HPR ou fenretinide), un activateur des récepteurs rétinoïdes, montre une activité antivirale contre différents *Flavivirus*, DENV, WNV, HCV (Fraser et al., 2014; Carocci et al., 2015). Plus récemment, des études ont montré que cette molécule possède aussi une capacité d'inhibition de l'infection par ZIKV, *in vitro* et *in vivo* chez des souris. Cette inhibition est liée à la réduction de synthèse d'ARN car le 4-HRP agit directement sur l'activité de la réplicase virale (Pitts et al., 2017; Wang et al., 2017b). On retrouve également le difluorométhylornithine (DFMO; ou éflornithine) et le diéthyl norspermine (DENSpM), qui vont agir sur la voie de synthèse des polyamines et inhiber la réplication virale de ZIKV sur des cellules de reins de hamster (BHK-21) (Mounce et al., 2016).

Concernant les molécules pures naturelles, le silvestrol qui est une molécule isolée de la plante *Aglaia foveolata*, est capable d'inhiber la réplication de ZIKV par inhibition de l'hélicase eIF4A (eukaryotic initiation factor 4A) dans les A549 et dans des cellules primaires d'hépatocytes humains (Elgner et al., 2018).

b) Inhibition de la réplication, de l'assemblage et de la maturation

Les étapes de réplication et d'assemblage se font au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Les virions immatures néoformés transitent à travers l'appareil de golgi où la protéine de membrane prM est clivée avant l'exocytose des virions matures. De nombreuses études portent sur la recherche de molécules antivirale ciblant ces différentes

étapes, que ce soit directement sur la réplication virale, soit au niveau du métabolisme lipidique ou encore au niveau de la synthèse nucléotidique. Parmi les molécules capables d'inhiber la réplication de ZIKV, on retrouve le nitazoxanide décrit comme antiprotozoaire et également molécule antivirale. En effet, cette molécule n'a pas d'effet sur les phases précoces mais agit sur des étapes post-entrée du cycle viral de ZIKV (Cao et al., 2017b; Li et al., 2017b). Cette activité anti-ZIKV vient de l'interaction entre les protéines NS2-NS3 et le nitazoxanide. L'index de sélectivité rapporté pour cette molécule est de 52 (Li et al., 2017b).

Les champignons sont une source importante de composés biologiquement actifs. La molécule issue du champignon *Colispora cavincola*, la cavinafungine (Ortiz-López et al., 2015), a été décrite récemment pour son activité antivirale contre le DENV et le ZIKV en inhibant la réplication virale (Estoppel et al., 2017). De même, une étude a montré que la bromocriptine, un alcaloïde dérivé de l'ergot de seigle qui est un agoniste dopaminergique, possède une activité antivirale. Elle est efficace à la fois sur le DENV et le ZIKV. La bromocriptine agit au niveau des phases tardives du cycle viral par inhibition de l'activité protéases des protéines NS2B et NS3 de ZIKV (Chan et al., 2017).

Les plantes et les fruits sont également des sources de composés naturels. Ils sont riches en polyphénols et ces derniers sont largement décrits pour leurs nombreuses activités biologiques. En effet, une étude montre l'activité anti-ZIKV de 7 polyphénols avec une inhibition plus ou moins importante de l'activité des protéines NS2B-NS3. De plus, la myricétine (ou myricétol, principalement retrouvée dans les raisins ou les baies) montre l'activité antivirale la plus importante avec une inhibition de plus de 80% (Lim et al., 2016).

D'autres molécules synthétiques vont agir de façon indirecte sur le ZIKV en ciblant le mécanisme d'apoptose par activation des caspases par exemple. Parmi ces molécules nous pouvons citer, le bithionol et la molécule emricasan, qui sont des inhibiteurs des caspases. Ces composés montrent une activité anti-ZIKV sur des cellules Vero et des cellules neurales (Leonardi et al., 2016; Xu et al., 2016). On retrouve également dans la littérature des inhibiteurs de kinase, comme le PHA-690509, qui possède une activité anti-ZIKV sur des astrocytes humains (Xu et al., 2016). Le bortézomib, un inhibiteur du protéasome, a également été décrit récemment pour son activité anti-ZIKV lors d'étude de criblage de diverses molécules déjà approuvées par la *Food and Drug Administration* (FDA) (Barrows et al., 2016).

Le métabolisme lipidique de la cellule hôte est nécessaire à la réplication des *Flavivirus* tel que le ZIKV. Des molécules pouvant cibler cette étape peuvent également être de bonnes candidates anti-ZIKV. Une étude a montré que diverses molécules connues pour perturber le métabolisme lipidique, telles que l'acide nordihydroguaiarétique (NDGA), son dérivé méthylé l'acide tetra-*O*-methyl nordihydroguaiarétique (M₄N), le PF-429242, et la molécule fatostatine possèdent une activité anti-ZIKV. Ces molécules vont moduler le métabolisme lipidique par interaction avec la voie des protéines régulatrices des stérols (sterol regulatory element-binding proteins (SREBP)). Les molécules NDGA et M₄N possèdent un index de sélectivité de 17,8 et de 187,9 respectivement face au ZIKV, lorsqu'elles sont testées sur des cellules Vero (Merino-Ramos et al., 2017).

D'autres molécules utilisées pour leur action hypocholestérolémiante, telles que la lovastatine et le mévastatine, sont décrites pour leur activité antivirale face au ZIKV avec un index de sélectivité supérieur à 2,5 (Pascoalino et al., 2016). De même, l'imipramine, qui est un antidépresseur, inhibe la réplication de ZIKV dans des fibroblastes humains en empêchant le transport intracellulaire du cholestérol (Wichit et al., 2017). La réplication de ZIKV est également inhibée par des molécules activatrices de protéines kinases qui jouent un rôle essentiel dans la régulation du métabolisme lipidique. Parmi ces molécules, PF-06409577 et PKI (inhibiteur de la protéine kinase A), inhibe l'infection par le ZIKV dans des cellules Vero et des astrocytes, respectivement (Cheng et al., 2018; Jiménez de Oya et al., 2018).

La synthèse nucléotidique permise par la protéine ARN polymérase NS5 est une cible privilégiée dans la recherche de molécules antivirales.

La forme triphosphatée du sofosbuvir, analogue nucléotidique, cible l'ARN polymérase viral NS5 du virus de l'hépatite C (HCV). Sachant que cette région est très conservée chez les *Flavivirus*, le sofosbuvir a fait l'objet de nombreuses études qui montrent son efficacité également contre le ZIKV. En effet, différentes équipes ont montré que le sofosbuvir est capable d'inhiber l'infection par le ZIKV dans diverses cellules (les hépatocytes, les cellules placentaires humaines, les cellules souches neurales dérivées d'embryons humains, les neuroblastes humains) ou encore *in vivo* chez des souris (Bullard-Feibelman et al., 2017; Reznik and Ashby, 2017; Sacramento et al., 2017; Ferreira et al., 2017; Mesci et al., 2018). Le sofosbuvir inhibe l'ARN polymérase NS5 de ZIKV, bloquant ainsi la réplication du virus (Sacramento et al., 2017; Xu et al., 2017). De plus, une étude récente a mis en évidence la capacité du sofosbuvir à prévenir la transmission mère-enfant de ZIKV chez des souris immunodéficientes (Mesci et al., 2018).

L'activité antivirale du sofosbuvir dépend du modèle cellulaire utilisé. Son efficacité antivirale est accrue dans le cas des hépatocytes humains (Huh7) (SI = 1194) comparativement aux cellules BHK (cellules de reins de hamster doré) (SI = 184). Cependant, son activité est peu marquée dans le cas des cellules Vero et des A549 (SI > 2) (Mumtaz et al., 2017; Sacramento et al., 2017).

Le 7-déaza-2'-C-méthyladénosine, un inhibiteur de l'activité de la polymérase, montre une activité antivirale *in vitro* contre ZIKV avec un SI > 37 sur des cellules Vero. Il est également efficace sur des neurones ou des astrocytes. *In vivo*, chez des souris il réduit la virémie et retarde l'apparition de la maladie (Zmurko et al., 2016; Lanko et al., 2017).

Une nouvelle molécule antivirale, la favipiravir (T-705), inhibiteur de l'ARN polymérase démontre une importante activité anti-ZIKV sur de nombreux types cellulaires humains (neurones, fibroblastes, épithélium) et sur des cellules Vero avec des SI > 26 (Zmurko et al., 2016; Baz et al., 2017; Kim et al., 2018).

Nous pouvons également citer la ribavirine (analogue nucléosidique de la guanosine) qui est un inhibiteur de l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH), empêchant ainsi la production de GTP nécessaire à la polymérase virale. De nombreuses études ont porté sur l'activité anti-ZIKV de la ribavirine. Cette molécule inhibe la réplication de ZIKV dans différentes lignées cellulaires humaines et dans des cellules Vero (Baz et al., 2017; Julander et

al., 2017; Kamiyama et al., 2017; Kim et al., 2018). Les résultats obtenus sont controversés car une autre étude ne montre aucune activité de ce médicament sur des cellules Vero infectées par ZIKV (Adcock et al., 2017). *In vivo*, la ribavirine induit une baisse de la virémie chez des souris (Julander et al., 2017; Kamiyama et al., 2017).

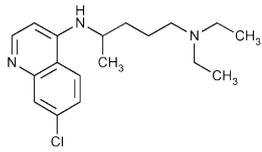
D'autres inhibiteurs de l'IMPDH ont été étudiés dans le cas de ZIKV. Par exemple, l'acide mycophénolique (MPA) et le mérimépodib (MMPD) inhibent la réplication de ZIKV dans divers modèles cellulaires humains, comme les cellules hépatiques Huh7, des cellules du placenta ou encore des cellules souches neurales (Barrows et al., 2016; Rausch et al., 2017; Tong et al., 2018). Le mérimépodib possède un index de sélectivité supérieur à 17.

Certains inhibiteurs de synthèse de pyrimidine, comme le 6-azauridine et le brequinar inhibent également la réplication de ZIKV dans des cellules Vero (Crance et al., 2003; Adcock et al., 2017). Dans des cellules Vero le 6-azauridine présente un SI >33 face au ZIKV (Crance et al., 2003).

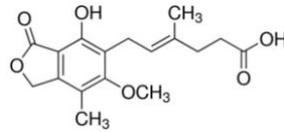
Dans les composés issus de plantes, la glycyrrhizine issue de la réglisse (*Glycyrrhiza glabra*) possède une activité antivirale contre le DENV, le YFV et le JEV. Son activité anti-ZIKV est moins importante, avec un SI >7 (Crance et al., 2003).

Enfin au niveau de l'étape d'assemblage et de maturation, lors du transfert des particules virales du réticulum endoplasmique vers le Golgi, on retrouve certaines molécules naturelles capables d'inhiber ces étapes. La bréfeldine A, produite par une espèce de *Penicillium* inhibe la progénie de ZIKV dans des cellules Vero, avec un index de sélectivité de 36, en inhibant le transport du RE vers le Golgi (Raekiansyah et al., 2017). L'émétine isolée de la plante *Carapichea ipecacuanha*, agit à deux niveaux, à la fois par inhibition de la protéine NS5 et en perturbant la formation des lysosomes dans des cellules rénales humaines (Yang et al., 2018).

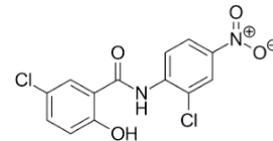
Ces études indiquent plusieurs pistes de recherche vers la mise au point d'antiviraux efficaces contre le ZIKV mais des études supplémentaires sont nécessaires afin de valider leur efficacité de façon universelle. De plus, d'autres études tendent vers l'identification d'autres composés plus sûrs, moins toxiques notamment pour les populations à risques comme les femmes enceintes (Micewicz et al., 2017).



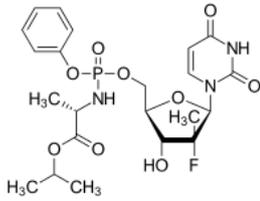
Chloroquine



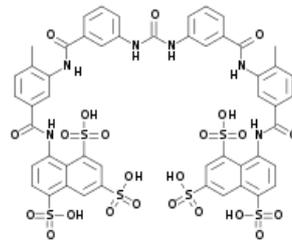
Acide mycophénolique (MPA)



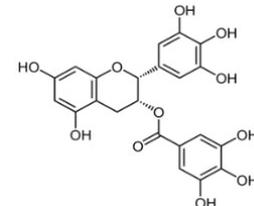
Niclosamide



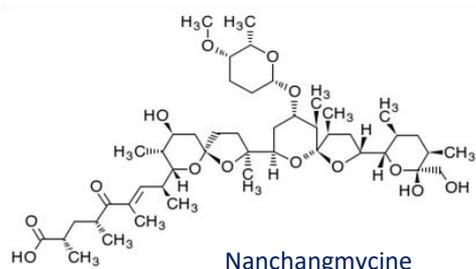
Sofobuvir



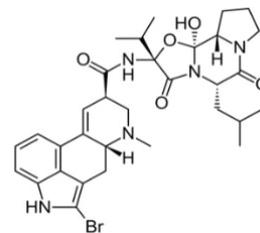
Suramine



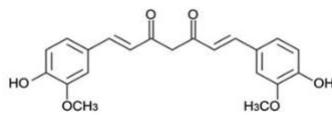
Gallate d'épigallocatechine



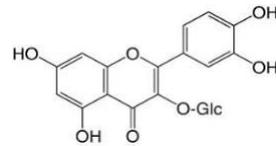
Nanchangmycine



Bromocriptine



Curcumine



Isoquercitrine

Figure 12 : Structure de quelques molécules anti-ZIKV

III. Les plantes médicinales : source de substances anti-infectieuses

Une plante médicinale, est utilisée pour des propriétés spécifiques, bénéfiques à la santé humaine ou animale. Une plante médicinale est définie par la pharmacopée française comme « une drogue végétale au sens de la pharmacopée européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses ».

De façon historique, une pharmacopée est un ouvrage encyclopédique qui recense des plantes à usage thérapeutiques principalement, mais aussi des substances d'origine animale ou minérale et plus récemment des substances chimiques. Le terme désigne actuellement un registre officiel et réglementaire des matières premières autorisées dans un pays, ou groupe de pays, pour la fabrication de médicaments.

Il existe différents types de pharmacopée :

- Pharmacopée traditionnelle ;
- Pharmacopée nationale (française) ;
- Pharmacopée internationale (européenne).

Selon l'OMS, 14 à 28% des plantes répertoriées dans le monde sont à usage médicinal.

Les plantes médicinales sont utilisées depuis des millénaires pour leurs vertus thérapeutiques. On retrouve ainsi dans la littérature de nombreuses études sur l'activité antivirale des plantes médicinales présentes dans le monde entier. Concernant les plantes anti-*Flavivirus* des études ont démontré l'efficacité de nombreuses plantes médicinales contre le DENV. L'extrait éthanolique de feuilles de *Distictella elongata* possède une activité anti-DENV avec un index de sélectivité de 1,5 (Simões et al., 2011). Un mélange d'extraits aqueux de trois espèces de *Phyllanthus* est capable de réduire de 90% la quantité de virus DENV-2 présents dans les cellules ou dans le surnageant (Lee et al., 2013). L'extrait aqueux de racines de *Scutellaria baicalensis*, une plante utilisée dans la médecine chinoise traditionnelle, démontre une inhibition de plus de 70% de l'infection des 4 sérotypes de DENV sur des cellules Vero. Cet extrait présente un index de sélectivité compris entre 10 et 16 selon le sérotype de DENV, lors de différents protocoles d'addition (Zandi et al., 2013). On décrit également l'activité anti-DENV-1 d'extraits méthanoliques de *Andrographis paniculata* et de *Momordica charantia*, capables de réduire les effets cytopathiques du virus de plus de 50% (Tang et al., 2012). Sur des monocytes, l'extrait brut éthanolique de feuilles de *Norantea brasiliensis* Choisy démontre également une activité antivirale contre le DENV-2 par inhibition de l'infection et une réduction de la sécrétion de la protéine NS1 (Fialho et al., 2016). L'extrait méthanolique des feuilles de *Vernonia cinerea* et l'extrait éthanolique de tiges de *Tridax procumbens* possèdent une activité anti-DENV par une réduction de l'infection, grâce à une inhibition de l'activité des protéines NS2B-NS3 du virus (Rothan et al., 2014). Les rhizomes de *Curcuma longa* présentent une activité antivirale de DENV-2 par inhibition de l'activité protéase des protéines NS2B-NS3 (Tan et al., 2006). On retrouve également l'extrait d'acétate d'éthyle d'une plante de

Madagascar, *Flacourtia ramontchi*, qui montre une activité anti-DENV en inhibant l'activité enzymatique de la protéine NS5 (Bourjot et al., 2012)

Divers extraits de plantes sont efficaces contre d'autres *Flavivirus*, par exemple un extrait d'acétate d'éthyle de graines de *Daucus maritimus* montre une activité anti-WNV par inhibition de la protéine NS5 (Miladi et al., 2012). Une autre plante médicinale de la médecine chinoise, *Rheum palmatum*, est capable d'inhiber 90% de l'infection par JEV *in vitro* (Chang et al., 2014). De même différentes études ont été menées sur l'activité antivirale d'extraits bruts de plantes médicinales contre le YFV. L'extrait éthanolique de tiges d'*Aframomum melegueta*, des extraits aqueux d'écorces de *Enantia chloranta* et de feuilles de *Gossypium hirsutum* inhibent les effets cytopathiques de YFV sur des cellules Vero (Ojo et al., 2009; Abubakr et al., 2013).

Toutes ces études démontrent le potentiel antiviral des plantes médicinales. Cependant la majorité de ces études portent sur l'étude de l'activité anti-DENV, peu d'entre elles s'intéressent à d'autres *Flavivirus*.

III.1 Les plantes médicinales réunionnaises

Ancrées dans la tradition réunionnaise, les plantes médicinales ont largement été utilisées par les plus anciens dans le traitement ou la prévention de nombreuses maladies. Les recettes de « grand-mères », ont en grande partie disparues avec l'apparition de la médecine moderne. Cependant, de nombreuses familles retournent aujourd'hui vers cette médecine plus douce et naturelle (Lavergne, 2016).

Les plantes réunionnaises sont pour la plupart soit, indigènes de la zone des Mascareignes, soit endémiques de La Réunion.

Certaines études ont été menées sur une sélection de plantes médicinales réunionnaises, notamment pour leur activité antioxydante (Poullain et al., 2004). Des extraits riches en polyphénols d'*Antirhea borbonica*, *Doratoxylon apetalum* et *Gouania mauritiana*, sont capables d'inhiber la production d'espèces réactives de l'oxygène, de diminuer l'expression des gènes des enzymes responsables de leur production, dans des adipocytes et d'augmenter l'activité d'enzymes antioxydantes telles que la superoxide dismutase (SOD) ou la catalase. En plus de cette action antioxydante, ces études montrent aussi la capacité anti-inflammatoire de ces extraits avec une diminution de molécules pro-inflammatoires, comme l'interleukine 6 (IL-6) (Marimoutou et al., 2015; Le Sage et al., 2017).

Une autre étude a pu montrer que des extraits de *Curcuma longa*, une épice couramment utilisée à La Réunion, possèdent des activités anti-inflammatoire mais également une capacité à diminuer l'accumulation lipidique dans des adipocytes (Septembre-Malaterre et al., 2016).

Concernant les activités anti-infectieuses, différentes études ont montré une activité antivirale de plantes médicinales réunionnaises. En effet, des extraits méthanoliques de *Obetia ficifolia* et de *Olax psittacorum* exercent une activité antivirale importante contre le

virus de l'Herpès de type 1 et le poliovirus, respectivement. L'extrait méthanolique de *Senecio ambavilla* possède également une activité antivirale, moins importante, pouvant agir sur les deux virus testés (Fortin et al., 2002).

Senecio ambavilla, est surtout utilisée pour traiter les maladies de la peau, comme l'eczéma, la gale ou les plaies vénériennes (Lavergne, 2016; Smadja and Marodon, 2016), conséquences de certaines maladies comme l'herpès. Dans ce cas, on retrouve donc cette activité anti-herpès à la fois dans les données ethnobotaniques et scientifiques. L'activité cicatrisante au niveau de la peau dans le cas des plaies vénériennes pourrait tout simplement être une conséquence de son activité antivirale contre le virus de l'herpès.

Des extraits éthanoliques des espèces *Croton mauritanus* et *Stillingia lienata*, sont efficaces contre les virus chikungunya (CHIKV) et de l'immunodéficience humaine (VIH) (Poullain, 2004; Corlay et al., 2014; Olivon et al., 2015). De façon traditionnelle, *Croton mauritanus*, est utilisée à La Réunion contre les rhumatismes, et surtout pour faire baisser la fièvre (Lavergne, 2016), mais n'est pas connue pour des propriétés antivirales.

Récemment une autre étude démontre l'activité antivirale d'extraits d'acétate d'éthyle d'*Aphloia theiformis*, de *Stillingia lineata*, de *Croton mauritanus*, d'*Indigofera amnoxylum*, et de *Securinega durissima* contre le CHIKV. Ces extraits présentent des index de sélectivité compris entre 5,4 et 10,9 (Ledoux et al., 2018).

Les plantes médicinales de La Réunion ont un fort potentiel en termes d'activités biologiques même si leurs utilisations locales peuvent être, soit représentatives de leurs activités biologiques, soit totalement indépendantes. Les plantes médicinales réunionnaises sont depuis peu reconnues pour leurs potentiels thérapeutiques. Entre 2012 et 2016, 22 plantes ont été inscrites à la pharmacopée française (tableau 1). 16 d'entre elles ont intégré la pharmacopée française en 2013, puis 3 en 2015 et enfin les 3 dernières en 2016 (Smadja and Marodon, 2016). Parmi ces 22 plantes médicinales réunionnaises, 20 font parties de la liste A de la pharmacopée, une sur la liste B et une autre sur les deux listes. La liste A correspond aux plantes médicinales utilisées traditionnellement et la liste B aux plantes utilisées traditionnellement en l'état ou sous forme de préparations dont les effets indésirables potentiels sont supérieurs au bénéfice thérapeutique attendu (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM)).

A ce jour, peu de données scientifiques sont disponibles sur ces plantes. Leurs utilisations sont majoritairement limitées à des préparations traditionnelles locales. En effet, peu d'études ont été menées concernant l'activité antivirale de ces plantes. Comme décrit précédemment, quelques plantes médicinales réunionnaises ont été étudiées pour leur activité anti-VIH et anti-CHIKV (Poullain, 2004; Ledoux et al., 2018). Néanmoins la majorité des plantes décrites dans ces études ne sont pas inscrites à la pharmacopée française. L'inscription à la pharmacopée permet déjà une valorisation de ces plantes mais implique un cadre scientifique amélioré pour leurs indications thérapeutiques et plus particulièrement dans le cadre des arboviroses.

L'île de La Réunion a été touchée en 2005-2006 par une épidémie de chikungunya avec 30% de la population atteinte. Actuellement, une épidémie de dengue sévit sur l'île avec plus

de 6500 personnes infectées. Même si aucun cas autochtone de zika n'a été détecté sur l'île, d'autres pays de la zone Océan Indien ont été touchés, comme l'Inde ou les îles Maldives. Cela ajouté à la présence du vecteur sur l'île, fait de La Réunion un lieu à fort risque d'émergence pour ce virus.

Il est donc intéressant, dans ce contexte infectieux, d'évaluer le potentiel antiviral des plantes médicinales réunionnaises inscrites à la pharmacopée française contre ZIKV. Cela permet de contribuer à définir un cadre réglementé sur l'utilisation de ces plantes mais également et surtout de contribuer à la valorisation leurs vertus thérapeutiques.

Nom botanique	Nom vernaculaire	Famille	Parties utilisées	Usage traditionnel
<i>Antirhea borbonica</i>	Bois d'osto	Rubiaceae	Feuilles	Cicatrisant, hémostatique
<i>Aphloia theiformis</i>	Change écorce	Aphloiaceae	Feuilles	Anti-inflammatoire, diurétique
<i>Ayapana triplinervis</i>	Ayapana	Asteraceae	Feuilles	Digestion, cicatrisant
<i>Coffea mauritiana</i>	Café marron	Rubiaceae	Feuilles	Diurétique (int), lotion oculaire (ext)
<i>Dodonaea viscosa</i>	Bois d'arnette/ Bois de reinette	Sapindaceae	Feuilles	Diurétique, calculs rénaux
<i>Hubertia ambavilla</i>	Ambaville	Asteraceae	Feuilles	Ulcères à l'estomac, dermatoses, eczéma
<i>Hypericum lanceolatum</i>	Fleur jaune	Hypericaceae	Feuilles, fleurs, sommités fleuries	Circulation du sang, anti-inflammatoire
<i>Jumellea fragrans</i>	Faham	Orchidaceae	Feuilles	Pectorale, diaphorétique
<i>Leucas lavandulifolia</i>	Tombé	Lamiaceae	Feuilles, racines	Sudorifique, vermifuge, emménagogue
<i>Mussaenda arcuata</i>	Lingue café	Rubiaceae	Feuilles	Anti-inflammatoire sudorifique, fébrifuge
<i>Nuxia verticillata</i>	Bois maigre	Stilbaceae	Feuilles	Dépuratif, détoxifiant
<i>Orchrosia borbonica*</i>	Bois jaune	Apocynaceae	Feuilles	Fébrifuge
<i>Olea europaea</i>	Bois d'olive noir	Oleaceae	Feuilles	Diurétique
<i>Olea lancea</i>	Bois d'olive blanc	Oleaceae	Feuilles	Dépuratif, emménagogue, aphrodisiaque
<i>Phyllanthus casticum</i>	Bois de demoiselle	Phyllanthaceae	Écorce	Anti-diarrhéique, anti-dysentérique, en gargarisme contre les angines
<i>Pittosporum senacia</i>	Bois de joli coeur	Pittosporaceae	Feuilles	Acné, dermatoses
<i>Psiloxylon mauritianum</i>	Bois de pêche marron	Psiloxilaceae	Feuilles	Anti-inflammatoire, diurétique, dépuratif
<i>Secamone volubilis</i>	Liane d'olive	Apocynaceae	Feuilles	Anti-inflammatoire, veinotonique
<i>Sigesbeckia orientalis</i>	Colle-colle/Guérit-vite	Asteracea	Parties aériennes	Cicatrisant, dermatoses

<i>Syzygium cumini</i>	Jamblon	Myrtaceae	Graines de fruits mûrs	Anti-inflammatoire, antidiabétique, anti-diarrhéique, antiallergique, antimicrobienne, diurétique
<i>Turraea thouarsiana</i> **	Bois de quivi des bas	Meliaceae	Tiges feuillées	Affections cutanées, anti hypertensive, emménagogue
<i>Vepris lanceolata</i>	Patte poule	Rutaceae	Feuilles	Contusions, traumatismes

* inscrite sur la liste B

** inscrite sur la liste A pour usage externe et sur la liste B en usage interne

Tableau 1 : Liste des plantes médicinales réunionnaises inscrites à la pharmacopée française (Aplamedom, 2017).

III.2 Les plantes médicinales réunionnaises sélectionnées pour l'étude

Afin de valoriser les plantes médicinales de La Réunion et plus particulièrement celles inscrites à la pharmacopée française en 2015, mais également dans l'objectif d'identifier des antiviraux d'origine naturelle contre l'arbovirus émergent zika, nous avons mis en place divers critères de sélection :

- Approvisionnement facile ;
- Données pharmacologiques et ethnobotaniques indiquant une activité anti-inflammatoire et/ou anti-infectieuse ;
- Les plantes emménagogues ont été écartées.

Ces critères de sélection nous ont permis d'établir une liste principale de sept plantes médicinales réunionnaises qui seront évaluées pour leur potentiel antiviral contre ZIKV.

III.2.1 *Antirhea borbonica* ou Bois d'osto

a) Nom, origine et distribution géographique



Famille : *Rubiaceae*

Genre : *Antirhea* Comm. ex Juss.

Espèce : *Antirhea borbonica* J.F Gmel.

L'espèce aurait été découverte par un nommé « Lousteau », lui donnant ainsi son nom vernaculaire de « Bois de Lousteau » et ses nombreuses variantes, Bois d'osto, Bois d'ousteau, Bois losto, Bois lousteau, Losteau, Losto et Ousto.

Longtemps considérée comme endémique de l'île Maurice et de La Réunion, on sait désormais qu'elle est également retrouvée à Madagascar.

Cette plante très commune à La Réunion, pousse principalement dans les forêts humides de basses et moyennes altitudes jusqu'à 1800-200 m, mais également dans les forêts humides de montagne et sur les coulées de lave (Smadja et Marodon, 2016).

b) Usages pharmacologiques

Traditionnellement utilisée en usage interne, sous forme de tisane ou de décoction, les feuilles et l'écorce de cette plante permettent de lutter contre la fièvre, les diarrhées, les dysenteries. Elle est également utilisée comme antiulcéreuse gastrique et pour traiter les problèmes rénaux et urinaires. Cette plante est fortement consommée en décoction pour ses

activités hypocholestérolémiante et antidiabétique. En usage externe, elle favorise la cicatrisation et possède une activité hémostatique permettant de stopper les petites hémorragies cutanées (Lavergne, 2016; Smadja et Marodon, 2016).

Des données scientifiques décrivent son activité antioxydante et anti-inflammatoire (Poullain et al., 2004; Marimoutou et al., 2015; Le Sage et al., 2017). En effet, l'extrait acétonique des parties aérienne d'*Antirhea borbonica* réduit le stress oxydatif dans des préadipocytes en inhibant la production d'espèces réactives à l'oxygène jusqu'à 50% même en présence de TNF- α (Marimoutou et al., 2015). Un extrait similaire inhibe également la production d'interleukine 6 en présence de LPS (Le Sage et al., 2017). L'activité antioxydante et anti-inflammatoire de cette plante explique son utilisation dans le traitement de maladies comme le diabète. En effet, le diabète peut être une des maladies causées par un dysfonctionnement du stress oxydatif et statut inflammatoire du patient.

c) Composition chimique

Parmi les polyphénols présents dans le Bois d'osto, on retrouve notamment, l'acide chlorogénique, le kaempférol, et un dérivé de l'acide caféique, l'acide dicafféoylquinique (Marimoutou et al., 2015; Le Sage et al., 2017)

Les feuilles et l'écorce du Bois d'osto contiennent principalement des alcaloïdes, des saponosides, des tanins et des flavonoïdes (Smadja et Marodon, 2016).

III.2.2 *Aphloia theiformis* ou Change écorce

a) Nom, origine et distribution géographique



Famille : *Aphloiaceae*

Genre : *Aphloia* (DC.) Benn.

Espèce : *Aphloia theiformis* (Vahl) Benn.

Aphloia theiformis porte plusieurs noms vernaculaires à La Réunion : Change écorce, Bois change écorce, Bois de Gouyave, Fandamane, Fondamane, Gouyave marron, Goyave marron, Sans-écorce.

Aphloia theiformis est la seule espèce du genre *Aphloia*. Cette espèce très commune, est un arbre indigène présent dans la forêt ombrophile primaire de Maurice, de Rodrigues et de La Réunion, de 0 à 2000 m d'altitude mais aussi au niveau de la végétation secondaire et pionnière sur lave. On la trouve également à Madagascar, aux Comores, aux Seychelles, en Afrique du Sud et de l'Est (Smadja et Marodon, 2016).

b) Usages pharmacologiques

Traditionnellement, *Aphloia theiformis* est utilisée à La Réunion et à Maurice pour traiter les fièvres, les douleurs (Sreekeesoon et Mahomoodally, 2014), le paludisme, les inflammations, le diabète (Mootoosamy et Fawzi Mahomoodally, 2014) ou encore comme dépuratif ou fébrifuge.

Dans la pharmacopée de Madagascar, l'écorce sert de vomitif et les feuilles servent à faire une infusion rafraîchissante ; les jeunes feuilles sont réputées efficaces contre l'hématurie (sang dans les urines), les feuilles anciennes contre les rhumatismes. Cette dernière utilisation est également retrouvée à Maurice où *A. theiformis* fait partie de nombreuses formulations pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde (Neergheen-Bhujun et al., 2014)

Outre l'importante utilisation de cette plante dans la pharmacopée traditionnelle, quelques activités biologiques d'*A. theiformis* ont déjà été étudiées. Il a été démontré que l'extrait méthanolique d'*A. theiformis*, possède une importante activité anti-oxydante, anti-radicalaire et anti-inflammatoire (Poullain et al., 2004; Neergheen-Bhujun et al., 2014).

Un extrait méthanolique des feuilles de cette plante montre une activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus subtilis*, *Sclerotinia sclerotium*, et *Candida albicans*. Avec une concentration maximale inhibitrice de 500 µg.mL⁻¹ pour *Staphylococcus aureus* et *Salmonella enteritis* (Rangasamy et al., 2007).

L'extrait méthanolique de cette plante montre également un fort potentiel contre des parasites à l'origine du paludisme. En effet, elle inhibe la croissance de *Plasmodium falciparum* *in vitro* à 50% à une concentration de 11 et 13 µg.mL⁻¹ (Jonville et al., 2008, 2011). *In vivo*, 7 jours post infection, 200 mg/kg d'extrait méthanolique d'*A. theiformis*, permet une diminution de 65% de la parasitémie et une réduction de la mortalité chez des souris (Jonville et al., 2008). L'extrait brut méthanolique d'*A. theiformis* démontre aussi une activité molluscicide (Gopalsamy et al., 1988).

Les activités immunomodulatoire et anti-inflammatoire d'*A. theiformis* ont également été évaluées. Les fractions phénoliques obtenues à partir de l'extrait méthanolique des feuilles de la plante, présente un effet suppressif sur des lymphocytes mais immunostimulant sur des monocytes. De même ces fractions possèdent une activité anti-inflammatoire, en réduisant la taille d'oedèmes, induit par la carragénine, chez des rats (Hsoidrou et al., 2014). Une autre étude a également démontré que l'extrait acétonique de cette plante possède une activité diurétique par inhibition de 67% de l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Adsersen et Adsersen, 1997). Des fractions d'un extrait méthanolique d'*A. theiformis* inhibe l'activité des 3 enzymes impliquées dans le diabète mellitus, l' α -amylase, α -glucosidase et la lipase pancréatique. Cette activité s'explique par une étude *in silico*, où la mangiférine (xanthone glycosylée retrouvée dans la plante) se lie à ces différentes enzymes. En plus de cette activité antidiabétique, l'extrait méthanolique d'*A. theiformis* ainsi que des

fractions butanolique et d'acétate d'éthyle sont capables d'inhiber la production de molécules glyquées (Picot et al., 2017a; Picot et Mahomoodally, 2017; Picot et al., 2017b).

Plus récemment, une étude montre l'activité antivirale contre le CHIKV d'un extrait d'acétate d'éthyle de *A. theiformis* avec un index de sélectivité de 5,5, mais le mécanisme d'action n'a pas été déterminé (Ledoux et al., 2018).

A. theiformis a également été exploitée pour ses propriétés dans la formulation de phytomédicament (Smadja et Marodon, 2016). Elle entre notamment dans la composition :

- du Canol, médicament qui améliore les fonctions d'élimination rénales et digestives
- de l'Aphloïne P (veinotonique) indiqué dans les problèmes d'insuffisance veineuse (jambes lourdes). Ce médicament n'est actuellement plus commercialisé.

Plus récemment, les laboratoires Yves Rocher utilisent des extraits contenant *A. theiformis* dans la composition de certains de leur produits cosmétique. Principalement pour les propriétés associées à son principe actif, l'aphloïol, qui a un effet protecteur contre les ultraviolets (Josse et al., 2001), un effet blanchisseur de la peau (Lucas et al., 2006) et améliore également la réponse cellulaire cutanée face à un stress thermique (Charrier et al., 2006).

c) Composition chimique

Les études phytochimiques ont révélé la présence de proanthocyanidols (Lavergne, 2016), de saponines dont cinq triterpènes glucosides dans les feuilles (Gopalsamy et al., 1988; Dijoux et al., 1993):

- Glucoside d'ester d'acide tormentique,
- Glucoside d'ester d'acide 23-hydroxytormentique,
- Glucoside d'ester d'acide 6 β -hydroxytormentique,
- L'acide 28-O- β -D-glucopyranosyl 6 β ,23-dihydroxytormentique,
- L'acide 28-O- β -D-glucopyranosyl 6 β -hydroxytormentique

et de xanthones (Danthu et al., 2010), avec l'aphloïol ou mangiférine comme composé majoritaire, et également la présence de flavan-3-ols et de tannins (Picot et al., 2017b; Picot et Mahomoodally, 2017).

III.2.3 *Ayapana triplinervis* ou *Ayapana*

a) Nom, origine et distribution géographique



Famille : *Asteraceae*

Genre : *Ayapana* Spach. R.M.King et H. Rob.

Espèce : *Ayapana triplinervis* (Vahl)

Ayapana est un nom d'origine amérindienne qui signifie plante verte.

Ayapana triplinervis (Vahl) R.M. King et H. Rob., est originaire du Brésil. Cette espèce utilisée comme plante médicinale dans son aire d'origine, servait par exemple aux Indiens d'Amazonie pour soigner les blessures provoquées par des flèches empoisonnées et les morsures des serpents. Cette plante a été ensuite introduite dans de nombreuses régions, comme l'Amérique du Sud, les Antilles, l'Océan Indien, l'Inde, l'Asie de Sud-Est, l'Indonésie et les Philippines. *Ayapana triplinervis* a été introduite à La Réunion dans les années 1800. Nommée dans l'île *Ayapana* ou encore *Yapana* (Smadja et Marodon, 2016).

b) Usages pharmacologiques

A La Réunion les feuilles sont utilisées en infusion pour lutter contre les problèmes digestifs, les maux de ventre, les diarrhées, les gastroentérites, lui donnant son nom de « *Ayapana* digestif ». La décoction de feuilles est également astringente, sudorifique, diurétique, purgative (Smadja et Marodon, 2016). A Rodrigues, l'*Ayapana* est également utilisée traditionnellement dans le traitement des diarrhées, des nausées et des vomissements (Samoisy et Mahomoodally, 2016). Les feuilles sont également utilisées en cataplasme pour guérir des petites plaies afin de faciliter la cicatrisation et contre les ballonnements (Samoisy et Mahomoodally, 2015).

Un extrait d'*Ayapana* à partir d'éther de pétrole possède des propriétés antibactériennes et antifongiques (Gupta et al., 2002). Cette activité antibactérienne est également décrite dans un extrait méthanolique de feuilles d'*Ayapana*, principalement contre *Escherichia coli* avec une concentration minimale inhibitrice (MIC) de 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Matos Lopes et al., 2015). Cette plante ainsi qu'un de ces composés, le 7-méthoxycoumarine, sont décrits pour leur effets anti nocicepteurs à la fois chez des souris et des rats. L'*Ayapana* est également décrite comme anxiolytique, antidépresseur et antioxydant (Melo et al., 2013; Cheriyan et al., 2017).

L'extrait méthanolique des feuilles de cette plante montre une activité anti-mélanome, avec une inhibition de 59% de la production de mélanine dans des cellules de mélanome B16.

Cette activité est due au même composé que précédemment, soit le 7-méthoxycoumarine (Arung et al., 2012).

c) Composition chimique

Les composés principalement retrouvés dans les feuilles et les parties aériennes de l'Ayapana sont des coumarines, telles que l'ayapanine (herniarine), l'ayapine, l'hydrangétine et l'ombelliférone (Smadja et Marodon, 2016). On retrouve également le 7-méthoxycoumarine (Arung et al., 2012; Cheriyan et al., 2017). Dans des extraits d'hexane et d'acétate d'éthyle de feuilles d'Ayapana, on retrouve également des triterpénoïdes et des alcaloïdes (Matos Lopes et al., 2015).

III.2.4 *Dodonaea viscosa* ou Bois d'arnette

a) Nom, origine et distribution géographique



Famille : *Sapindaceae*

Genre : *Dimocarpus* Lour.

Espèce : *Dodonaea viscosa* Jacq.

Le Bois de reinette ou Bois d'arnette est originaire de Nouvelle-Zélande et s'est répandue dans toutes les régions tropicales, subtropicales et tempérées de l'Australie, de l'Afrique, de l'Asie et de l'Amérique du Sud.

C'est une espèce considérée comme indigène à La Réunion et doit son nom à l'odeur de ses feuilles qui dégagent un parfum de pomme de reinette lorsqu'on les froisse.

Retrouvée jusqu'à 1200m d'altitude, cette plante est facilement observable à Cilaos où elle est très présente (Lavergne, 2016).

b) Usages pharmacologiques

Dodonaea viscosa est principalement décrite et utilisée traditionnellement pour ses propriétés diurétiques, anti-inflammatoires et elle permet de traiter des petits troubles au quotidien, comme les maux de gorge, les rhumes ou encore la fièvre (Smadja et Marodon, 2016).

La décoction des feuilles est utilisée pour son efficacité contre les calculs rénaux, les coliques néphrétiques mais également contre les douleurs associées à la goutte, à la sciatique et au rhumatisme. Son utilisation sous forme d'infusion permet de stopper les ballonnements

d'estomac et les diarrhées. Associée encore à l'Ambaville et le Bois d'osto elle traite les ulcères de l'estomac. Cette plante peut également être utilisée en bain défatigant et tonique (Lavergne, 2016).

En plus de ces propriétés « traditionnelles » *Dodonaea viscosa* a été étudiée pour diverses activités biologiques. Des extraits méthanoliques des feuilles de cette plante démontrent une activité antivirale importante contre le rotavirus (RV SA-11), le coxackievirus B3 (CVB3) et le virus influenza A (Getie et al., 2003; Shaheen et al., 2015). Elle présente un index de sélectivité de 25 face au CVB3 (Shaheen et al., 2015).

D. viscosa a été étudiée pour son activité antifongique (Patelet Coogan, 2008; Pirzada et al., 2010) et antibactérienne (Khurram et al., 2009; Naidoo et al., 2012).

On retrouve une activité anti-inflammatoire chez des souris (Khalil et al., 2006). Cette activité est liée à l'acide hautriwaique, qui montre une importante activité anti-inflammatoire, avec une réduction d'œdèmes chez des souris (Salinas-Sánchez et al., 2012). Ce composé est aussi décrit dans le traitement de l'arthrite et il possède une activité hépato-protective (Ali et al., 2014; Salinas-Sánchez et al., 2015). L'activité anti-inflammatoire explique également l'activité antiulcéreuse décrite par Arun et Asha (Arun et Asha, 2008).

Enfin, des études ont montrées que des extraits aqueux et éthanolique de *Dodonaea viscosa* possèdent une activité antidiabétique chez des rats (Veerapur et al., 2010a, 2010b).

c) Composition chimique

Le Bois d'arnette contient des saponosides et des polyphénols, dont des flavonoïdes tels que la rutine et la quercétine, des coumarines, des tanins et des proanthocyanidols. Ces composés sont retrouvés dans les feuilles, les tiges feuillées et même dans les écorces (Smadja et Marodon, 2016).

Des études ont identifié d'autres composés comme des diterpénoïdes, type labdane ou clerodane, et des dérivés de flavanol (Abdel-Mogib et al., 2001; Niu et al., 2010; Wabo et al., 2012; Zhang et al., 2012a; Olivier et al., 2016).

Un autre composé issu de *Dodonaea viscosa* est de plus en plus étudié pour ses nombreuses activités biologiques, l'acide hautriwaique.

On retrouve aussi l'acide 14-trien-18-oic, l'acide 3,4 dihydrobenzoïque, l'acide vanillique, le nebrodenside et le cafféate de docosyle (Muhammad et al., 2016)

III.2.5 *Hubertia ambavilla* ou *Ambaville*

a) Nom, origine et distribution géographique



Famille : *Asteraceae*

Genre : *Hubertia Bory*

Espèce : *Hubertia ambavilla Bory*

Hubertia ambavilla Bory est un arbrisseau ou arbuste nommé à La Réunion *Ambaville* ou parfois : *Ambaville bâtard*, *Ambaville bleu*, *Jean Baville*.

Le genre *Hubertia Bory* comprend une vingtaine d'espèces originaires de Madagascar et des Mascareignes. L'*Ambaville* est endémique de La Réunion, où l'espèce est assez commune, et de Maurice, où elle est plutôt rare et d'indigénat douteux.

Cette plante est commune des forêts et des régions d'altitudes, entre 1000 m et 2000 m, trouvée dans les fourrés et les remparts de l'île, sur les bords des sentiers et dans les lieux ensoleillés des forêts sèches (basse altitude) ou humides (Smadja et Marodon, 2016).

b) Usages pharmacologiques

L'*Ambaville* est une espèce très utilisée dans la médecine traditionnelle de La Réunion. Cette plante est utilisée en décoction pour traiter divers problèmes cutanés, tels que l'érythème fessier, les dartres, l'eczéma, les démangeaisons, les brûlures, les plaies, les inflammations ou encore la gale. Elle est également utilisée en tisane pour soigner la gastro-entérite du nourrisson et l'ulcère à l'estomac (Lavergne, 2016).

Toutes ces utilisations traditionnelles s'expliquent par son potentiel antioxydant et anti-inflammatoire démontré par différentes études (Poullain et al., 2004; Neergheen-Bhujun et al., 2014). Les Laboratoires Roger et Bellon ont découvert dans l'extrait aqueux d'*Hubertia ambavilla Bory* un complexe glucidique, actif contre l'ulcère gastrique provoqué chez le rat, polyester du glucose et de l'acide (1-hydro-4-oxocyclohexa-2,5-diényl) acétique, qui se transforme en une lactone antiulcéreuse (Smadja et Marodon, 2016).

H. ambavilla a également été évaluée pour son potentiel antiviral. En effet, une étude a mis en évidence l'activité antivirale *in vitro* de l'*Ambaville* sur les virus de l'herpès (HSV-1) et de la poliomyélite de type 2 (PV) avec un index de sélectivité de 4 et 1,8 respectivement (Fortin et al., 2002). Le mécanisme d'action reste indéterminé.

c) Composition chimique

H. ambavilla contient principalement des flavonoïdes (hyperoside) et des tanins, qui lui confère son activité antivirale (Fortin et al., 2002). On retrouve également la présence de dérivés de l'acide quinique, possédant le groupement (1-hydro-4-oxocyclohexa-2,5-diényl) acétyle (Sprogøe et al., 2007).

Son huile essentielle est constituée majoritairement de l'allo-aromadendrène (40%) et de l'alpha-pinène (14%) (Smadja et Marodon, 2016).

III.2.6 *Mussaenda arcuata* ou *Lingue café*

a) Nom, origine et distribution géographique



Famille : *Rubiaceae*

Genre : *Mussaenda* L.

Espèce : *Mussaenda arcuata*

Le Lingue café tient son nom de « linga » qui signifie « faux » en malgache. Les premiers réunionnais d'origine malgache l'appelaient « faux café » à cause de sa ressemblance avec le café. Il est également appelé Gros lingue ou simplement Lingue à La Réunion.

Il s'agit d'une espèce indigène de La Réunion, de Maurice, de Madagascar ou encore d'Afrique tropicale. *Mussaenda arcuata* est principalement retrouvée dans les régions humides de basse et moyenne altitude (Smadja et Marodon, 2016).

b) Usages pharmacologiques

En usage externe, elle est utilisée pour ses propriétés anti-inflammatoire, pour soulager les érythèmes fessiers des jeunes enfants ou traiter l'acné. Mais aussi pour ses propriétés vulnérinaires, antibactériennes et antifongiques, lors de son utilisation pour le nettoyage de plaies (Smadja et Marodon, 2016).

En usage interne, cette plante est utilisée pour ses effets dépuratifs et rafraîchissants sous forme d'infusion ou de décoction car elle calme la fièvre. Elle est souvent utilisée contre la grippe (Chinamana et al., 1985). Elle possède également des vertus sudorifiques, toniques, fébrifuges ou encore purgatifs et permet de traiter la syphilis ou les rhumatismes (Lavergne, 2016; Smadja et Marodon, 2016).

Une autre étude a montré que les feuilles du Lingue café présentent un pouvoir anti-radicalaire et antioxydant (Poullain et al. 2004).

c) Composition chimique

Les feuilles du Lingue café retrouvées à La Réunion contiennent principalement des polyphénols (antraquinones), des flavonoïdes tels que l'astragaloside, l'isoquercitroside, le kaempférol-3-O-β-D-rutoside et le rutoside, et des coumarines (Smadja et Marodon, 2016).

III.2.7 *Psiloxylon mauritianum* ou Bois de pêche marron

a) Nom, origine et distribution géographique



Famille : *Myrtaceae*

Genre : *Psiloxylon* Thouars ex Tul.

Espèce : *Psiloxylon mauritianum*

Psiloxylon mauritianum est un arbre endémique de Maurice et de La Réunion. L'espèce n'est pas très connue et se développe généralement en forêt humide de moyenne altitude, le plus souvent entre 300 et 1000 m.

Son appellation vient des mots grecs « psilos » signifiant « dénudé » et de « xulon » qui désigne le « bois », *Psiloxylon mauritianum* est donc littéralement le « Bois nu mauricien », ainsi bien nommée pour l'aspect de son écorce. Le même sens est retrouvé dans l'appellation vernaculaire « Bois sans écorce ».

Cette plante porte encore d'autres noms, à Maurice elle est connue sous le nom de Bois de Bigaignon, Bois Bigayon ou encore Bois Biguignon. A La Réunion, outre Bois sans écorce, on la nomme aussi : Bois de gouyave marron, Bois de pêche marron ou Bois à gratter. Ce dernier vient du caractère irritant de la poudre de liège libérée lorsqu'on détache l'écorce (Smadja et Marodon, 2016).

b) Usages pharmacologiques

L'espèce est réputée astringente mais les usages médicaux traditionnels sont peu répandus. Un usage interne est décrit comme tisane « rafraîchissante » et l'écorce est quant à elle utilisée contre les diarrhées (Smadja et Marodon, 2016).

A Maurice, son utilisation traditionnelle reste présente, notamment dans la composition de tisane pour lutter contre le diabète de type 2 (Mootosamy et Fawzi Mahomoodally, 2014) mais également contre la dysenterie et l'aménorrhée (Gurib-Fakim et Brendler, 2004). Des études cliniques ont montré une activité diurétique, antiseptique et antispasmodique de *P. mauritianum* (Mahomoodally et al., 2014).

Actuellement, à La Réunion on observe un regain d'intérêt afin de valoriser à nouveau cette plante dans le traitement de l'albuminurie, de la goutte ou encore pour son action légèrement hypocholestérolémiante et astringente (Smadja et Marodon, 2016). En effet, elle diminue la formation d'acide urique dans le sang et permet l'élimination de l'excès de cholestérol (Brillant et al., 2006).

Elle a également été décrite pour son activité antioxydante et anti-radicalaire (Poullain et al., 2004). L'extrait brut acétonique des feuilles de *P. mauritianum* exerce une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* (Mahomoodally et al., 2014; Rangasamy et al., 2014).

c) Composition chimique

Une étude a permis de mettre en évidence la présence d'acide corosolique et asiatique, possédant tous les deux une activité anti-staphylocoques (Rangasamy et al., 2014). On note également dans les feuilles et l'écorce la présence de phénols, des flavanes et des tanins galliques. Ces tanins sont responsables de son activité astringente. Parmi les principaux flavonoïdes présents dans les feuilles de cette plante, on retrouve le kaempférol-7-O-glucoside, le quercétol et la vitéxine (Lavergne, 2016; Smadja et Marodon, 2016).

III.3 Méthodes d'extraction des principes actifs

En vue de l'étude des propriétés biologiques et pharmacologiques des plantes médicinales, il est possible d'extraire par diverses techniques les composés chimiques présents dans la plante. On peut trouver dans une plante deux grandes catégories de composés :

- Les composés organiques volatiles (COV) tels que les huiles essentielles
- Les composés organiques non volatiles (CONV). Il s'agit principalement des métabolites secondaires, par exemple les polyphénols, les terpènes, les stéroïdes, les alcaloïdes et d'autres composés dérivés de sucres, de lipides ou d'acides aminés.

III.3.1 Extraction des composés volatiles

a) L'hydrodistillation et ses variantes

L'une des méthodes la plus connue pour l'extraction de composés volatiles est l'hydrodistillation (Figure 13A). Cette technique est semblable à la méthode d'entraînement à la vapeur (steamdistillation), à la seule différence que l'hydrodistillation met en contact l'eau et la plante, ce qui n'est pas le cas dans la méthode d'entraînement à la vapeur. Cependant, dans les deux cas, il s'agit de méthodes d'extraction qui permettent d'entraîner avec la vapeur d'eau les composés volatiles de la plante.

Le principe de l'hydrodistillation est de porter à ébullition à pression atmosphérique, dans un ballon, un mélange d'eau et de plante dont on souhaite extraire l'huile essentielle. Lors de

l'ébullition, les cellules végétales vont éclater et libérer les molécules odorantes, qui sont alors entraînées par la vapeur d'eau créée.

Une fois condensées par un circuit réfrigérant, ces molécules sont récupérées, c'est ce que l'on appelle un hydrodistillat. Du fait de la différence de densité entre l'eau et les molécules aromatiques, l'hydrodistillat est constitué d'une phase aqueuse et d'une phase organique qui forme l'huile essentielle. Le procédé d'hydrodistillation présente plusieurs inconvénients tels que, le temps d'extraction très long (plusieurs heures), une consommation importante d'énergie nécessaire au chauffage du mélange eau-plante, mais également un risque d'hydrolyse ou de dégradation de certains composés, dû au contact direct de l'eau et de la plante mais aussi dû à la forte température appliquée pour faire chauffer le mélange.

Il existe des variantes de cette technique, la steamdistillation (Figure 13B) où le procédé est très proche de l'hydrodistillation, mais la plante n'est pas en contact direct avec l'eau. Dans ce cas, c'est uniquement la vapeur d'eau qui permet la libération de l'huile essentielle. Le non contact entre l'eau et la plante, évite l'hydrolyse et ou la dégradation des composés.

On décrit également la turbodistillation (Figure 13C) où le mélange plante-eau est continuellement agité à l'aide d'un agitateur en acier inoxydable. Cette méthode est principalement utilisée pour les matières végétales difficiles à traiter comme les racines ou les graines.

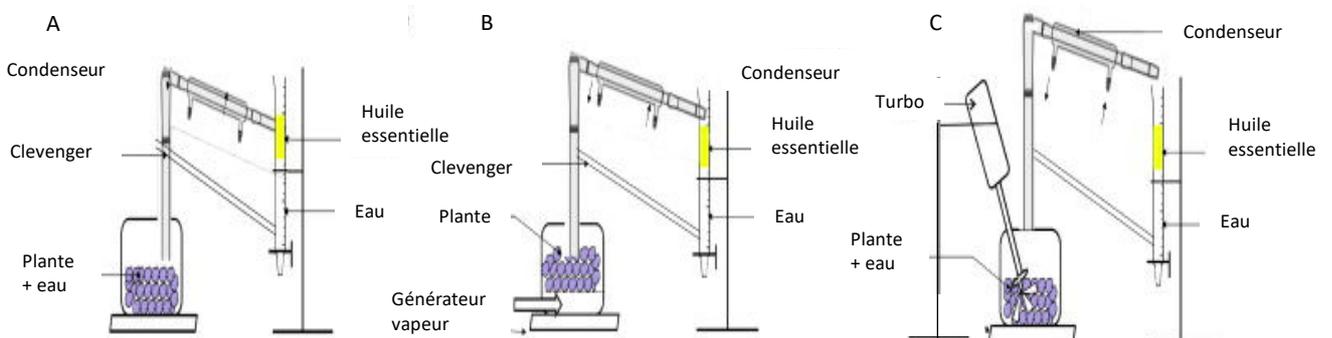


Figure 13 : Méthodes d'extraction conventionnelles des composés organique volatils (Périno-Issartier et al., 2013)

b) Extraction par fluide supercritique

Les extractions par fluide supercritique peuvent se faire avec différents fluides supercritiques. Un fluide est dit à l'état supercritique lorsqu'il atteint les conditions de température et de pression au-delà de son point critique. Le point critique est un point à partir duquel un « corps » possède des caractéristiques intermédiaires entre l'état gazeux et l'état liquide.

La méthode la plus utilisée et la plus connue est l'extraction au CO₂ supercritique. En effet, le dioxyde de carbone (CO₂) est largement utilisé grâce à ses nombreux avantages. Le CO₂ possède une température critique de seulement 32°C, ce qui permet de travailler à de faible température et de ne pas dénaturer les extraits obtenus. De plus l'extrait obtenu est exempt de solvant car lors du retour à l'état gazeux du CO₂, il s'élimine tout seul de l'échantillon (Fornari et al., 2012).

Lors de l'extraction, la matière végétale broyée est placée dans un « panier » cylindrique, équipé de filtres aux deux extrémités, lui-même placé dans l'extracteur. La circulation du CO₂ à l'état supercritique est assurée par une pompe. L'extrait est alors solubilisé avec le CO₂ sous forme de fluide. A la sortie de l'extracteur, la chute de pression entre la valve de dépressurisation et le séparateur (S1), va permettre de séparer l'extrait et le CO₂. Certains appareils peuvent être équipés de plusieurs séparateur afin de permettre le fractionnement de l'extrait en une ou plusieurs fractions selon les conditions de température et de pression appliquées.

Une fois l'extraction effectuée, le CO₂ est filtré, envoyé dans le liquéfacteur et stocké avant d'être réutilisé (Fornari et al., 2012) (Figure 14).

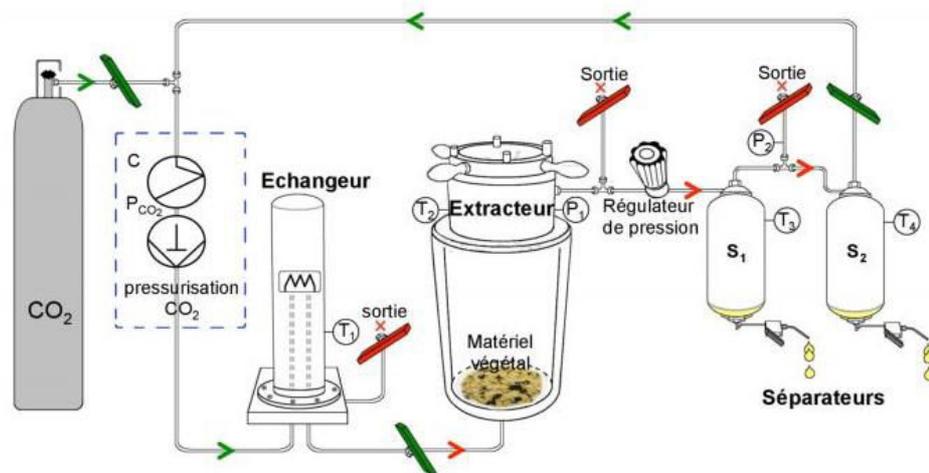


Figure 14 : Schéma d'une extraction au CO₂ supercritique (Tai Technologies, 2018)

c) Extraction assistée par micro-ondes

Les extractions assistées par micro-ondes sont de façon générale, des méthodes conventionnelles auxquelles ont été appliqué le chauffage par micro-ondes. Les micro-ondes sont des rayonnements électromagnétiques de longueur d'onde comprises entre 30 cm (1 GHz) et 1 mm (300 GHz), soit des ondes comprises entre la radiodiffusion et l'infrarouge.

On distingue différents types d'extractions assistées par micro-ondes :

- L'hydrodistillation par micro-ondes (Figure 15A). Il s'agit du même principe qu'une hydrodistillation classique à l'exception qu'un ballon, contenant la matière végétale et de l'eau, est placé dans le four à micro-ondes. Ce montage va ainsi permettre le chauffage de l'eau et du matériel végétal par les micro-ondes ;
- Hydrodiffusion par gravité et micro-ondes (Figure 15B). Dans cette méthode, la matière végétale est chauffée par micro-ondes sans addition de solvants ou d'eau.

L'interaction directe entre les micro-ondes et l'eau intracellulaire végétale va permettre la récupération par gravité de l'extrait aromatique ;
 Steam diffusion par micro-ondes (Figure 15C). Ce procédé est très semblable au précédent, cependant dans cette technique on ajoute de la vapeur d'eau via un générateur qui va permettre d'accélérer le processus d'extraction par gravité.

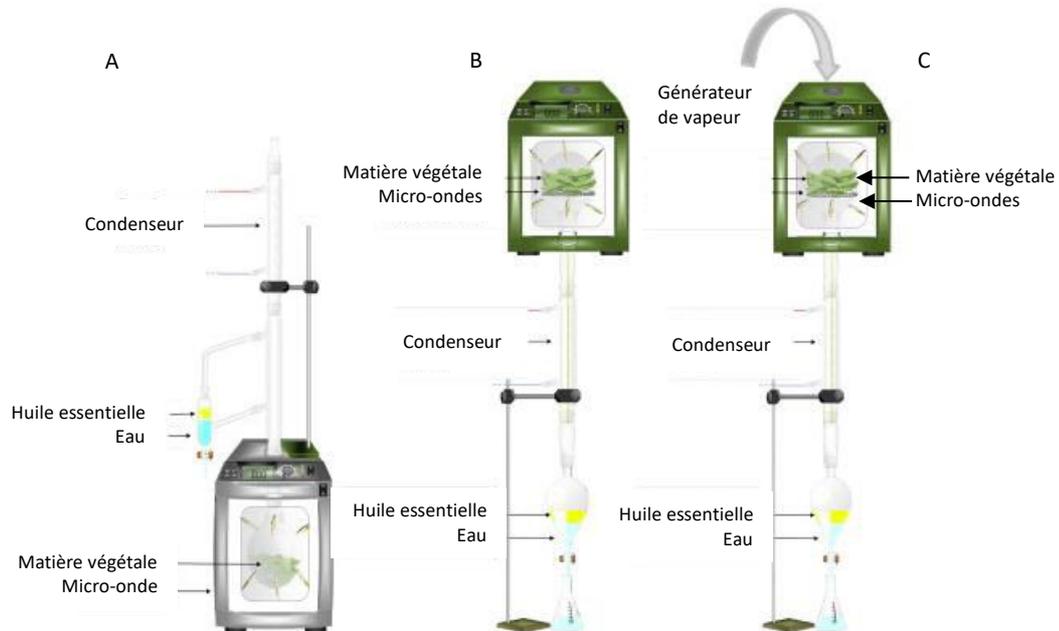


Figure 15 : Différentes méthodes d'extraction assistées par micro-ondes (Périno-Issartier et al., 2013)

Ces méthodes d'extraction assistées par micro-ondes sont caractérisées par leur rapidité d'extraction, une économie d'énergie, l'utilisation moindre de solvant ou d'eau. (Bousbia et al., 2009; Farhat et al., 2009, 2011; Périno-Issartier et al., 2013).

III.3.2 Extraction des composés non volatiles

Il existe différentes techniques qui permettent d'extraire les métabolites secondaires. On peut citer les techniques d'extractions traditionnelles et les techniques d'extractions innovantes.

a) Extraction traditionnelle

Les extractions « traditionnelles » comprennent les méthodes utilisées de façon traditionnelle par la population depuis des millénaires mais également des méthodes classiquement utilisées en laboratoire pour l'extraction de métabolites secondaires.

Parmi les techniques couramment utilisées on retrouve :

- L'infusion, où la matière végétale est mise en présence d'un liquide initialement bouillant, que l'on laisse ensuite refroidir. Le liquide peut être de l'eau, de l'alcool ou de l'huile.

- La décoction, où la plante est immergée dans de l'eau froide puis le tout est porté à ébullition et maintenu à 100°C entre 2 et 20 minutes. Cette méthode permet une extraction plus complète des principes actifs mais certains peuvent plus facilement être dégradés à cause du chauffage élevé.
- La macération, où la plante est immergée dans un solvant froid (eau, solution alcoolique, huile) au moins pendant une nuit et jusqu'à 24h pour en extraire les composés solubles.

b) Extraction par extracteur Soxhlet

Cette technique permet d'effectuer une extraction par solvant, en continue, de composés chimiques présents dans un extrait solide. Le solvant, présent dans un ballon, est porté à ébullition. Les vapeurs de ce dernier passent dans le tube adducteur, se condensent dans le réfrigérant et retombent dans l'extracteur où l'extrait est présent. Le solide va ainsi macérer dans le solvant. Il y a ensuite retour du solvant enrichi en substances extraites, dans le ballon lorsque que le solvant s'accumule dans l'extracteur et atteint le sommet du tube-siphon. Ce retour de liquide va permettre au solvant contenu dans le ballon de se charger progressivement en substances extraites, de composés solubles de l'extrait. Par la suite le solvant va continuer à s'évaporer mais les substances extraites vont quant à elles rester dans le ballon (Figure 16).

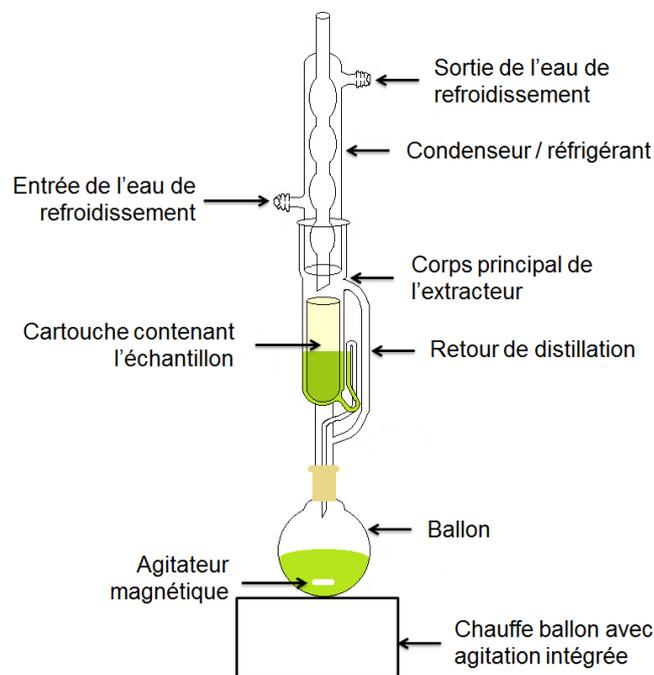


Figure 16 : Extracteur Soxhlet (Do, 2016)

c) Extraction sans solvant assistée par micro-ondes

La technique d'extraction assistée par micro-onde peut, comme nous l'avons vu précédemment, être utilisée pour l'obtention d'extraits aromatiques mais également pour obtenir des métabolites secondaires, tels que les composés phénoliques ou flavonoïdes (Zill-E-Huma et al., 2009; Reis et al., 2015; Quoc and Muoi, 2016; Périno et al., 2016; Şahin et al., 2017).

Il s'agit d'un procédé qui permet l'extraction d'une substance assistée par des micro-ondes, à partir d'un matériel solide ou liquide, vers une phase liquide.

Dans le cas de matière végétale, les micro-ondes vont chauffer l'eau intracellulaire, avec ou sans ajout de solvant organique ou d'eau supplémentaire. Dans le cas où aucun solvant est utilisé, c'est directement l'eau intracellulaire végétale que l'on récupère par simple système de gravité (comme présenté précédemment lors de l'hydrodiffusion par micro-ondes). Dans cette méthode, ce n'est pas une huile essentielle ou un extrait aromatique qui est récupéré, mais un extrait brut de la plante chargé en métabolites secondaires. En effet, dans ce système il n'y a pas de condensateur, ni de phase de décantation pour séparer l'huile de l'hydrolat (Figure 17).

Il est indispensable dans cette technique, d'utiliser un matériel végétal frais avec un pourcentage d'humidité au moins supérieur ou égale à 50%. En effet, un pourcentage d'eau intracellulaire trop faible peut entraîner un séchage trop important et brûler la plante.

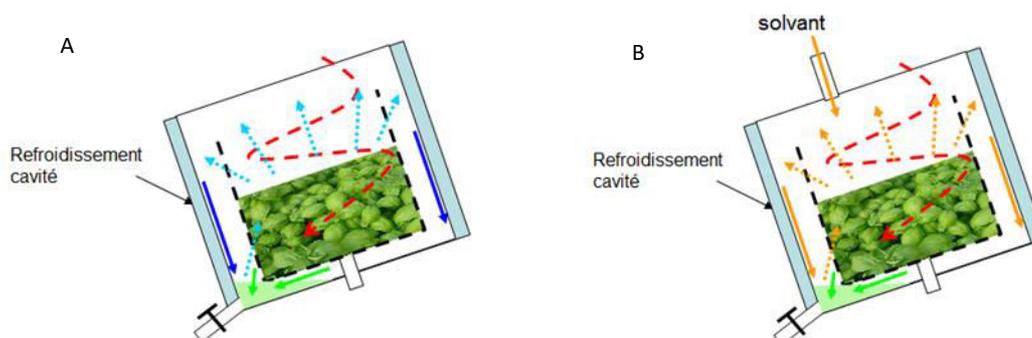


Figure 17 : Principe de l'extraction assistée par micro-ondes (IDCO France)

La matière végétale fraîche est placée dans un bol perforé rotatif, ce dernier est lui-même placé dans une cuve aux parois refroidies par un système de refroidissement à l'eau. Les micro-ondes vont permettre l'évaporation de l'eau intracellulaire végétale avec entrainement des molécules d'intérêt. Les vapeurs d'eau vont ensuite se condenser sur les parois de la cuve pour donner une eau végétale très riche, dont une partie sera à nouveau vaporisée, et va circuler dans la plante pour continuer sur plusieurs cycles et optimiser l'extraction (Figure 15A). Ce procédé va durer environ 20 à 30 minutes selon le matériel végétal. Cette technique peut également être utilisée avec l'apport d'une faible quantité de solvant (Figure 15B), pour améliorer le rendement d'extraction et/ou cibler certains types de métabolites.

Partie 2 : Résultats et discussion

I. Échantillonnage et criblage des plantes médicinales sélectionnées

Les travaux de cette étude ont été consacrés à l'identification des substances naturelles antivirales issues des plantes médicinales réunionnaises récemment inscrites à la pharmacopée française. Ainsi l'objectif principale de cette étude s'attache à la lutte contre le virus zika, déclaré en 2016 par l'OMS comme une urgence de santé publique mondiale.

Pour réaliser cette étude, nous avons établi une liste des plantes médicinales candidates (tableau 2) suite à l'application de différents critères de sélection cités dans le chapitre précédent. En collaboration avec une start-up locale (Extraits de Bourbon) nous avons réalisé les extractions des sept plantes via la technique d'extraction assistée par micro-ondes. Parallèlement, nous avons mis en place un modèle cellulaire en utilisant un clone moléculaire du ZIKV avec un gène rapporteur (ZIKV-GFP). Ce dernier nous a permis de cribler d'une manière efficace les plantes médicinales sélectionnées et d'en identifier deux extraits actifs anti-ZIKV.

Noms Latins	Noms vernaculaires	Localisation	Usages pharmacologiques
<i>Antirhea borbonica</i>	Bois d'osto	Endémique des Mascareignes	Diarrhées, dysenteries, ulcères d'estomac, cicatrisante et hémostatique (Lavergne, 2016; Smadja et Marodon, 2016)
<i>Aphloia theiformis</i>	Change écorce	Afrique de l'Est, Madagascar, et les îles des Mascareignes.	Anti-inflammatoire, antioxydant et anti radicalaire (Poullain et al., 2004; Neergheen-Bhujun et al., 2014), diurétique (Adsersen et Adsersen, 1997), anti-malaria (Jonville et al., 2008), antifongique et antibactérienne (de Boer et al., 2005) et antidiabétique (Picot et Mahomoodally, 2017; Picot et al., 2017a)
<i>Ayapana triplinervis</i>	Ayapana	Originaire d'Amérique tropicale, retrouvée à La Réunion et à l'île Maurice	Troubles de digestion (Suroowan et Mahomoodally, 2013; Sreekeesoon et Mahomoodally, 2014; Samoisy et Mahomoodally, 2015), activité antimicrobienne et anti-inflammatoire (Gauvin-Bialecki et Marodon, 2008)
<i>Dodonaea viscosa</i>	Bois de reinette	Afrique, Amérique, et le sud de l'Inde.	Diurétique (Adsersen et Adsersen, 1997), gastro-protecteur (Arun et Asha, 2008), anti-inflammatoire (Khalil et al., 2006; Salinas-Sánchez et al., 2012), antifongique (Patel et Coogan, 2008; Pirezada et al., 2010), antibactérien (Getie et al., 2003; Khurram et al., 2009; Naidoo et al., 2012), anti diabétique (Veerapur et al., 2010b, 2010a) et antiviral (Getie et al., 2003; Shaheen et al., 2015)
<i>Hubertia ambavilla</i>	Ambaville	Endémique de La Réunion et de Maurice	Ulcères d'estomac, dermatoses, anti-radicalaire, antioxydant, anti-inflammatoire (Poullain et al., 2004; Neergheen-Bhujun et al., 2014), antiviral (Fortin et al., 2002) , diurétique (Adsersen et Adsersen, 1997)
<i>Mussaenda arcuata</i>	Lingue Café	Afrique tropicale, Madagascar, La Réunion et Maurice	Fièvre, grippe (Chinemana et al., 1985), anti-inflammatoire (Poullain et al., 2004)
<i>Psiloxylon mauritianum</i>	Bois de pêche marron	Endémique de La Réunion et de l'île Maurice	Effet astringent, antioxydant (Poullain et al., 2004), antidiabétique (Mootoosamy et Fawzi Mahomoodally, 2014) et antibactérienne (Mahomoodally et al. 2014; Rangasamy et al. 2014)

Tableau 2 : Liste des sept plantes médicinales réunionnaises sélectionnées, inscrites à la pharmacopée française en 2015.

I.1 Échantillonnage des plantes médicinales réunionnaises sélectionnées

Les sept plantes sélectionnées ont été extraites grâce à l'utilisation d'une technique d'extraction plus économique et plus écologique que les procédés d'extractions classiques. Il s'agit de la technique d'Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes (ESSAM) (Zill-E-Huma et al., 2009; Şahin et al., 2017). Les extractions ont été effectuées en collaboration avec la Start-up Extrait de Bourbon (EDB). Comparativement aux méthodes classiques comme le soxhlet, la technique ESSAM présente de nombreux avantages, tels que (Zhao et al., 2018):

- un temps d'extraction réduit comparativement aux méthodes d'extractions classiques ;
- un chauffage modéré permettant de récupérer un maximum de métabolites secondaires non dégradés ou oxydés ;
- une économie d'énergie et de solvant.

La technique ESSAM est également décrite pour permettre une extraction plus importante des composés secondaires tels que les polyphénols, notamment dans l'oignon, dans les feuilles d'olivier, la laitue ou encore le raisin (Zill-E-Huma et al., 2009; Al Bittar et al., 2013; Périno et al., 2016; Şahin et al., 2017). Contrairement à ces études, nous avons utilisé un modèle semi-industriel avec les parois de l'extracteur refroidies. Cela permet un recyclage des vapeurs d'eau facilitant ainsi l'extraction, tout en réduisant le risque de brûlure de la matière végétale.

Les extractions ont été effectuées par lot de 500 g de plante. Une puissance moyenne de 2W/g de plante a été appliquée pour cette étude avec une moyenne de 30 minutes d'extraction. Dans cette étude uniquement 50% de la masse totale d'eau présente dans chaque plante a été extraite. L'eau intracellulaire végétale ainsi obtenue est ensuite récupérée par gravité, filtrée et lyophilisée.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Nom botanique	Quantité de matière fraîche totale (g)	% humidité	Puissance/500g de plante (W)	Temps d'extraction (mn)	Rendement (% MF)
<i>A. borbonica</i>	2000	63	1000	20	0,37%
<i>A. theiformis</i>	2989	48	1000	30	0,31%
<i>A. triplinervis</i>	3250	79	1500	45	1,75%
<i>D. viscosa</i>	1000	60	1000	25	0,32%
<i>H. ambavilla</i>	2000	59	800	20	0,40%
<i>M. arcuata</i>	1000	70	800	30	0,57%
<i>P. mauritianum</i>	2080	63	1000	20	0,16%

Tableau 3 : Paramètres et rendements des extractions par micro-ondes pour les sept plantes médicinales réunionnaises sélectionnées.

W : Watt, % MF : pourcentage de matière fraîche

Le tableau 3 indique les rendements obtenus pour chacune des sept plantes étudiées. Les rendements obtenus sont compris entre 0,16% et 1,75% par rapport à la masse de matière fraîche de départ. Les valeurs obtenues sont faibles comparativement aux valeurs décrites dans la littérature. Les rendements varient de 3% à 80% selon les études, mais restent supérieurs à nos valeurs (Zill-E-Huma et al., 2009; Reis et al., 2015; Caputo et al., 2018). De nombreux paramètres entrent en jeu dans le rendement d'extraction, et les plus importants sont la puissance appliquée et le temps d'extraction.

La puissance appliquée dans nos travaux est d'environ 2W/g de plante. Plusieurs études décrivent une puissance optimale de 1W/g (Zill-E-Huma et al., 2009; Al Bittar et al., 2013; Périno et al., 2016).

Le temps d'extraction moyen appliqué était de 30 minutes. Ce qui est en accord avec différentes études, avec un temps d'extraction compris entre quelques minutes et 1h maximum (Zill-E-Huma et al., 2009; Périno-Issartier et al., 2011; Şahin et al., 2017).

Nos rendements auraient pu être plus importants en diminuant la puissance et en augmentant légèrement le temps d'extraction. Un autre paramètre intervient dans le rendement d'extraction, la quantité de matière à extraire. En effet, si la matière est fine et peu condensée, l'extraction sera meilleure. Des études montrent qu'en diminuant la quantité de matière ou en augmentant le degré de broyage, le rendement est augmenté (Hao et al., 2002; Şahin et al., 2017). Cela s'explique par une meilleure dispersion et pénétration des micro-ondes dans la matière à extraire (Delazar et al., 2012).

Ce faible rendement s'explique également du fait que nous avons choisi d'extraire uniquement 50% de l'eau intracellulaire pour éviter de brûler du matériel végétal. Le pourcentage d'eau intracellulaire couramment récupéré est de l'ordre de 80 à 90% (Zill-E-Huma et al., 2009; Périno et al., 2016). Ainsi, plus la plante possède un pourcentage d'humidité important, plus le rendement obtenu est important (tableau 3). *A. triplinervis* présente un taux d'humidité proche de 80%, donnant ainsi le meilleur rendement de 1,75%. De même, les plantes avec des pourcentages d'humidité proches (60 et 70%) vont obtenir un rendement similaire autour de 0,30 et 0,40%, à l'exception de *P. mauritianum* qui donne le rendement le plus faible avec 0,16% même avec un pourcentage d'humidité de 63%.

Ces études montrent également, qu'à forte puissance et pour un temps d'extraction très court, une quantité importante de polyphénols peut être extraite (Al Bittar et al., 2013; Périno et al., 2016). Sachant que les composés phénoliques ont été décrits pour leur activité antivirale (Johari et al., 2012; Zhang et al., 2012b; Yang et al., 2014; Moghaddam et al., 2014; Carneiro et al., 2016), nos extractions ont été effectuées à forte puissance afin de récupérer un maximum de polyphénols. Il serait intéressant, d'effectuer de nouvelles extractions en modifiant les paramètres de puissance et de temps d'extraction, afin de comparer le taux de polyphénols présent dans les extraits, mais aussi leur activité antivirale.

Cette technique présente l'avantage d'utiliser de la matière fraîche végétale, favorisant ainsi son application à des plantes locales à fort potentiel biologique. Nous avons choisi dans ces travaux de récolter la matière végétale fraîche toujours au même lieu afin de

minimiser le facteur environnemental. Cependant, il serait intéressant d'évaluer les rendements et l'activité biologique associée, d'extraits obtenus sur des lieux de récolte différents. Cela afin de déterminer le degré d'influence de l'environnement sur la teneur en métabolites secondaires. L'approvisionnement des plantes et plus particulièrement pour *Aphloia theiformis* et *Psiloxylon mauritianum*, s'est effectué à différentes périodes de l'année en fonction de la disponibilité.

I.2 Cytotoxicité et activité antivirale des plantes médicinales sélectionnées

I.2.1 Évaluation de la cytotoxicité des éco-extraits

Une fois les éco-extraits obtenus, la cytotoxicité de chacun d'entre eux a été évaluée sur un modèle cellulaire de cellules Vero en utilisant le test MTT, qui détermine l'activité mitochondriale des cellules. Les extraits ont été mis en solution dans du milieu de culture et une gamme de concentration de 4 à 4000 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ a été appliquée sur les cellules Vero pendant 24h afin d'obtenir des courbes dose-réponses. La concentration cytotoxique entraînant une mortalité de 50% des cellules (CC_{50}) ainsi que la dose maximale non cytotoxique (MNTC) en établissant un seuil d'au moins 90% de viabilité, ont été déterminées graphiquement. Cette dose maximale non cytotoxique est ensuite utilisée pour effectuer l'évaluation de l'activité antivirale contre le ZIKV.

Nom botanique	CC_{50} ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)	MNTC ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)
<i>Antirhea borbonica</i>	2053 \pm 924,5	208 \pm 96,7
<i>Aphloia theiformis</i>	2931 \pm 456,9	697 \pm 138
<i>Ayapana triplinervis</i>	1084 \pm 220,6	250 \pm 220
<i>Dodonaea viscosa</i>	498 \pm 67,4	137 \pm 84,4
<i>Hubertia ambavilla</i>	2226 \pm 160,7	190 \pm 108
<i>Mussaenda arcuata</i>	4627 \pm 35	236 \pm 109
<i>Psiloxylon mauritianum</i>	1044 \pm 106,2	201 \pm 15,2

Tableau 4 : Cytotoxicité des éco-extraits.

Les cellules Vero ont été traitées avec différentes concentrations des éco-extraits pendant 24h puis la cytotoxicité a été observée par le test MTT. La CC_{50} (concentration cytotoxique à 50%) et la MNTC (concentration maximale non cytotoxique) ont été déterminées par une courbe de régression. Les résultats sont représentés comme une moyenne \pm erreur standard de trois expériences indépendantes ($n=3$).

Les CC_{50} varient entre 498 \pm 67,4 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ et 4627 \pm 35 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, représentant les valeurs obtenues pour les extraits de *Dodonaea viscosa* et *Mussaenda arcuata* respectivement. On retrouve cependant plusieurs extraits qui présentent une cytotoxicité semblable avec des CC_{50} comprises entre 2000 et 3000 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, tels que *Antirhea borbonica*, *Aphloia theiformis* et

Hubertia ambavilla. Cette différence de toxicité pourrait s'expliquer par une différence de composition chimique entre les différents extraits.

La cytotoxicité des plantes médicinales réunionnaises a été peu étudiée, à notre connaissance aucune étude sur la cytotoxicité *in vitro* de *Mussaenda arcuata* et d'*Ayapana triplinervis* n'a été menée. Pour l'extrait de *H. ambavilla* nous observons une cytotoxicité peu importante de $2226 \pm 160,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ comparativement à celle décrite pour l'extrait méthanolique de cette même plante, à $680 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Fortin et al., 2002).

D. viscosa est l'extrait le plus toxique de notre étude, cependant cette cytotoxicité est inférieure à celle observée pour un extrait hydro-alcoolique sur des cellules Hela, MDCK ou GMK avec des CC_{50} de $96.17 \pm 13.86 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $170 \pm 74,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $25,7 \pm 5,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivement (Getie et al., 2003). Concernant l'extrait d'*Aphloia theiformis*, les résultats obtenus montrent que notre éco-extrait est moins toxique qu'un extrait méthanolique de la même plante. La toxicité a été évaluée dans ces études sur la lignée cellulaire A549 ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$) mais également sur d'autres lignées humaines de fibroblastes de la peau WS1 ($61 \mu\text{g.mL}^{-1}$) et de poumon WI-38 ($58,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Jonville et al., 2008, 2011). La toxicité d'un extrait brut aqueux d'*A. theiformis* sur des cellules HEK peut être jusqu'à 6 fois plus importante (Picot et al., 2017b) comparativement à nos résultats.

L'extrait de *P. mauritianum* apparaît moins toxique, qu'un extrait acétonique de *P. mauritianum* avec une CC_{50} de $52,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ sur des cellules ovariennes de hamster chinois (Rangasamy et al., 2014). Nous avons donc une cytotoxicité 20 fois moins importante que celle rapportée par Rangasamy et son équipe.

Ainsi, nous remarquons que les extraits de *P. mauritianum* et d'*A. theiformis* obtenus après extraction au méthanol, montrent une cytotoxicité plus importante que pour les éco-extraits. L'augmentation de cytotoxicité pourrait être liée à l'utilisation du méthanol (Yang et al., 2005).

En générale, les extraits obtenus par micro-ondes démontrent ainsi une cytotoxicité moins importante que des extraits obtenus par extraction et utilisation de solvants.

1.2.2 Évaluation de l'activité antivirale des éco-extraits

Afin d'évaluer l'activité antivirale des éco-extraits issus des plantes médicinales sélectionnées, nous avons mis en place un modèle cellulaire. Ce dernier permet un criblage rapide de l'activité antivirale avec l'utilisation des cellules Vero et d'un clone moléculaire dérivé de la souche ancestrale du virus zika MR766, exprimant le gène rapporteur GFP (Green Fluorescent Protein)(Gadea et al., 2016) (Annexe 1).

Les cellules Vero ont été infectées par le clone moléculaire ZIKV-GFP à une multiplicité d'infection (MOI) de 1 et traitées simultanément avec les éco-extraits, à une dose maximale non cytotoxique (MNTC), pendant 24h. Après 24h d'infection les cellules ont été analysées par cytométrie en flux pour observer le pourcentage de fluorescence, pouvant ainsi être corrélé au pourcentage de cellules infectées.

Sur les sept éco-extraits testés, trois d'entre eux montrent une activité antivirale : *Aphloia theiformis*, *Dodonaea viscosa* et *Psiloxylon mauritianum* avec une diminution significative du pourcentage de cellules GFP-positives.

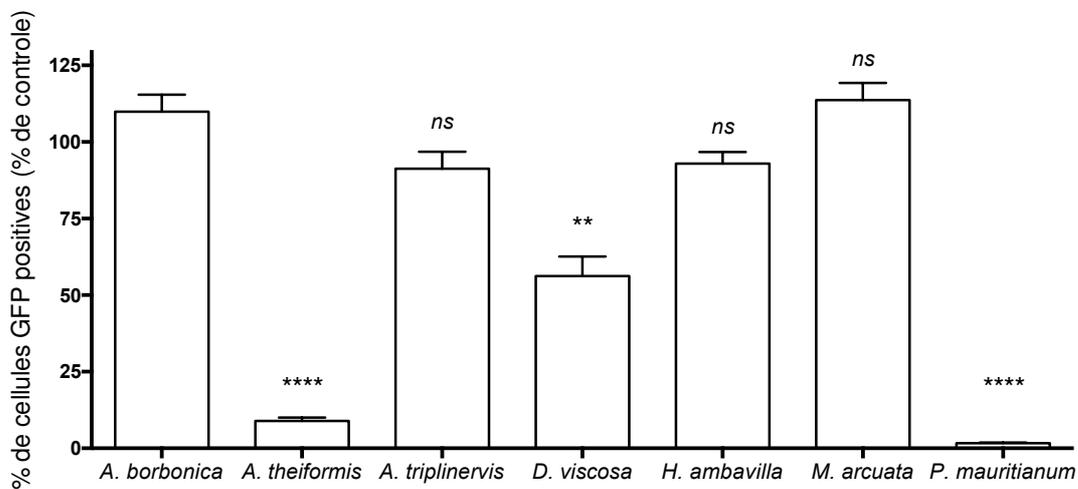


Figure 18 : Évaluation de l'activité antivirale des éco-extraits des sept plantes médicinales réunionnaises sélectionnées.

Les cellules Vero ont été infectées par le clone moléculaire ZIKV-GFP à une MOI de 1 et simultanément traitées avec la dose maximale non cytotoxique de chaque extrait pendant 24h. Le pourcentage de cellules exprimant la GFP est observé par cytométrie en flux 24h post infection. Les résultats sont représentés comme une moyenne \pm erreur standard de trois expériences indépendantes ($n=3$) et exprimées en pourcentage relatif du contrôle infecté non traité par un éco-extrait. (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; ns = non significatif)

L'extrait de *D. viscosa* présente une activité antivirale avec une diminution de 40% de la fluorescence. Cependant les extraits d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum* montrent une activité antivirale plus importante que *D. viscosa* avec une diminution significative de la fluorescence de plus de 90% à une dose maximale non cytotoxique $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ et $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivement. Ces résultats semblent en adéquation avec la littérature car ces plantes ont déjà été décrites pour leur activité antivirale. *D. viscosa* possède une activité antivirale face au coxsackievirus B3 et rotavirus (Shaheen et al., 2015). De même dans les travaux de thèse du Dr Poullain, *A. theiformis* et *P. mauritianum* présente également une activité antivirale face au virus chikungunya (Poullain, 2004). Ces travaux sont également validés dans une étude récente sur l'activité anti-CHIKV d'extraits méthanoliques et aqueux d'*A. theiformis* (Ledoux et al., 2018). Nos travaux démontrent pour la première fois l'activité antivirale de ces plantes contre le ZIKV.

Il s'agit dans toutes ces études uniquement de virus à ARN enveloppé comme le ZIKV, ce qui pourrait expliquer l'activité antivirale pour chacune de ces plantes. Néanmoins, *H. ambavilla* a été décrite pour son activité antivirale contre les virus de la polio et de l'herpès (Fortin et al., 2002), alors que dans notre étude, cette plante ne présente aucune inhibition de l'infection par le ZIKV. Il est possible que la méthode d'extraction n'ait pas permis de

récupérer les molécules actives, ou que les composés responsables de cette activité antivirale ne sont pas actifs contre ZIKV.

1.2.3 Détermination de la génotoxicité d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum*

La suite de l'étude porte essentiellement sur les deux extraits les plus actifs contre le ZIKV : *Aphloia theiformis* (Change écorce) et *Psiloxylon mauritianum* (Bois de pêche marron). Avant de caractériser le mode d'action des deux éco-extraits, nous avons souhaité évaluer leur cytotoxicité sur différentes lignées humaines A549, kératinocytes (culture primaire ; HKPM) et fibroblastes (culture primaire ; FMa). Les cellules ont été traitées comme précédemment avec différentes concentrations d'extraits (4-4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) pendant 24h. Les courbes doses-réponses sont représentées dans la figure 19.

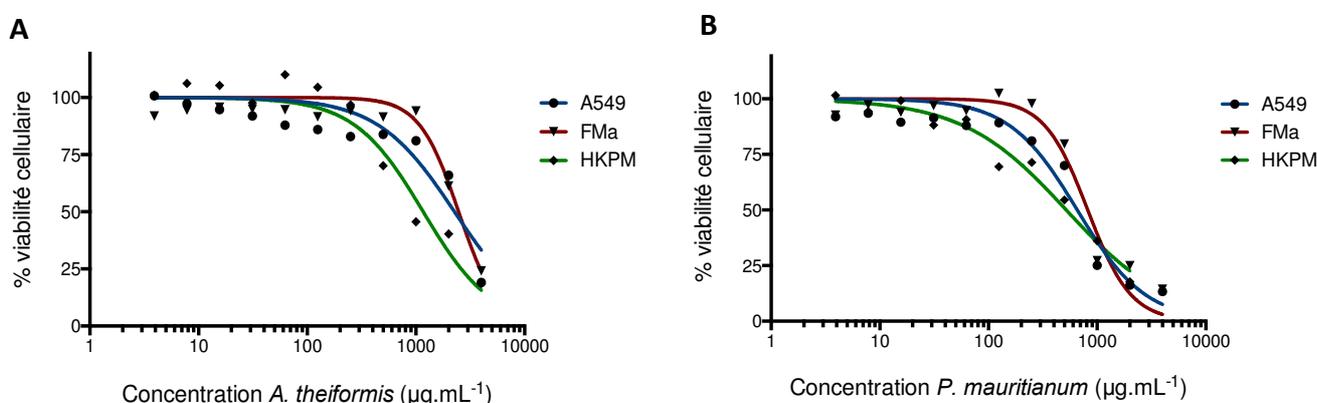


Figure 19 : Cytotoxicité des éco-extraits d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum* sur des lignées cellulaires humaines.

Les cellules ont été traitées avec différentes concentrations des deux éco-extraits pendant 24h puis la cytotoxicité a été évaluée par le test MTT. La CC_{50} (concentration cytotoxique à 50%) et la MNTC (concentration maximale non cytotoxique) ont été déterminées par une courbe de régression. Les résultats sont représentés comme une moyenne \pm erreur standard de trois expériences indépendantes ($n=3$).

Nous remarquons que pour les trois lignées cellulaires, les courbes dose-réponse de chacun des éco-extraits sont relativement similaires. Ces courbes ont permis de déterminer graphiquement une CC_{50} et une dose maximale non cytotoxique (MNTC), pour chaque extrait et pour chacune des lignées cellulaires testées (figure 19, tableau 5). Le seuil de viabilité est établi à 90% pour la MNTC.

	<i>A. theiformis</i>		<i>P. mauritianum</i>	
	CC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	MNTC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	MNTC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
A549	2267 ± 417	500 ± 52	$657 \pm 15,7$	$347,2 \pm 15,5$
FMa	2656 ± 262	1500 ± 413	$820 \pm 26,5$	$422 \pm 9,2$
HKPM	$730,7 \pm 31,6$	$209,4 \pm 128$	$353 \pm 84,4$	$17,3 \pm 4,8$

Tableau 5 : CC_{50} et MNTC des éco-extraits d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum* sur des lignées cellulaires humaines.

CC_{50} : concentration cytotoxique à 50% ; MNTC : concentration maximale non cytotoxique

L'extrait de *P. mauritianum* montre une cytotoxicité jusqu'à 3 fois supérieure à celle d'*A. theiformis* pour les lignées cellulaires testées. Cependant, on remarque que les lignées humaines semblent plus sensibles que les cellules Vero. La cytotoxicité apparaît plus importante pour les kératinocytes (HKPM), comparativement aux A549. Ces résultats sont en accord avec ceux observés lors d'un traitement au sodium dodécyle sulfate (SDS) sur des cellules primaires et des lignées humaines. Les kératinocytes humains primaires meurent à des doses trois fois plus basses que pour la lignée HaCaT (Olschläger et al., 2009). Les fibroblastes néanmoins sont aussi sensibles que les A549. Les mêmes résultats sont observés entre des fibroblastes primaires et des fibroblastes immortalisés (3T3) de souris toujours lors d'un traitement au SDS (Olschläger et al., 2009). Nos résultats montrent que les cellules primaires humaines sont plus sensibles aux éco-extraits que les lignées cellulaires testées.

De plus, lors d'un traitement avec l'extrait d'*A. theiformis* sur les cellules A549 nous observons une CC_{50} proche de celle observée sur les cellules Vero (tableau 4). Cependant, un extrait méthanolique d'*A. theiformis* présente une CC_{50} de $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ et de $61 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans des A549 et dans des WS1 (lignée de fibroblastes humains) (Jonville et al., 2008, 2011). Ainsi, dans nos travaux *A. theiformis* est 50 fois moins toxique.

Même si les plantes médicinales sont souvent considérées comme sûres et inoffensives, différentes études ont montré que certains extraits de plantes médicinales provoquent des dommages à l'ADN des cellules (Santos et al., 2012; Ping et al., 2013; Lin et al., 2014; Araújo et al., 2015).

Le potentiel génotoxique des éco-extraits a été évalué sur différents types cellulaires humains. Pour cela des tests COMET ont été effectués. Cette technique permet de visualiser les dommages induits à l'ADN lors d'un traitement par une molécule ou une drogue. Grâce à un intercalant de l'ADN, les cassures sont visibles après migration, sous forme de comètes. Plus l'intensité de la queue de la comète est importante, plus le traitement induit des dommages à l'ADN.

Les cellules ont été traitées avec les doses maximales non cytotoxiques des éco-extraits d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum* pendant 24h (figure 20).

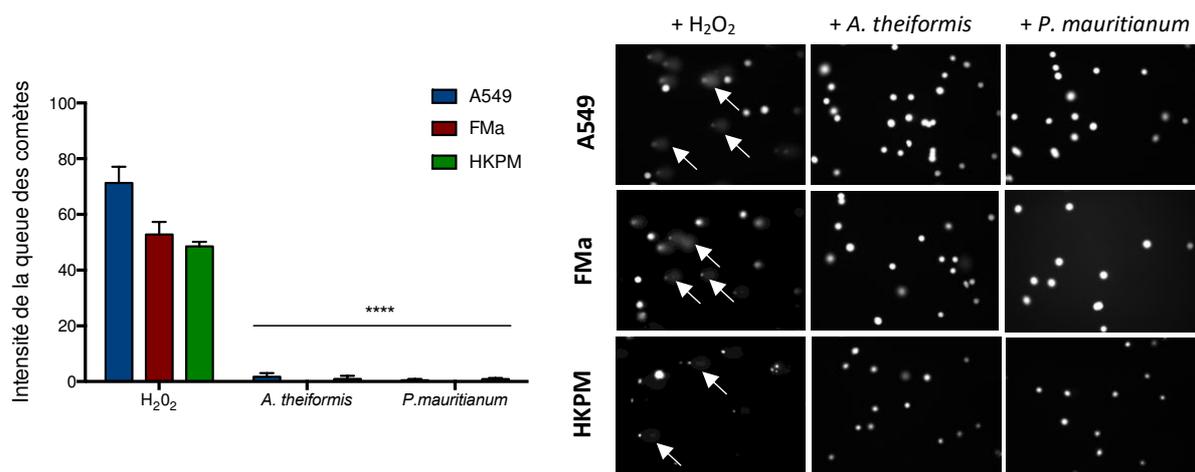


Figure 20 : Évaluation de la génotoxicité des éco-extraits d'*A. theiformis* et de *P. mauritanum* sur des cellules humaines.

Les cellules ont été traitées 24h avec les MNTC des éco-extraits. Le test COMET a été effectué. Les comètes sont visualisées grâce au Gel red et analysées avec le logiciel COMET Assay IV. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm erreur standard de l'intensité de la queue des comètes à partir de trois expériences indépendantes ($n=3$). Les images sont représentatives de trois expériences indépendantes ($n=3$). Les flèches blanches indiquent les comètes.

L'H₂O₂ a été utilisé comme contrôle afin de faciliter la comparaison entre un agent délétère connu pour l'ADN et les extraits. La figure 20 montre que suite à un traitement de 24h avec les éco-extraits, les cellules ne présentent pas de formation de comètes, indiquant que les éco-extraits ne possèdent pas d'effet génotoxique.

D'autres tests de cytotoxicité *in vivo* chez des petits animaux présentent un grand intérêt dans le cadre d'une formulation de ces plantes en agents antiviraux. Ces tests permettraient d'évaluer à la fois la toxicité et/ou génotoxicité mais également la biodisponibilité des métabolites de ces plantes médicinales lors d'une prise orale par exemple.

Ces résultats confirment que les éco-extraits n'induisent pas une génotoxicité sur différents types cellulaires humains. Cette étape nous permet d'approfondir la caractérisation de l'activité antivirale et le mode d'action des extraits d'*A. theiformis* et de *P. mauritanum*.

II. Caractérisation de l'activité antivirale d'*Aphloia theiformis* et de *Psiloxylon mauritianum*

Les premiers résultats obtenus, suite au criblage des sept plantes médicinales réunionnaises, montrent une importante activité anti-ZIKV avec une inhibition de plus de 90% de la fluorescence lorsque des cellules Vero sont infectées et traitées simultanément avec 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum* respectivement. La suite de l'étude cible la caractérisation du mécanisme d'action de ces deux éco-extraits.

II.1 Activité antivirale des extraits traditionnels d'*A. theiformis*

La méthode d'extraction des métabolites secondaires d'une plante a un effet sur sa composition, entraînant ainsi une modification de l'activité biologique associée (Zill-E-Huma et al., 2009; Capriotti et al., 2014; Blicharski et al., 2017). Pour cela, avant de caractériser le mode d'action des éco-extraits, nous avons souhaité savoir si l'activité antivirale est retrouvée au sein d'extraits traditionnels (infusion, décoction et macération), plus accessibles et plus utilisés par la population locale. Nous avons sélectionné *A. theiformis* comme modèle.

Les cellules Vero ont été traitées pendant 24h avec différentes concentrations (4 – 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) des extraits traditionnels puis la viabilité cellulaire a été évaluée par le test MTT (figure 21A). La même tendance pour chacun des trois extraits est observée, avec des CC_{50} de 1056 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 1181 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et 1727 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour la décoction, l'infusion et la macération respectivement (figure 21A, tableau 6). L'extrait le plus toxique est la décoction avec une CC_{50} de 1056 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et une dose maximale non cytotoxique de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Pour l'infusion et la macération nous retrouvons une dose maximale non cytotoxique supérieure à 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, semblable à l'éco-extrait obtenu par la technique ESSAM (figure 21A, tableau 6). L'éco-extrait possède une cytotoxicité jusqu'à deux fois moins importante que les extraits traditionnels.

Cette variation de cytotoxicité peut être liée à l'utilisation du solvant (70% éthanol) pour la macération. Pour l'infusion et la décoction, les températures élevées (100°C) appliquées peuvent entraîner une dégradation et/ou oxydation des molécules en les rendant plus toxiques pour les cellules. Il serait nécessaire de vérifier si cette variation de toxicité entre les éco-extraits et les extraits traditionnels est retrouvée pour les autres plantes actives de l'étude.

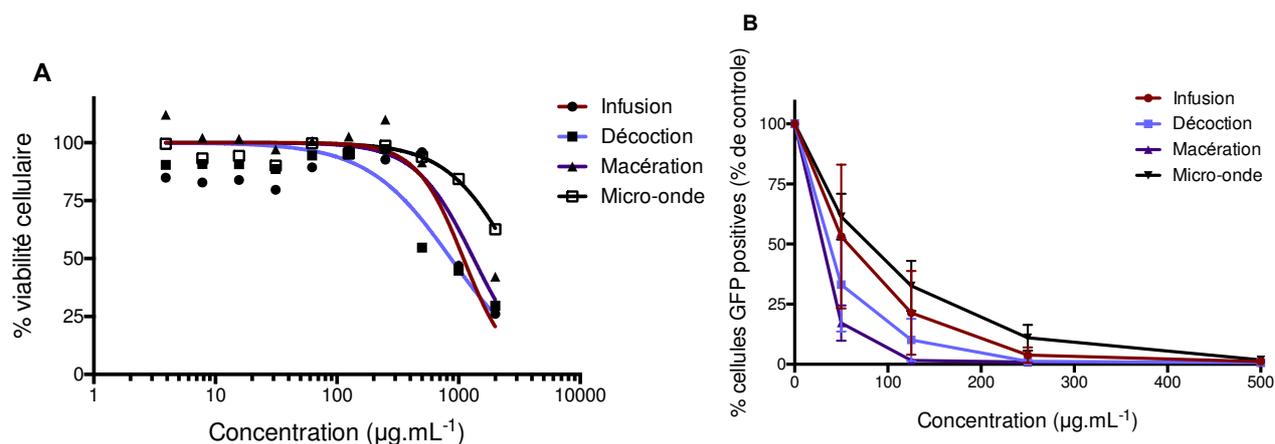


Figure 21 : Cytotoxicité et activité antivirale des extraits traditionnels d'*A. theiformis*.

(A) Les cellules Vero ont été traitées avec différentes concentrations d'extraits traditionnels d'*A. theiformis* pendant 24h. La cytotoxicité a été évaluée par le test MTT. (B) Les cellules Vero ont été infectées par ZIKV-GFP à une MOI de 1 et traitées avec les différents extraits pendant 24h. Le pourcentage de cellules GFP-positives a été déterminé par cytométrie en flux. Les CC_{50} , les MNTC et les IC_{50} ont été déterminés par des courbes de régression non linéaire. Les données sont exprimées en moyenne \pm erreur standard de trois expériences indépendantes ($n=3$).

Extrait	MNTC	CC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	IC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	SI (CC_{50}/IC_{50})
Infusion	$830 \pm 182,2$	1181 ± 567	$64,5 \pm 35,7$	18,3
Décoction	$413 \pm 65,2$	1056 ± 370	$33,6 \pm 14,5$	31,4
Macération	$436 \pm 44,4$	$1727 \pm 351,8$	$27,6 \pm 5,2$	62,6
Micro-onde	697 ± 138	$2931 \pm 456,9$	$98,8 \pm 31,4$	29,6

Tableau 6 : MNTC, CC_{50} , IC_{50} et SI des extraits traditionnels d'*A. theiformis*.

MNTC : dose maximale non cytotoxique, CC_{50} : concentration cytotoxique à 50%, IC_{50} : concentration inhibitrice à 50%, SI : index de sélectivité (ratio CC_{50}/IC_{50}). Les valeurs de CC_{50} , d' IC_{50} et de MNTC ont été déterminées par des courbes de régression non linéaire à partir des figures 21.

Pour déterminer l'activité antivirale, les cellules ont été infectées par le clone moléculaire ZIKV-GFP et traitées simultanément avec différentes concentrations d'extraits pendant 24h. Le pourcentage de fluorescence a été mesuré par cytométrie en flux 24h post infection (figure 21B). L'activité antivirale est toujours présente pour les trois extraits testés, avec un effet dose dépendant. En effet, nous atteignons une inhibition de plus de 90% pour les doses maximales non cytotoxique (figure 21B). La concentration efficace pour inhiber 50% de l'infection (IC_{50}) pour tous les extraits traditionnels a été déterminée par des courbes de régression non linéaire. L'extrait le plus efficace est l'extrait hydro-alcoolique, la macération, avec un IC_{50} de $27,6 \pm 5,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, comparativement à l'infusion et la décoction avec un IC_{50} de $64,5 \pm 35,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $33,6 \pm 14,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivement (figure 21B, tableau 6).

Grâce aux données de cytotoxicité et de l'activité antivirale, l'index de sélectivité (SI) a été calculé. Cet index permet de comparer en termes d'activité bénéfique/risque chacun de ces extraits. La macération est l'extrait le plus efficace avec un SI de 62,6, car son activité antivirale est très importante et il présente peu de toxicité (tableau 6). Cependant, dans cette étude nous avons voulu privilégier les extraits sans solvant. Il apparaît alors que sans utilisation de

solvant, la décoction serait l'extrait traditionnel le plus efficace avec un SI de 31,4 (tableau 6). Dans notre étude, lorsque que la technique d'extraction n'utilise pas de solvant, l'extraction par micro-ondes semble plus efficace que les techniques traditionnelles pour permettre une meilleure extraction des composés actifs anti-ZIKV.

Nous avons validé l'activité antivirale dans les extraits traditionnels d'*A. theiformis* avec des index de sélectivité différents selon la méthode d'extraction utilisée.

II.2 Mécanisme d'action de l'activité antivirale d'*A. theiformis* et de *P. mauritanum*

Afin d'identifier les phases du cycle viral inhibées par les éco-extraits, différents protocoles ont été mis en place (figure 22A, B)(Annexe 2) permettant ainsi de déterminer leur mécanisme d'action. Dans cette étude, l'extrait d'*Ayapana triplinervis* a été utilisé comme contrôle négatif.

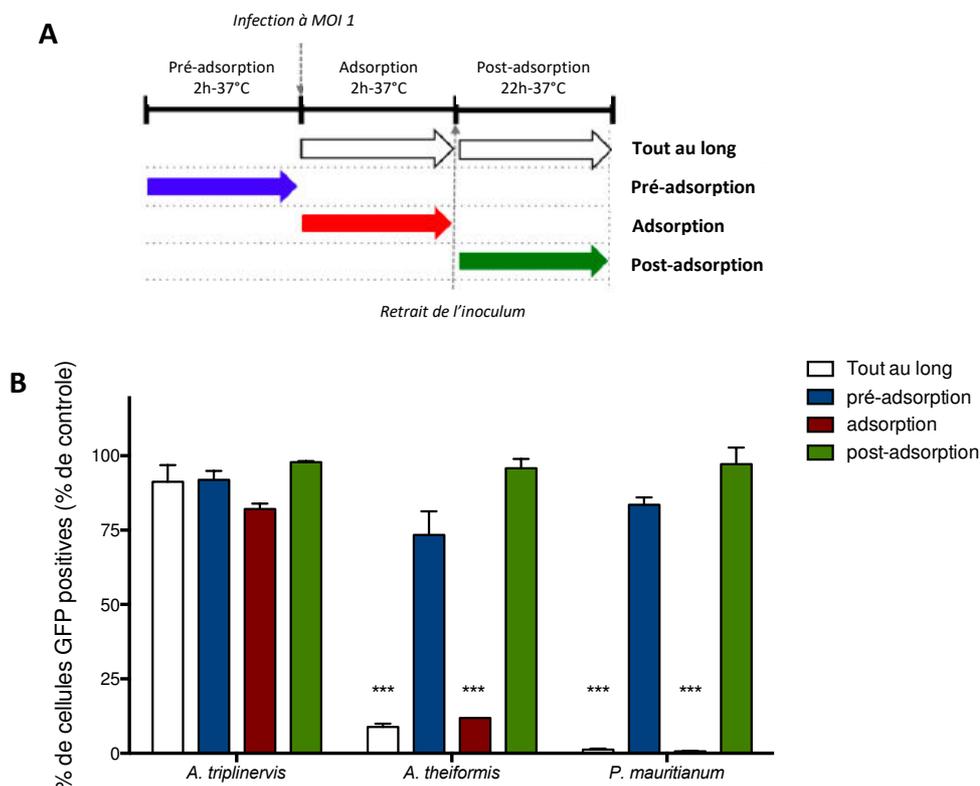


Figure 22 : Détermination du mode d'action des éco-extraits *A. theiformis* et *P. mauritanum* sur le virus ZIKV-GFP.

Les cellules Vero ont été infectées à une MOI de 1 avec ZIKV-GFP. Différents protocoles d'addition des éco-extraits *A. theiformis*, *A. triplinervis* et *P. mauritanum* lors de l'infection sont représentés en (A). Les flèches indiquent la présence des éco-extraits. (B) Analyse par cytométrie en flux 24h post infection de l'expression de la protéine GFP, sous les conditions expérimentales montrées en A. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Les résultats issus du protocole « tout au long » représentent ici une valeur de référence, obtenue lors du criblage (figure 18) afin de pouvoir comparer les autres protocoles.

Lorsque les éco-extraits d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum* sont ajoutés de façon concomitante à l'infection, on observe une diminution significative de plus de 80% de la fluorescence, à la concentration maximale non cytotoxique de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivement (figure 22A, B)(Annexe 2). Cette inhibition est semblable à celle observée lorsque les extraits sont présents tout au long de l'infection (figures 18 et 22B)(Annexe 2). Cependant, peu ou pas d'inhibition est observée lorsque les extraits sont ajoutés en amont ou en aval de l'infection (figure 22A, B)(Annexe 2).

Ces résultats suggèrent que les éco-extraits d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum* n'impactent pas la réplication virale mais agissent au niveau des phases précoces du cycle virale de ZIKV.

II.2.1 Inhibition de l'attachement viral par *A. theiformis* et *P. mauritianum*

Les résultats précédents montrent que les extraits d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum* semblent agir sur une des étapes précoces du cycle viral de ZIKV, soit sur l'attachement ou sur l'internalisation.

Afin de déterminer si l'attachement est inhibé, nous avons effectué un test d'attachement par qRT-PCR. L'épigallocatechine gallate (EGCG) est utilisé comme contrôle positif car cette molécule, issue du thé vert, est largement décrite pour son activité antivirale par inhibition de l'entrée virale (Yamaguchi et al., 2002; Calland et al., 2012a; Weber et al., 2015; Carneiro et al., 2016). Les cellules ont été infectées par le clone moléculaire ZIKV-MR766 (souche africaine d'Ouganda), simultanément en présence ou en absence d'extrait d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum*, pendant 1h à 4°C. Cette étape va permettre l'attachement des particules virales sur les cellules mais empêcher l'internalisation (Weber et al., 2015; Vázquez-Calvo et al., 2017). Suite à l'incubation, le nombre de virus attaché à la membrane cellulaire, en présence ou en absence de l'éco-extrait, est directement déterminé par qRT-PCR.

Nous observons une diminution significative d'au moins 90% du nombre d'ARN viral attaché à la membrane cellulaire lors d'un traitement avec 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ d'extrait d'*A. theiformis*. Cette inhibition de l'attachement apparaît sensiblement plus efficace pour l'extrait d'*A. theiformis* comparativement au contrôle positif, l'EGCG (figure 23A).

Une différence du nombre de copies d'ARN est observée entre le contrôle non traité de chacune des expériences (figures 23 A et B). Cette différence peut être liée au nombre de particules virales présentes au départ dans l'inoculum. Cependant une diminution significative du nombre de virions attachés est observée suite au traitement avec *P. mauritianum* (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) et l'EGCG (100 μM). En effet, l'attachement est ici inhibé de 80% (figure 23B). L'extrait d'*A. theiformis* semble plus efficace en termes d'inhibition de l'attachement de ZIKV comparativement à l'extrait de *P. mauritianum*.

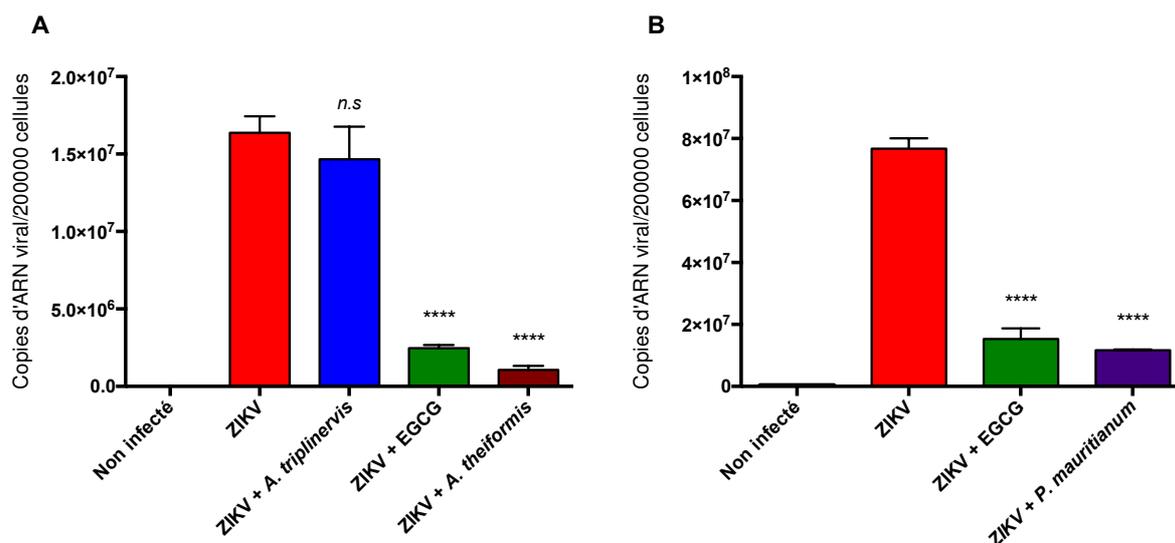


Figure 23 : Inhibition de l'attachement de ZIKV par les éco-extraits d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum*
 Les cellules Vero ont été infectées par ZIKV-MR766 à une MOI de 1, en présence ou non des éco-extraits d'*A. theiformis*, d'*A. triplinervis* (500 µg.mL⁻¹), de *P. mauritianum* (100 µg.mL⁻¹) et d'EGCG (100 µM) pendant 1h à 4°C. Le nombre de particules virales attachées à la membrane cellulaire est déterminé par RT-qPCR. Les valeurs sont représentées par la moyenne ± erreur standard de trois expériences indépendantes (n=3). (*p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 ; ****p<0,0001 ; ns = non significatif)

Ces résultats montrent que les extraits d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum* inhibent l'attachement du ZIKV à la surface des membranes cellulaires comme l'EGCG (Carneiro et al., 2016; Vázquez-Calvo et al., 2017). De même, la curcumine, composé majoritaire du curcuma, inhibe l'attachement de ZIKV et CHIKV dans des cellules Hela (Mounce et al., 2017).

II.2.2 Activité virucide d'*A. theiformis* et *P. mauritianum*

a) Caractérisation de l'effet virucide

Un test d'inactivation virale a été effectué afin de savoir si nos extraits possèdent un effet virucide contre ZIKV. Brièvement, ZIKV-GFP a été incubé 1h à 37°C en présence d'*A. theiformis* (500 µg.mL⁻¹) et de *P. mauritianum* (100 µg.mL⁻¹). L'extrait d'*A. triplinervis* et l'EGCG (100 µM) ont été utilisés comme contrôle négatif et positif respectivement. Les différents mélanges ont été dilués 50 fois avant l'infection des cellules. Cette dilution nous permet d'atteindre une dose sous thérapeutique pour être sûr d'évaluer l'effet de nos extraits uniquement sur la particule virale.

Une réduction de plus de 85% du nombre de cellules GFP-positives est observée, comparativement au contrôle infecté non traité, lors d'un traitement de ZIKV avec les extraits d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum* (figure 24A) (Annexe 2).

Afin d'établir la relation entre la diminution du nombre de cellules GFP-positives et une perte de l'infectivité de ZIKV, les particules virales présentes dans les surnageants ont été quantifiées par titrage de plages de lyse. L'infectivité résiduelle de ZIKV-GFP est

significativement diminuée, avec une perte de 2 log, lorsque ZIKV-GFP est incubé avec les extraits d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum*. L'inhibition de l'infectivité est ici plus importante pour les éco-extraits comparativement au contrôle positif EGCG (figure 24B).

Nos extraits exercent une activité virucide sur ZIKV semblable à celle décrite et observée pour l'EGCG et à celle de la baicaleine face à JEV (Johari et al., 2012; Carneiro et al., 2016). Une activité virucide est également retrouvée dans un extrait aqueux de racine de *Scutellaria baicalensis* contre les 4 sérotypes de DENV (Zandi et al., 2013). Les mêmes résultats ont été obtenus pour l'extrait méthanolique de *Rheum palmatum* contre le JEV avec un IC₅₀ de 7,58 µg.mL⁻¹ (Chang et al., 2014).

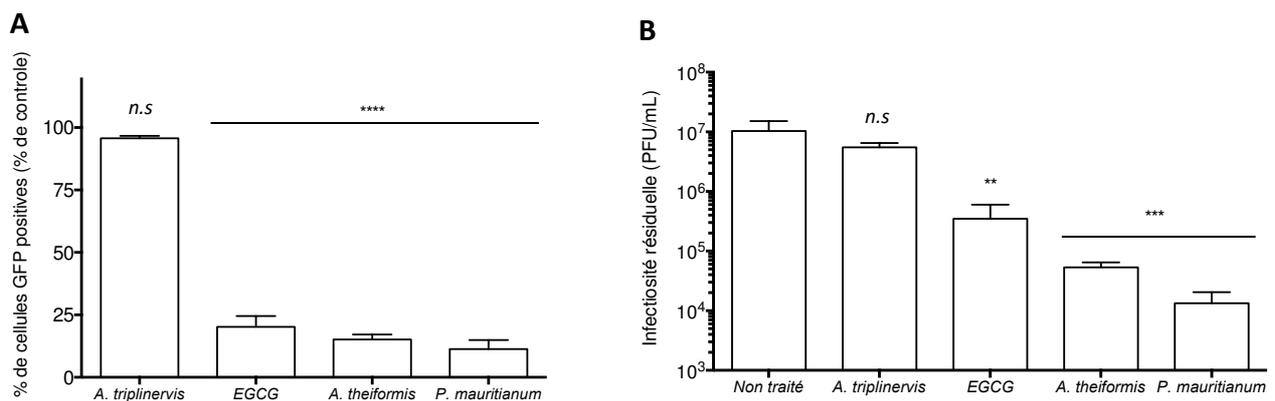


Figure 24 : Inactivation virale de ZIKV-GFP par les éco-extraits.

ZIKV-GFP a été préalablement pré-incubé avec les éco-extraits de *A. theiformis*, *A. triplinervis* (500 µg.mL⁻¹), et *P. mauritianum* (100 µg.mL⁻¹) et l'EGCG (100µM) 1h à 37°C. Les mélanges ont été dilués 50 fois avant l'infection des cellules Vero. (A) Le nombre de cellules GFP positives est quantifié par cytométrie en flux 24h post infection. (B) Les surnageants ont été récupérés 24h p.i et les particules virales ont été quantifiées par titrage de plages de lyse. Les résultats sont exprimés en PFU.mL⁻¹. Tous les résultats représentent la moyenne ± erreur standard de quatre expériences indépendantes (n=4). (*p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 ; ****p<0,0001 ; ns = non significatif).

Afin de déterminer la concentration efficace pour inhiber 50% de l'infection (IC₅₀) par ZIKV, un effet dose a été effectué avec des concentrations comprises entre 0 et la dose maximale non cytotoxique d'*A. theiformis* (500 µg.mL⁻¹) et de *P. mauritianum* (100 µg.mL⁻¹). L'IC₅₀ a été déterminée graphiquement en utilisant une régression non linéaire d'une courbe dose-réponse.

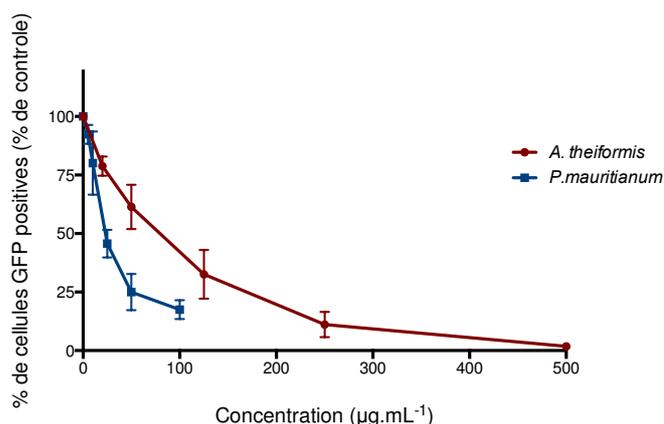


Figure 25 : Activité antivirale dose-dépendante des extraits d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum*.

Les cellules Vero ont été infectées avec ZIKV-GFP préalablement pré-incubé avec différentes concentrations d'extraits. Le pourcentage de cellules GFP positives est déterminé par cytométrie en flux 24h p.i. L'IC₅₀ est déterminée à partir d'une courbe de régression non linéaire. Les résultats sont représentés par la moyenne ± erreur standard de trois expériences indépendantes (n=3).

Extrait/composé	CC ₅₀	IC ₅₀	SI (CC ₅₀ /IC ₅₀)
<i>A. theiformis</i>	2931 ± 456,9	98,8 ± 31,4	29,6
<i>P. mauritianum</i>	1044 ± 106,2	19,5 ± 4,8	53,5
EGCG	206,8 ± 13,1	48,05 ± 9,1	4,3

Tableau 7 : CC₅₀, IC₅₀ et SI des extraits d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum*.

CC₅₀ : concentration cytotoxique à 50% ; IC₅₀ : concentration inhibitrice à 50% de l'infection ; SI : index de sélectivité. CC₅₀ et IC₅₀ sont exprimés en µg.mL⁻¹ pour *A. theiformis* et *P. mauritianum* et en µM pour l'EGCG.

Les éco-extraits d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum* présentent un effet dose dépendant de l'inhibition de ZIKV. En effet, une inhibition de 30% de la fluorescence est observée dès la dose de 50 µg.mL⁻¹ et 25 µg.mL⁻¹ pour *A. theiformis* et *P. mauritianum* respectivement. La diminution de plus de 85% du nombre de cellules GFP-positives observée dans la figure 25 est identique à celle obtenue dans les précédents tests. La IC₅₀ d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum* est de 98,8 ± 31,4 µg.mL⁻¹ et 19,5 ± 4,8 µg.mL⁻¹ respectivement (Figure 25, tableau 7). L'IC₅₀ obtenu pour l'EGCG est de 48,05 ± 9,1 µM. Cette concentration efficace pour inhiber 50% de l'infection de ZIKV est trois fois supérieure à celle décrite par Carneiro et al. (IC₅₀ = 21,4 µM). Cependant, l'IC₅₀ peut se calculer à partir de différentes méthodes, soit à partir de résultats de cytométrie en flux, soit à partir de titrage de plages de lyse ou encore par inhibition de l'effet cytopathique. La différence observée peut alors s'expliquer car nos calculs sont basés sur l'analyse de cytométrie et que Carneiro et al. évalue l'IC₅₀ à partir des données de titrage de plages de lyse.

En se basant sur la cytotoxicité et l'activité antivirale (tableau 7) l'index de sélectivité des deux éco-extraits a été déterminé en utilisant la formule suivante : SI = CC₅₀/IC₅₀. L'index de sélectivité calculé est de 29,6 et 53,5 respectivement pour *A. theiformis* et *P. mauritianum*. Cet index de sélectivité est largement supérieur à celui que nous avons obtenu pour l'EGCG

(SI = 4,3) mais également à celui déjà décrit (SI = 9). Les extraits d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum* possèdent un index de sélectivité relativement important comparativement à d'autres extraits de plantes. En effet des résultats similaires ont été décrits contre DENV lors d'un traitement avec un extrait aqueux de racine issue de *Scutellaria baicalensis* avec un SI de 16 (Zandi et al., 2013). L'extrait éthanolique de feuilles de *Distictella elongata* est également décrit pour son activité anti-DENV et possèdent un SI de 1,5 (Simões et al., 2011).

De même, l'index de sélectivité de la curcumine face à ZIKV est de 6 (Mounce et al., 2017). Nos extraits apparaissent plus efficaces comparativement à des molécules pures naturelles isolées de plantes. Cette efficacité peut s'expliquer grâce à une synergie de molécules agissant soit, sur différentes étapes du cycle virale, soit sur la même étape mais permettant dans tous les cas une amplification de l'inhibition de l'infection de ZIKV.

Nous avons souhaité déterminer le temps minimal nécessaire aux éco-extraits pour entraîner cette inhibition de l'infectivité de ZIKV, en prenant *A. theiformis* comme exemple. Pour cela, ZIKV-GFP a été incubé à différents temps, de 0 à 60 minutes, avec trois concentrations d'*A. theiformis* (250, 500 et 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (figure 26) (Annexe 2). A la dose maximale non cytotoxique (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), 15 minutes sont suffisante pour entraîner une inhibition de 50% du nombre de cellules GFP-positives. Le taux d'inhibition de plus de 80% est retrouvé dès 30 minutes d'incubation entre ZIKV-GFP et *A. theiformis* (figures 24, 25 et 26, Annexe 2). Pour un même temps d'incubation (30 minutes par exemple), la dose de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, inhibe 40% de l'infection, comparativement à 80% pour la concentration de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (figure 26).

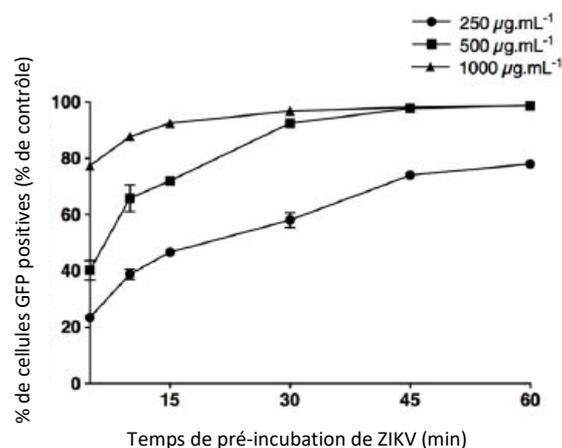


Figure 26 : Détermination du temps minimal d'inhibition de l'éco-extrait d'*A. theiformis*.

Différentes concentrations d'extrait d'*A. theiformis* (250, 500 et 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) ont été incubées avec ZIKV-GFP à différents temps à 37°C. Les mélanges ont été dilués 50 fois avant l'infection des cellules Vero. Le pourcentage de cellules GFP positives est suivi par cytométrie en flux 24h post infection. Les résultats représentent la moyenne \pm erreur standard de trois expériences indépendantes (n=3).

Tous ces résultats suggèrent que les extraits d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum* exercent une activité antivirale contre le ZIKV, en inhibant l'attachement des particules virales

de ZIKV sur la membrane cellulaire. De plus, les extraits réduisent l'infectivité du virus en agissant directement sur la particule virale.

b) Activité antivirale des éco-extraits d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum* contre une souche africaine et une souche asiatique épidémique de ZIKV

Les résultats précédents ont été obtenus en utilisant le clone moléculaire ZIKV-GFP, issu de la séquence de la souche africaine ZIKV-MR766. Nous avons souhaité valider l'activité antivirale sur une souche africaine (clone moléculaire MR766) et une souche asiatique (isolat clinique de l'épidémie de Polynésie Française de 2013, PF13). En effet, différentes études distinguent deux lignées de ZIKV, une lignée africaine et une lignée asiatique. Cette dernière semble être à l'origine des souches épidémiques (Haddow et al., 2012; Anfasa et al., 2017).

Pour cela, les souches ont été pré-incubées 1h à 37°C avec différentes concentrations d'extraits d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum*, avant l'infection des cellules Vero. L'infectivité a été quantifiée par titrage de plages de lyse. Les deux souches sont sensibles à chacun des deux éco-extraits avec un effet dose dépendant (figure 27). Pour l'extrait d'*A. theiformis* (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), une diminution significative de 2-log pour chacune des deux souches est observée (figures 27A, B, Annexe 2). Néanmoins, la souche PF13 est plus sensible à *A. theiformis* que la souche MR766. Des résultats similaires ont été observés pour l'EGCG, avec une inhibition plus importante pour une souche épidémique comparativement à ZIKV-MR766 (Carneiro et al., 2016). On remarque une diminution de plus de 1 log de l'infectivité des souches MR766 et PF13 pour l'éco-extrait de *P. mauritianum* (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (figures 27C et D).

D'après ces résultats l'extrait d'*A. theiformis* est plus efficace contre les souches asiatique (MR766) et épidémique (PF13) de ZIKV, comparativement à l'extrait de *P. mauritianum*. Ces différences peuvent être liées à une différence de composition entre les deux extraits.

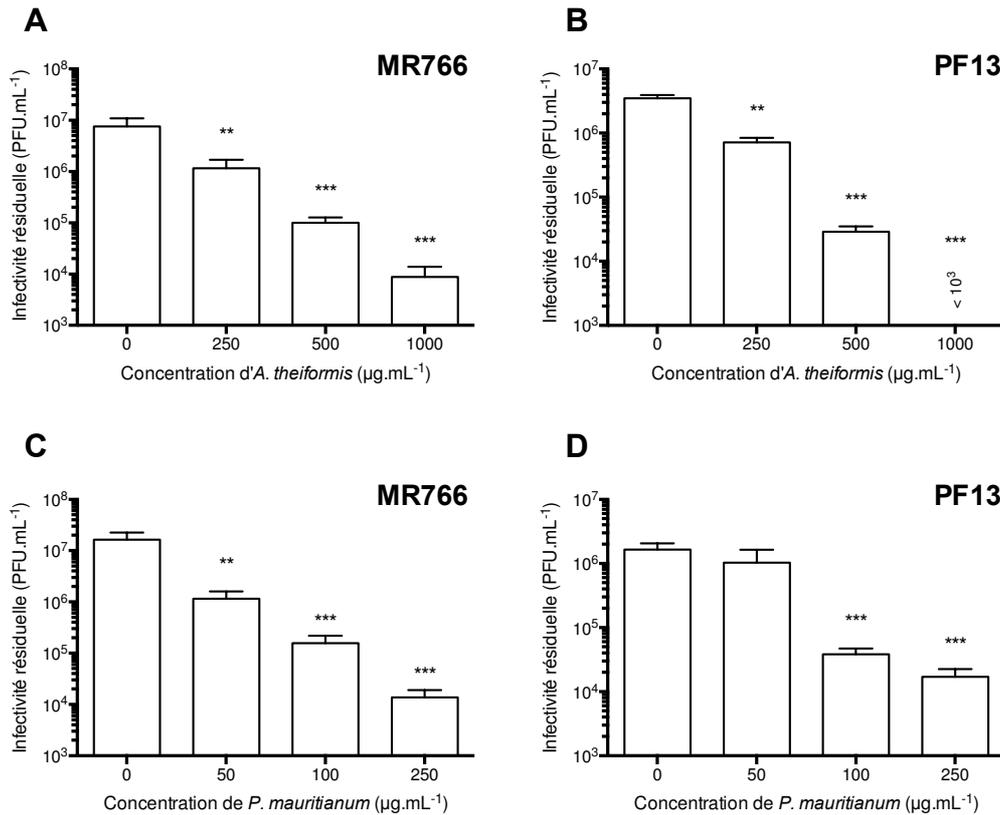


Figure 27 : Activité antivirale des extraits d'*A. theiformis* et de *P. mauritanium* contre les souches Africaine et Asiatique de ZIKV.

Les cellules Vero ont été infectées à une MOI de 1 avec les souches ZIKV-MR766 ou ZIKV-PF13 préalablement pré-incubées avec différentes concentrations d'extraits (A,B) d'*A. theiformis* ou (C,D) de *P. mauritanium* pendant 24h. Les particules virales présentes ont été quantifiées par titrage de plages de lyse. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur standard de trois expériences indépendantes (n=3). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

De même, l'infection a été évaluée par immunofluorescence, en utilisant l'anticorps dirigé contre la protéine d'enveloppe E du virus. L'EGCG et l'extrait d'*A. triplinervis* ont été utilisés comme contrôle positif et négatif respectivement. Un marquage est observé pour les cellules contrôles infectées non traitées, montrant ainsi la spécificité de l'anticorps anti-E pour le ZIKV.

Lorsque les virus ont été incubés avec l'extrait d'*A. theiformis* (500 µg.mL⁻¹), seulement 5% des cellules sont infectées comparativement à 60% pour le contrôle non traité (figures 28A, B et C). De même, le nombre de cellules E-positives est significativement diminué lorsque les virus ont été mis en présence d'extrait de *P. mauritanium* (100 µg.mL⁻¹). En effet, avec *P. mauritanium* seulement 16% et 10% des cellules sont infectées, comparativement à 65% et 60% dans les contrôles non traités MR766 et PF13 respectivement (figure 28A, B et C). Les résultats sont comparables à ceux obtenus pour l'EGCG (100µM). Cependant une efficacité plus importante de l'extrait d'*A. theiformis* est à noter, comparativement à l'EGCG et à l'extrait de *P. mauritanium* et ce pour les deux souches virales (figure 28A, B et C).

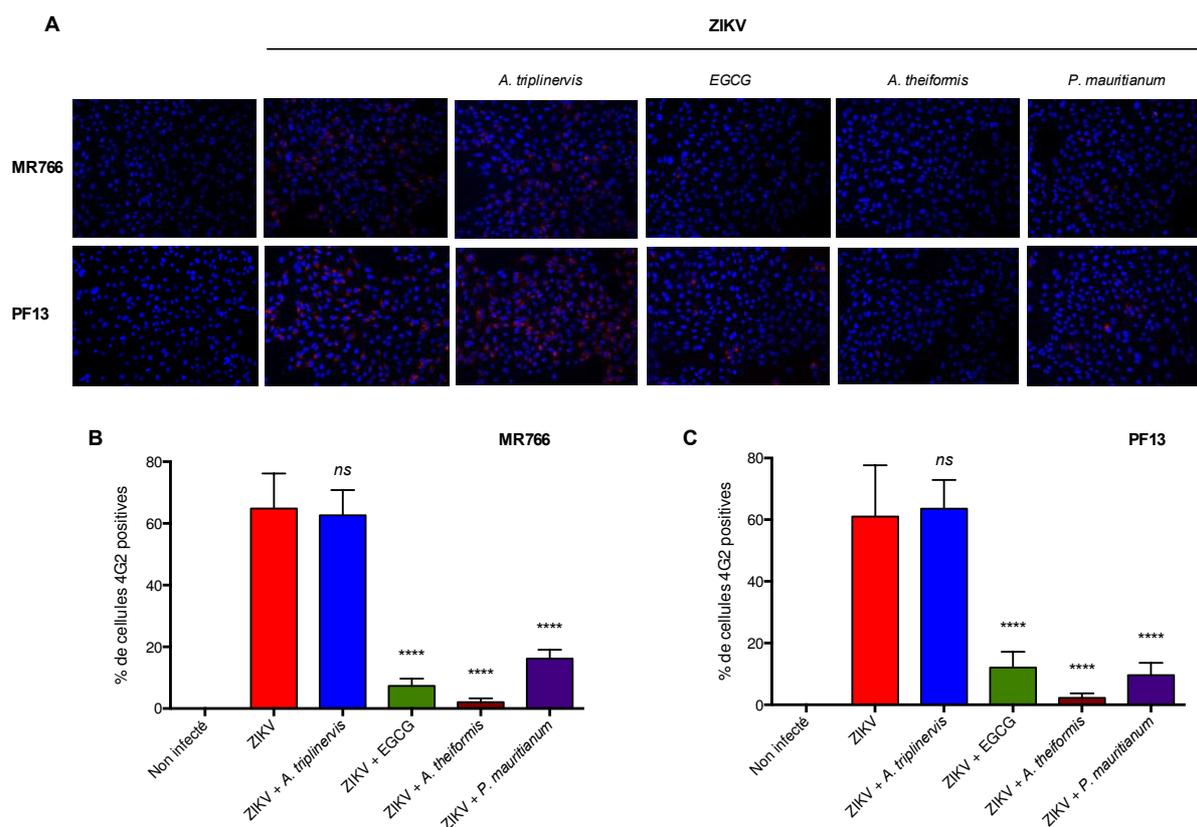


Figure 28 : Inhibition de l'infektivité des souches africaine et asiatique de ZIKV par les éco-extraits d'*A. theiformis* et de *P. mauritanum*.

Les cellules Vero ont été infectées à une MOI de 1 avec les souches ZIKV-MR766 ou ZIKV-PF13 préalablement pré-incubés avec les extraits de *A. theiformis* et *A. triplinervis* ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$), et *P. mauritanum* ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) et l'EGCG ($100 \mu\text{M}$). 24h post infection les cellules ont été marquées pour la protéine d'enveloppe E de ZIKV. Les images sont représentatives de trois expériences indépendantes. (B et C) Quantification du nombre de cellules E positives par immunofluorescence. *A. triplinervis* et l'EGCG ont été utilisé comme contrôle négatif et positif respectivement. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur standard de trois expériences indépendantes ($n=3$). (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$; ns = non significatif)

En collaboration avec l'Institut Pasteur de Paris, la même analyse a été effectuée en utilisant la méthode de fluorescence par hybridation *In Situ* (FISH). Cette méthode couplée à la microscopie confocale permet de détecter les simples brins d'ARN viral (ARNsb) présents dans les cellules infectées pendant la réplication. La méthode FISH a été appliquée uniquement à l'extrait d'*A. theiformis*.

La sonde dirigée contre l'ARNsb viral ne donne aucun signal dans les cellules non infectées mais elle produit un signal très intense dans les cellules infectées par ZIKV (figure 29A), validant ainsi la spécificité de la sonde utilisée. Le nombre d'ARNsb de ZIKV par cellule infectée est diminué de 10 fois, lors d'un traitement des virus par *A. theiformis*, comparativement au contrôle infecté non traité (Figure 29B et C).

Ces résultats montrent que l'extrait d'*A. theiformis* possède une activité antivirale importante aussi bien contre la souche africaine et la souche asiatique épidémique de Polynésie Française.

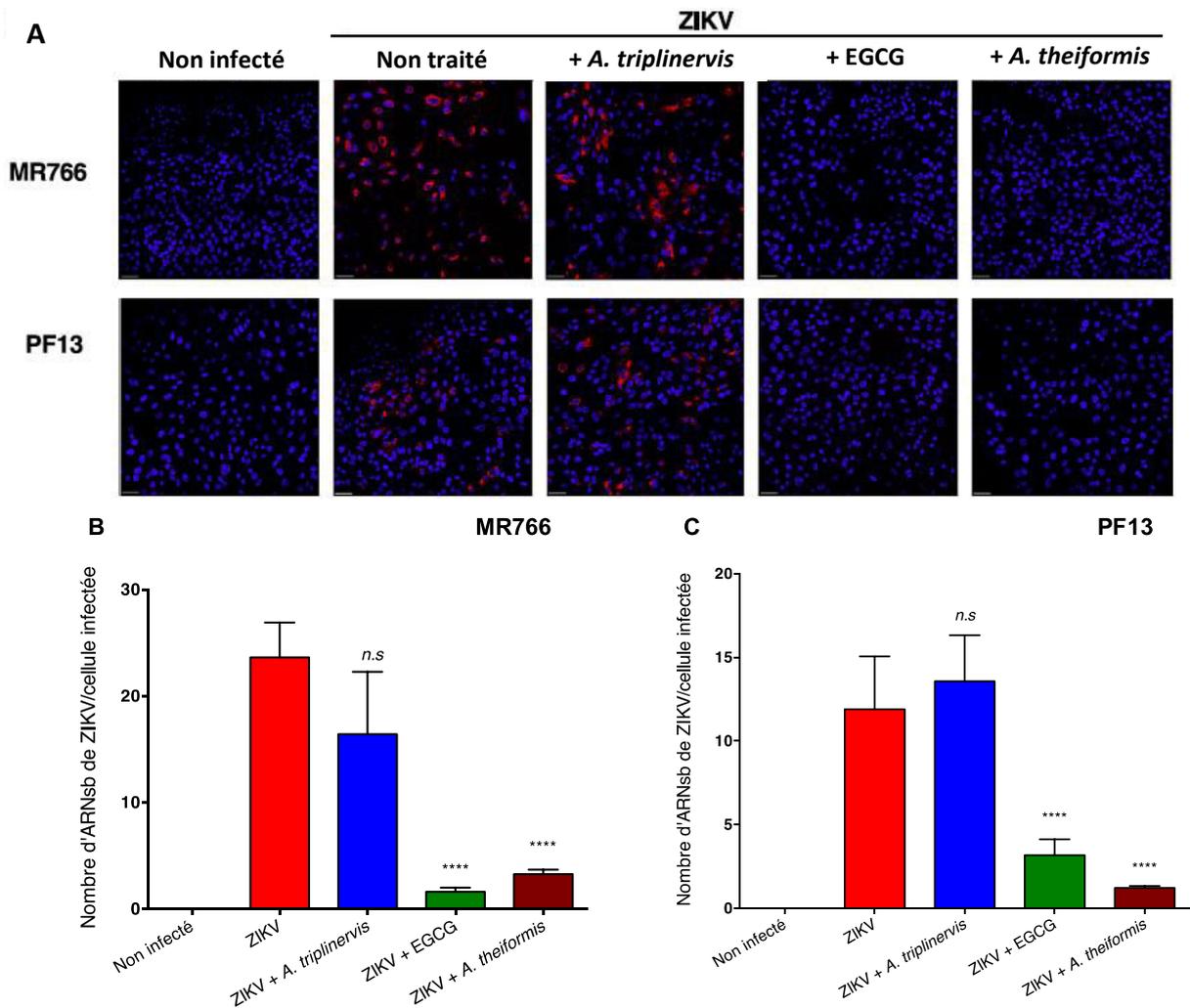


Figure 29 : Inhibition de la réplication des souches africaine et asiatique de ZIKV par l'extrait d'*A. theiformis*.

Les cellules Vero ont été infectées à une MOI de 1 avec les souches ZIKV-MR766 ou ZIKV-PF13 préalablement pré-incubés avec les extraits de *A. theiformis* et *A. triplinervis* ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) et l'EGCG ($100 \mu\text{M}$). 24h p.i les cellules ont été analysées par la méthode FISH en utilisant une sonde spécifique à l'ARN viral de ZIKV (rouge) et les noyaux ont été colorés par NucBlue (bleu). Les images sont représentatives de trois expériences indépendantes. (B et C) Quantification du nombre d'ARNsb par cellule à partir de l'expérience représentée en (A). Les résultats montrent la moyenne \pm erreur standard de trois expériences indépendantes. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns = non significatif).

II.2.3 L'effet virucide est responsable de l'inhibition de l'attachement

D'après les résultats précédents, nous avons souhaité savoir si l'activité virucide est responsable de l'inhibition de l'attachement. Pour cela, deux souches virales de ZIKV ont été utilisées :

- la souche africaine MR766 ;
- la souche HD78. Il s'agit d'une souche africaine de ZIKV qui se réplique très efficacement dans des cellules d'insectes et qui possède un titre viral très important.

Les cellules ont été infectées par ZIKV-MR766 et HD78 préalablement incubés avec l'extrait d'*A. theiformis* (500 µg.mL⁻¹) pendant 1h à 37°C. Elles ont été ensuite incubées à 4°C pendant 1h afin de permettre l'attachement des virions à la membrane cellulaire sans induire l'internalisation. Une fois les virions non attachés éliminés par rinçage, les cellules ont été à nouveau incubées 90 minutes à 37°C. Cette étape permet l'internalisation uniquement des particules virales attachées à la membrane cellulaire. Les ARNs viraux des virions attachés et internalisés dans les cellules ont été observés par microscopie confocale. L'EGCG et *A. triplinervis* ont été utilisés comme contrôle positif et négatif respectivement.

Dans les cellules infectées non traitées, environ 15 ARN simple brin par cellule ont été détectés pour chacune des deux souches virales (figure 30, Annexe 2). Une diminution significative de plus de 5 fois du nombre d'ARNs par cellule infectée est observée lors des traitements avec l'EGCG et l'extrait d'*A. theiformis*, comparativement au contrôle infecté non traité. En effet, environ 3 ARNs par cellule ont été détectés pour les souches ZIKV-MR766 et HD78 (figure 30, Annexe 2).

Ces résultats montrent que l'extrait d'*A. theiformis* inhibe l'attachement en agissant directement sur la particule virale de ZIKV. Ce mécanisme d'action semble être identique à celui décrit pour l'EGCG et la curcumine (Carneiro et al., 2016; Mounce et al., 2017; Vázquez-Calvo et al., 2017). De même les études sur *Scutellaria baicalensis* et *Phyllanthus*, suggèrent également que l'activité antivirale observée serait liée à une action directe sur la particule virale (Zandi et al., 2013; Lee et al., 2013).

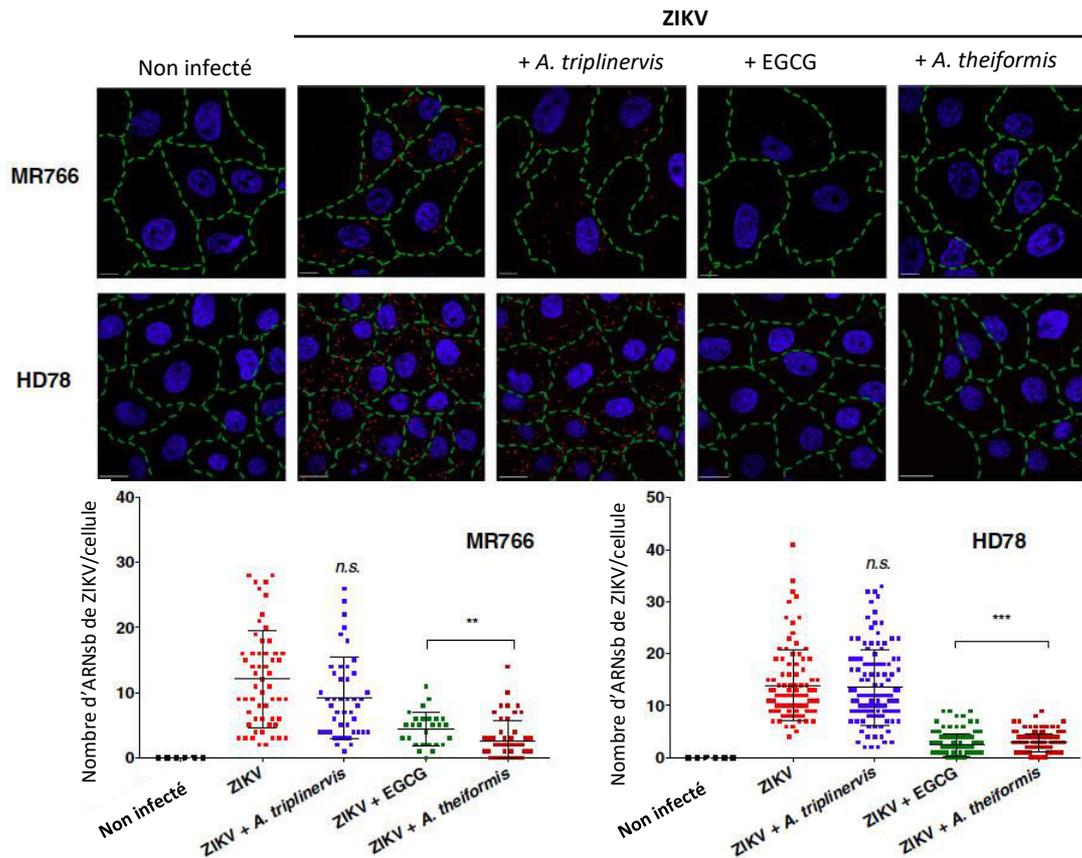


Figure 30 : L'effet virucide de l'extrait d'*A. theiformis* inhibe l'attachement de ZIKV.

Les souches virales ZIKV-MR766 et ZIKV-HD78 ont été pré-incubées avec l'extrait d'*A. theiformis* à la dose maximale non cytotoxique pendant 1h à 37°C. Les cellules Vero ont été ensuite incubées 1h à 4°C avec les virus à une MOI de 500. Après rinçage les cellules ont été incubées à 37°C pendant 90 mn, et analysés par la méthode FISH. Une sonde spécifique de l'ARN virale (rouge) a été utilisée. Les noyaux (bleu) ont été visualisés avec NucBlue. Les lignes vertes indique la délimitation des membranes cellulaire grâce à un marquage avec l'agglutinine de germe de blé conjugué au fluorophore A488. Les images sont représentatives de trois expériences indépendantes (n=3). Les graphes représentent la quantification du nombre d'ARNsb par cellule. Les valeurs sont représentées par la moyenne \pm erreur standard de trois expériences indépendantes (n=3). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns = non significatif)

Des diminutions significatives de l'infectivité de ZIKV ont été déterminées (figures 24-30), lorsque ZIKV est incubé pendant 1h à 37°C avec les éco-extraits. Afin de voir l'impact de l'effet virucide sur la particule virale, une analyse par microscopie électronique a été effectuée en collaboration avec l'Institut Pasteur sur l'extrait d'*A. theiformis*.

La souche virale HD78 a été incubée 15 minutes avec l'extrait d'*A. theiformis* ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) et les changements morphologiques ont été observés par microscopie électronique après un immuno-marquage dirigé contre la protéine E du virus. Cette souche virale a été choisie pour son titre viral élevé, afin de faciliter la visualisation des virions au microscope. Les particules virales observées dans le contrôle non traité, apparaissent sphériques, agrégées, avec un diamètre d'environ 40 à 50 nm (figure 31, Annexe 2). Les mêmes caractéristiques sont observées lorsque le virus a été incubé avec l'extrait d'*A. triplinervis* (contrôle négatif). Les traitements avec l'EGCG et l'extrait d'*A. theiformis*, montrent des

particules virales désagrégées, déformées avec une forme moins sphérique. Ces particules apparaissent également beaucoup plus sombres comparativement aux particules non traitées (figure 31, Annexe 2). Cet aspect assombri des particules pourrait être la conséquence d'une augmentation de la perméation de la solution de coloration au sein de la particule virale. En effet, la membrane lipidique des particules virales serait fortement endommagée en présence d'*A. theiformis*, (figure 31, Annexe2).

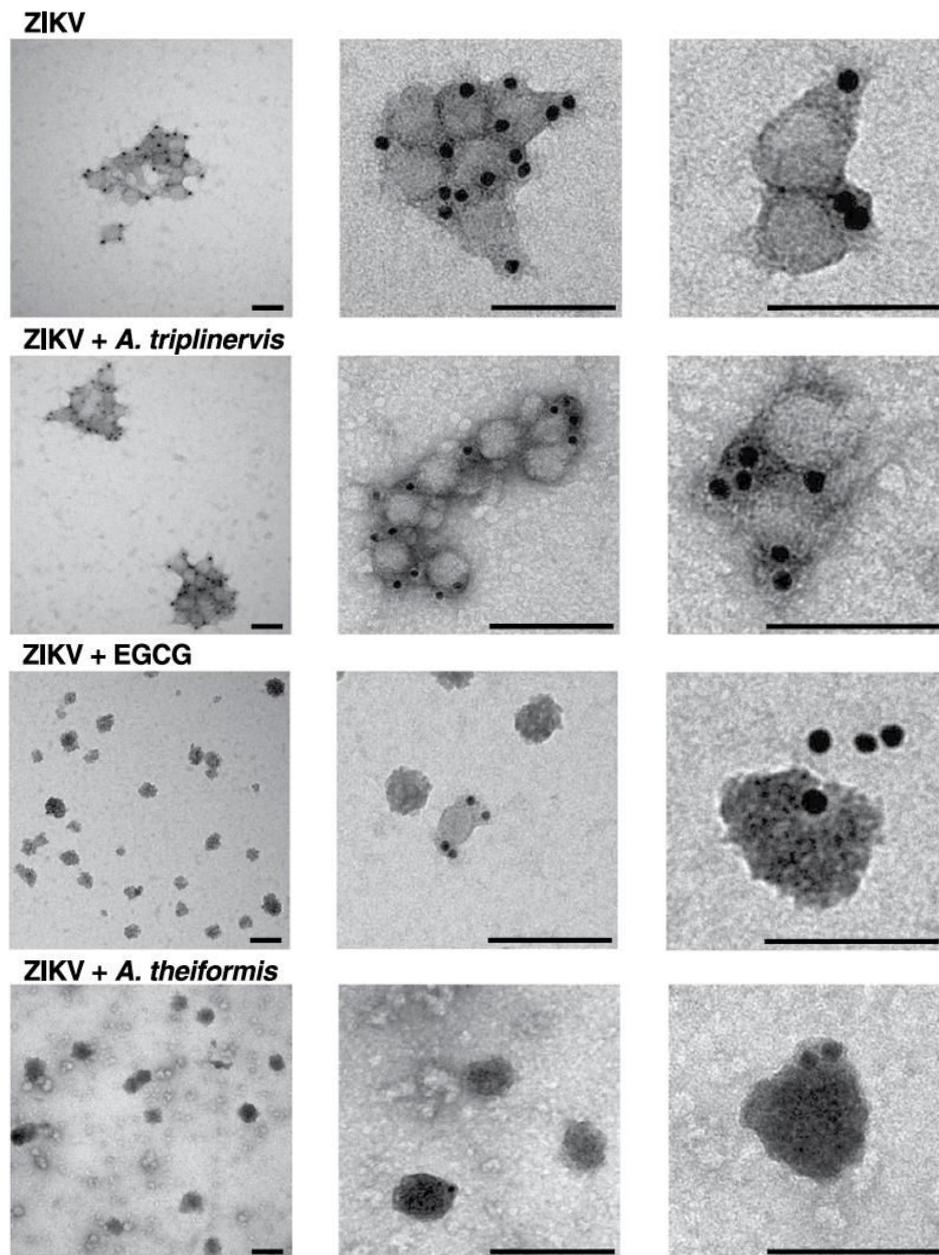


Figure 31 : Observation des particules virales de ZIKV en présence de l'éco-extrait d'*A. theiformis*.

La souche virale HD78 a été traitée avec l'éco-extrait d'*A. theiformis* ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) pendant 15 mn à 37°C . *A. triplinervis* et l'EGCG ont été utilisés comme contrôle négatif et positif respectivement. Les échantillons ont été traités par un marquage immunogold avec des anticorps dirigés contre la protéine E. Les particules virales ont été analysées par microscopie électronique. Les images sont représentatives de deux expériences indépendantes ($n=2$).

Ces observations pour l'EGCG sont en accord avec d'autres études. En effet, l'EGCG induit des dommages physiques aux particules virales des virus influenza et de l'herpès, entraînant une perte de la capacité des virions à s'attacher aux membranes cellulaires (Isaacs et al., 2008; Kim et al., 2013).

Tous nos résultats montrent que les éco-extraits d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum* possèdent une importante activité antivirale contre différentes souches de ZIKV. Ces extraits inhibent l'attachement par effet virucide sur la particule virale. L'extrait d'*A. theiformis* entraîne une déformation de la particule virale ainsi qu'une désorganisation des éléments de surface tels que les protéines de membrane E et M, pouvant ainsi affecter la capacité du virus à s'attacher à la membrane cellulaire de la cellule hôte. En effet, une étude *in silico* démontre la présence d'un site de liaison entre la protéine E de ZIKV et l'EGCG (Sharma et al., 2017).

Cependant, ces résultats de microscopie électronique montrent que l'anticorps dirigé contre la protéine E est capable de se fixer à cette dernière. Cela permet de supposer que la conformation de la protéine E n'est pas affectée et qu'il n'y a pas d'interaction entre les composés de nos extraits et la protéine E.

L'hypothèse la plus probable est alors que les composés d'*A. theiformis* vont interagir avec les phosphatidylsérines présentes à la surface des virions. Par exemple, la curcumine affecte la fluidité membranaire du virus de l'hépatite C, entraînant ainsi une inhibition de son attachement et de son internalisation au sein de la cellule hôte (Anggakusuma et al., 2014). Ces changements de fluidité peuvent ainsi altérer la conformation de la membrane, notamment des phosphatidylsérines.

Cette hypothèse est également renforcée par les nombreuses études qui montrent que l'attachement de ZIKV sur les membranes cellulaires nécessite l'interaction entre les phosphatidylsérines virale et les récepteurs membranaire cellulaire du type TAM, comme AXL, notamment via l'intervention de la protéine Gas6 (Nowakowski et al., 2016; Liu et al., 2016a; Meertens et al., 2017; Richard et al., 2017; Chen et al., 2018; Persaud et al., 2018). Ces modifications de la membrane lipidique virale et donc des phosphatidylsérines empêchent ainsi une reconnaissance des virions par les récepteurs TAM et Gas6, rendant ainsi les particules virales incapables de s'attacher et donc de pénétrer dans la cellule pour l'infecter.

Cette analyse sur les changements morphologiques des virions en microscopie électronique devrait être appliquée à l'extrait de *P. mauritianum* afin de déterminer si le mécanisme d'action sur l'inhibition de l'attachement est identique ou non à celui observé pour *A. theiformis*.

II.3 Activité antivirale d'*A. theiformis* contre 4 sérotypes de la dengue

Afin de déterminer si l'activité antivirale observée est spécifique à ZIKV, l'activité antivirale d'*A. theiformis* a été évaluée contre le virus de la dengue, un autre *Flavivirus* d'intérêt médical majeur causant près de 400 millions d'infection dans le monde chaque année (OMS). En collaboration avec l'institut Fiocruz du Brésil, des isolats cliniques de DENV

du Brésil ont été utilisés afin de représenter les 4 sérotypes du virus. L'interféron (IFN- α 2A) connu pour inhiber la réplication du virus de la dengue a été utilisé comme contrôle positif.

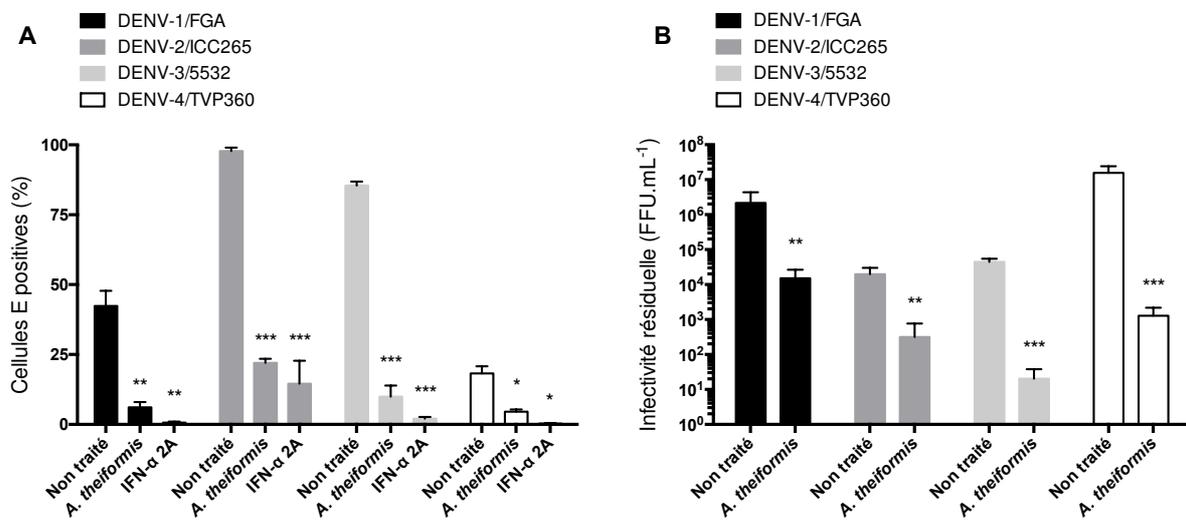


Figure 32 : Activité antivirale de l'extrait d'*A. theiformis* contre les 4 sérotypes du virus de la dengue.

Quatre sérotypes de DENV (DENV-1,2,3 et 4) ont été pré-incubés avec l'extrait d'*A. theiformis* (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) pendant 1h à 37°C. (A) Les cellules Huh7.5 ont été infectées avec DENV à une MOI de 0,1 pendant 48h. L'interféron- α 2A (200 IU.mL⁻¹) a été ajouté 2h post infection et utilisé comme contrôle positif. Le pourcentage de cellules positives pour la protéine E a été analysé en utilisant système d'imagerie d'Operetta (PerkinElmer). (B) L'inféctiosité résiduelle des particules traitées ont été quantifiées sur des cellules C6/36 par titrage immunologique de foyers de lyse. Les données sont représentées comme moyenne \pm erreur standard de trois expériences indépendantes (n=3). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns = non significatif).

Les 4 sérotypes de DENV ont été pré-incubés 1h à 37°C avec 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ d'extrait d'*A. theiformis*, puis des cellules Huh7.5 ont été infectées avec le mélange. Après 48h d'infection une immunofluorescence sur les cellules en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine E a été effectuée.

A. theiformis présente une activité antivirale contre les 4 sérotypes de la dengue avec une diminution significative de 70 à 80% du nombre de cellules E-positives (figure 32A, Annexe 2). Les sérotypes 1, 2 et 3 semblent plus sensibles que le sérotipe 4 de DENV face à l'extrait d'*A. theiformis*. L'inhibition de l'infection obtenue par *A. theiformis* est comparable à celle observée pour l'IFN- α 2A pour tous les sérotypes testés (figure 32A).

Les particules virales présentes dans les surnageants ont également été quantifiées par titrage de foyer de lyse, afin de déterminer la relation entre la diminution du nombre de cellules E-positives et la réduction de l'inféctiosité des virus. L'inféctiosité de DENV diminuée d'au moins 2 log lors du traitement des virus avec l'extrait d'*A. theiformis* (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (figure 32B). Ainsi la diminution du nombre de cellules positives pour la protéine E entraîne bien une diminution de l'inféctiosité des virus. Ces résultats sont comparables à ceux décrits précédemment pour ZIKV.

Pour conclure, l'extrait d'*A. theiformis* possède une importante activité antivirale également contre les 4 sérotypes de DENV. L'inhibition de l'infection des 4 sérotypes de DENV a également été décrite pour une autre plante médicinale, *Scutellaria baicalensis* (Zandi et al., 2013).

Cependant, nos extraits ont été testés sur des isolats cliniques de dengue du Brésil. Il serait donc intéressant et nécessaire d'évaluer l'activité antivirale de ces plantes sur des isolats cliniques locaux de DENV, surtout suite à l'épidémie de DENV que subit actuellement l'île de La Réunion.

III. Tentative d'identification des composés actifs d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum*

III.1 Caractérisation chimique des éco-extraits bruts

Cette étude nous a permis de mettre en évidence l'activité antivirale des éco-extraits d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum* contre différentes souches de ZIKV. Afin d'identifier la composition en polyphénols de chacun des éco-extraits, les échantillons ont été analysés par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (UPLC-DAD-MS)*. Le chromatogramme ainsi que la composition chimique de l'éco-extrait d'*A. theiformis* sont affichés sous la figure 33 et le tableau 8 respectivement.

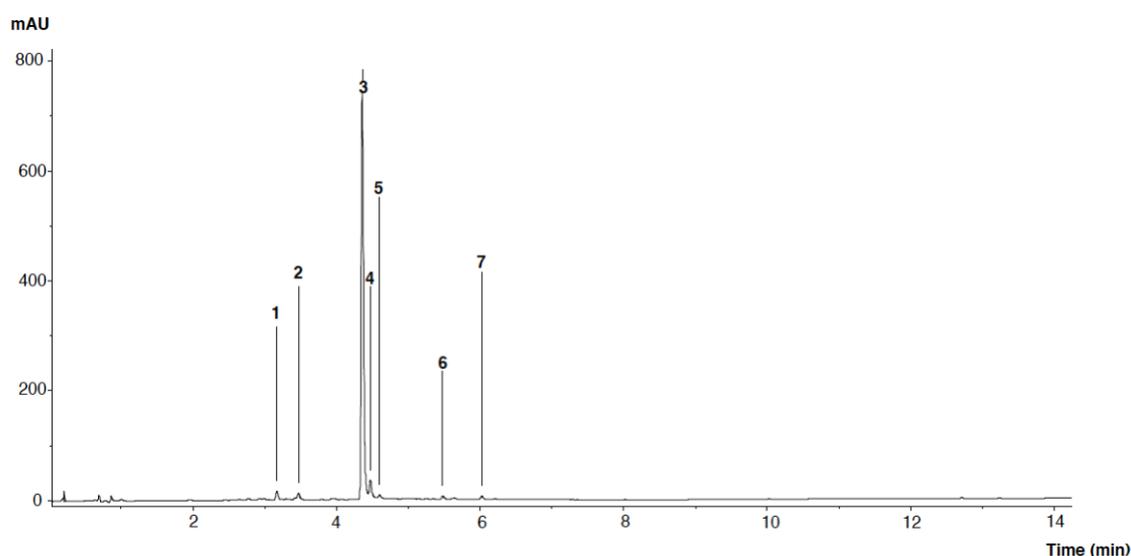


Figure 33 : Chromatogramme UPLC-DAD de l'éco-extrait d'*A. theiformis* à 260 nm.

L'extrait d'*A. theiformis* a été caractérisée par UPLC (Agilent 1209, Santa Clara, CA) équipé d'une colonne Agilent Zorbax SB-C18 (100 nm x 2,1 nm x 1,8 μ m) et d'un détecteur UV-VIS-DAD. L'UPLC est couplé au spectromètre de masse à piège à ions Esquire 6000 utilisant une source d'ionisation Electrospray (ESI) (Bruker Daltonics, Billerica, MA). L'extrait d'*A. theiformis* a été dissous dans un mélange MeOH-H₂O (1/1, v/v) à 2 mg.mL⁻¹. Les analyses ont été effectuées en triplicata.

* Analyses effectuées par sous traitance avec l'entreprise Polyphenols Biotech.

Pics	Composés	t_r (min)	$[M-H]^-$ (m/z)	Ions fragments	Teneur (% massique)
1	Néomangiférine	3,2	583	564,493,463, 421, 331	$0,149 \pm 0,005$
2	Iriflophénone-C-glucoside*	3,5	407	317, 287	nq
3	Mangiférine	4,4	421	403, 331, 301	$10,0 \pm 0,7$
4	ni**	4,5	437	419, 347, 317	$0,47 \pm 0,02$
5	Isomangiférine	4,6	421	403, 331, 301	$0,07 \pm 0,004$
6	Homomangiférine	5,5	435	417, 345, 315, 272	$0,02 \pm 0,003$
7	Aspalathine*	6,0	451	433, 361, 331, 287	nq

Tableau 8 : Identification des polyphénols de l'extrait d'*A. theiformis*

ni = non identifié ; nq = non quantifié

* Tentative d'identification par comparaison des ions fragments obtenus avec ceux de la bibliographie

** Semble être un dérivé de l'homomangiférine

Les résultats montrent que l'éco-extrait d'*A. theiformis* est principalement composé de mangiférine et de ses dérivés. Cela semble en accord avec d'autres études où la mangiférine (une xanthone glycosylée) est le composé majoritaire d'*A. theiformis* (Danthu et al., 2010; Picot and Mahomoodally, 2017; Picot et al., 2017a).

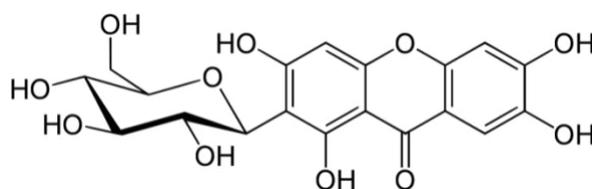


Figure 34 : Structure de la mangiférine

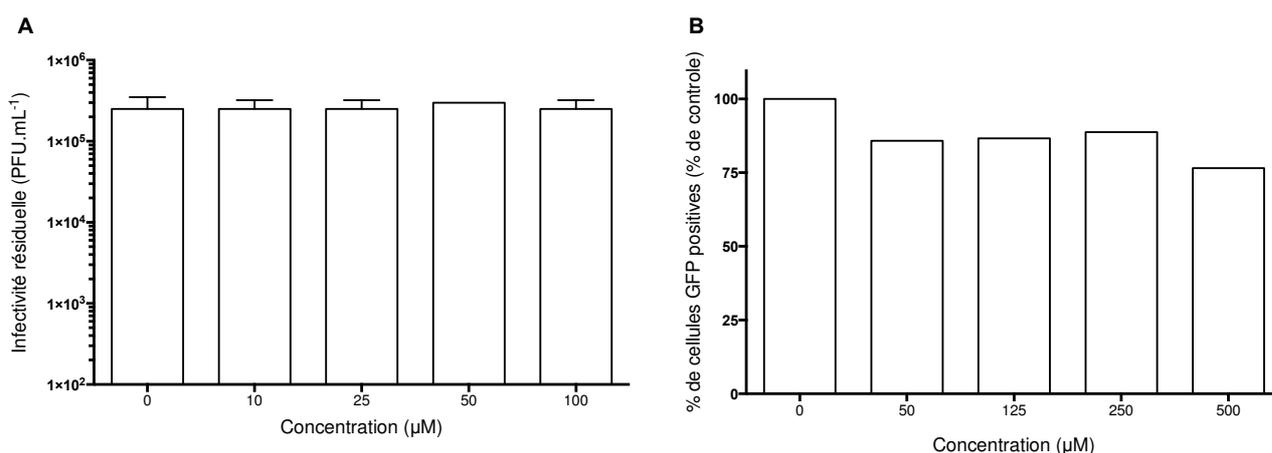


Figure 35 : Activité antivirale de la mangiférine.

Les cellules Vero ont été infectées par ZIKV-GFP, préalablement incubé avec différentes concentrations de mangiférine. (A) Les surnageants ont été récupérés 24h p.i et les particules ont été quantifiées par titrage de plages de lyse. Les résultats sont exprimés en PFU.mL⁻¹. (B) Le nombre de cellules GFP positives a été analysé par cytométrie en flux 24h p.i. (n=1)

Suite à cette caractérisation chimique, nous avons décidé d'évaluer l'activité antivirale de la mangiférine pure commerciale. D'après la figure 35, les résultats démontrent que la mangiférine pure commerciale ne possède pas d'activité antivirale contre ZIKV. Cependant de nombreuses études montrent l'activité antivirale de la mangiférine, encore appelé chinonine ou aphloïol, sur d'autres virus. Elle est décrite pour son activité antivirale contre les virus de l'herpès de type I et II sur des cellules Hela (SI = 8,1). Elle permet une réduction des plages de lyse de 56,8% et son activité antivirale a été décrite *in vivo* sur des souris et des cochons d'inde (Zheng and Lu, 1990; Zhu et al., 1993; Yoosook et al., 2000; Jiang et al., 2004). La mangiférine et certains de ses dérivés et plus particulièrement le 2'-*O-trans*-coumaroylmangiférine démontrent une importante activité antivirale contre les virus de l'herpès de type I et de DENV-2 également, avec des SI de 108,7 et de 121,9 respectivement (Brandão et al., 2017). Il est donc possible qu'une des autres xanthones glycosylées soit responsable de l'activité anti-ZIKV.

De nombreuses études portent sur l'activité biologique des xanthones et particulièrement sur leur activité antivirale. D'anciennes études démontrent l'activité anti-VIH d'un dimère flavone-xanthone, issu de *Swertia franchetiana*, avec une concentration inhibitrice à 50% de 43 μ M (Wang et al., 1994; Pengsuparp et al., 1995). Même si quelques années plus tard une autre étude ne trouve pas d'activité anti-VIH aux xanthones isolées de différentes espèces de *Calophyllum* (Dharmaratne et al., 2002). Des xanthones isolées d'un extrait d'acétate d'éthyle de *Polygala karensium*, d'une fraction n-butanol de l'écorce de *Mangifera indica* ou encore issues d'espèces de champignons *Diaporthe*, sont capables d'inhiber l'activité hydrolase des neuraminidases des virus influenza (Dao et al., 2012; Abdel-Mageed et al., 2014; Luo et al., 2018). Une xanthone isolée d'un extrait éthanolique de l'espèce *Hypericum sampsonii* démontre également une activité antivirale face au virus de l'hépatite B (Don et al., 2004). Cela est en accord avec l'hypothèse que l'activité antivirale d'*A. theiformis* soit liée à une des xanthones qui compose l'extrait.

Le chromatogramme ainsi que la composition chimique de l'éco-extrait de *P. mauritianum* sont affichés sous la figure 36 et le tableau 9 respectivement.

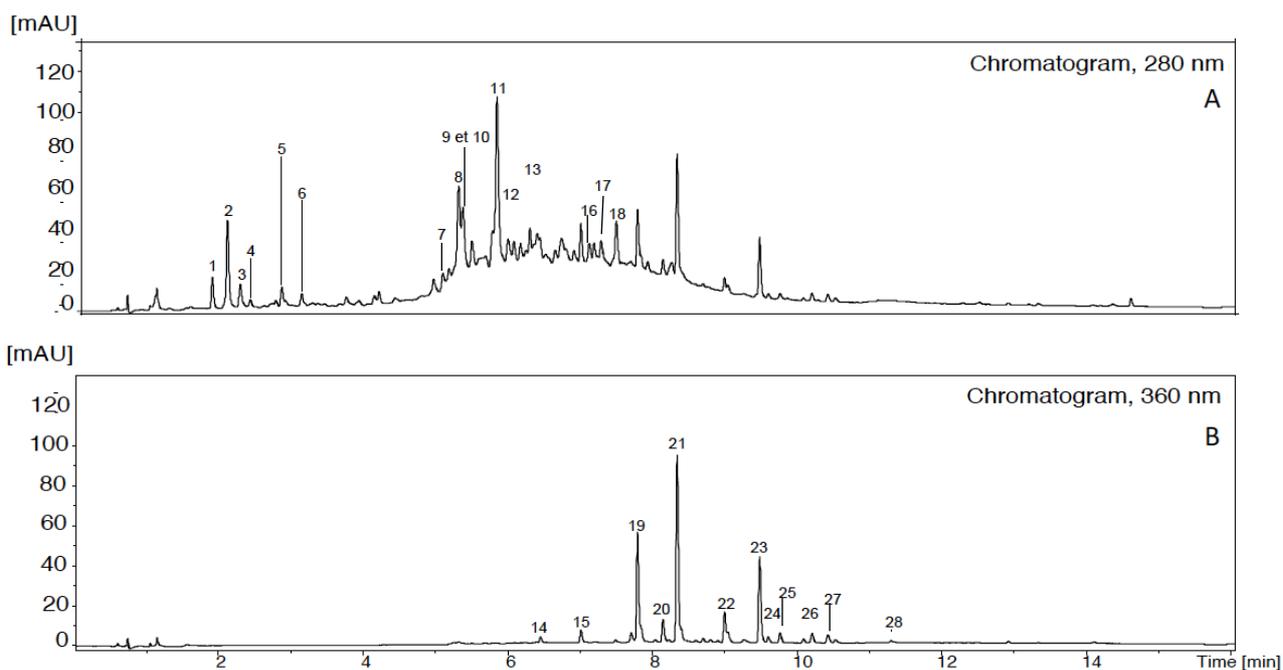


Figure 36 : Chromatogramme UPLC-MS de l'éco-extrait de *P. mauritianum* à 280 nm (A) et 360 nm (B). L'éco-extrait de *P. mauritianum* a été caractérisé par UPLC (Agilent 1209, Santa Clara, CA) équipé d'une colonne Agilent Zorbax SB-C18 (100 nm x 2,1 nm x 1,8 μ m) et d'un détecteur UV-VIS-DAD. L'UPLC est couplé au spectromètre de masse à piège à ions Esquire 6000 utilisant une source d'ionisation Electrospray (ESI) (Bruker Daltonics, Billerica, MA). L'extrait de *P. mauritinaum* a été dissous dans un mélange MeOH-H₂O (1/1, v/v) à 5 mg.mL⁻¹. Les analyses ont été effectuées en triplicata.

Pics	Composés	t_r (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Ions fragments	Teneur (% massique)
1	Monogalloylhexoside ^(a)	1,9	331	169	1,011 ± 0,023
2	Acide gallique ^{*(a)}	2,1	169	125	3,380 ± 0,107
3	HHDP-galloylglucose ^(a)	2,3	633	482, 301	0,944 ± 0,007
4	Digalloylhexoside ^(a)	2,4	483	331, 169	0,260 ± 0,014
5	HHDP-galloylglucose ^(a)	2,9	633	481, 301	0,696 ± 0,005
6	Digalloylhexoside ^(a)	3,1	483	331, 169	0,455 ± 0,024
7	HHDP-digalloyl-glucose ^(a)	5,1	785	633, 483, 301	0,439 ± 0,003
8	ni	5,3	843	/	nq
9	ni	5,4	859	/	nq
10	Trigalloylhexoside	5,4	635	483, 465	nq
11	ni	5,8	859	/	nq
12	HHDP-digalloyl-glucose ^(a)	6,0	785	633, 483, 301	0,990 ± 0,036
13	Trigalloylhexoside ^(a)	6,3	635	483, 465	0,653 ± 0,033
14	Myricétine-O-hexoside ^(b)	6,4	479	317	0,077 ± 0,003
15	Quercétine-O-hexoside ^(b)	7,0	463	301	0,243 ± 0,001
16	HHDP-trigalloyl-glucose ^(a)	7,1	937/469	785, 767, 465	0,608 ± 0,007
17	HHDP-trigalloyl-glucose ^(a)	7,3	937/469	785, 767, 465, 447	0,479 ± 0,017

18	Tétragalloylhexoside ^(a)	7,5	787	635, 617, 465	1,668 ± 0,089
19	Quercétine-O-hexoside ^(b)	7,8	463	301, 179, 151	2,576 ± 0,056
20	Kaempférol-O-hexoside ^(c)	8,1	447	285	0,427 ± 0,006
21	Kaempférol-O-hexoside ^(c)	8,3	447	285	4,087 ± 0,034
22	Quercétine-O-acetylhexoside ^(b)	9,0	505	463, 445, 301, 179, 151	0,704 ± 0,007
23	Kaempférol-O-acetylhexoside ^(c)	9,5	489	447, 429, 285	1,946 ± 0,011
24	Kaempférol-O-acetylhexoside ^(c)	9,6	489	429, 285	0,049 ± 0,002
25	Quercétine-O-acetylramnoside ^(b)	9,8	489	447, 429, 301, 179, 151	0,201 ± 0,001
26	Kaempférol-O-acetylramnoside ^(c)	10,2	473	413, 285	0,148 ± 0,003
27	Kaempférol-O-acetylramnoside ^(c)	10,4	473	413, 285	0,156 ± 0,005
28	Kaempférol* ^(c)	11,3	285	-	Tr

Tableau 9 : Identification des polyphénols de *P. mauritanum*.

* temps de rétention vérifié avec un standard commercial

(a) quantifié en équivalent acide gallique à 280 nm

(b) quantifié en équivalent quercétine à 360 nm

(c) quantifié en équivalent kaempférol à 360 nm

Tr : Traces

D'après les résultats de chromatographie, l'extrait de *P. mauritanum* est composé principalement de flavonoïdes glycosylés tels que les dérivés du kaempférol, des dérivés de la quercétine ainsi que d'acide gallique et de ses dérivés (tableau 9). Ce qui est plutôt en accord avec la bibliographie qui décrit la présence de kaempférol et de quercétol (Smadja and Marodon, 2016).

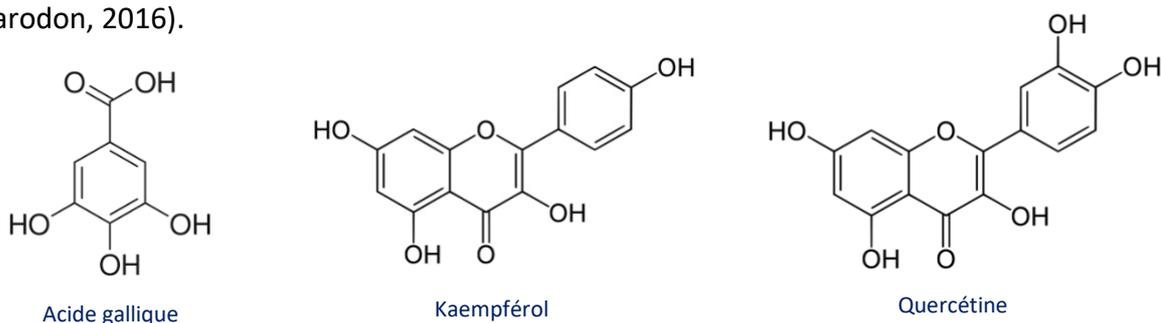


Figure 37 : Structures de l'acide gallique, du kaempférol et de la quercétine.

Les flavonoïdes sont largement décrits pour leur activité antivirale contre les rotavirus, HSV, les virus para-influenza, DENV, CHIKV ou encore ZIKV (Bae et al., 2000; Orhan et al., 2010; Özçelik et al., 2011; Simões et al., 2011; Carvalho et al., 2013; Lani et al., 2016; Lim et al., 2016).

Les composés comme l'acide gallique, le kaempférol, la quercétine et leurs dérivés sont très étudiés pour leurs activités antivirales. Concernant l'acide gallique des études montrent son activité antivirale contre HCV par inhibition de l'entrée virale avec un SI de 14,25 (Hsu et al., 2015; Govea-Salas et al., 2016). L'acide gallique isolé de graines de framboise noire (*Rubus corenaus*) possède une activité sur des virus murins et félins mais également sur le virus influenza *in vitro* et *in vivo* (Lee et al., 2016a, 2016b). Cette molécule démontre une activité contre HSV I et II par inhibition de l'attachement et/ou effet virucide (Kratz et al., 2008a, 2008b). On retrouve une activité anti-entérovirus 71 de l'acide gallique isolé des fleurs de *Woodfodia fruticosa* (SI = 99,57) (Choi et al., 2010). Isolé à partir des feuilles de *Lagerstroemia speciosa* il possède une activité anti-VIH par inhibition de l'activité de la polymérase du VIH (Nutan et al., 2013). A ce jour, aucune étude n'a été effectuée sur l'activité antivirale de l'acide gallique contre le ZIKV.

Le kaempférol et certains de ses dérivés glycosylés ont largement été étudiés pour leurs activités antivirales contre les virus influenza (SI = 19,01), VIH, HSV I (SI = 27) et II (SI = 22,2) ou encore JEV (SI = 21,5) (Mahmood et al., 1996; Min et al., 2001; Lyu et al., 2005; Jeong et al., 2009; Zhang et al., 2012b; Behbahani et al., 2014; Wang et al., 2014; Yang et al., 2014; Ha et al., 2014; Ürményi et al., 2016).

De même la quercétine et certains de ses dérivés possèdent une activité anti-influenza *in vitro* et *in vivo* (Fan et al., 2011; Choi et al., 2012; Wu et al., 2015; Liu et al., 2016b). Ces molécules démontrent également une activité antivirale contre les virus DENV-2 (SI = 7,07), HBV et HCV (Zandi et al., 2011; Bachmetov et al., 2012; Cheng et al., 2015; Lulu et al., 2016).

Cependant il a été montré que le kaempférol et la quercétine ne sont pas efficaces contre le ZIKV (Gaudry et al., 2018). Une activité anti-ZIKV est décrite pour un dérivé glycosylé de la quercétine, la quercétine-3- β -O-D-glucoside (Q3G ou isoquercitrine) *in vitro* sur des cellules Vero (SI > 70), sur des A549 (SI = 35,6), sur des hépatocytes (Huh-7)(SI = 23,3) et sur des neuroblastes humains (SH-SY5Y) (SI = 60) par inhibition de l'internalisation (Wong et al., 2017; Gaudry et al., 2018). Cette activité a été également démontrée *in vivo*, avec 50% de survie chez les souris à 30 jours avec une dose journalière de 50 mg.kg⁻¹ de Q3G (Wong et al., 2017).

Cela suggère que les dérivés glycosylés de la quercétine présents dans l'extrait de *P. mauritianum* pourraient être à l'origine de l'activité antivirale.

Suite aux résultats non fructueux de recherche de la /les molécule(s) active(s) à partir du profil chromatographique des extraits bruts actifs, nous avons décidé d'établir un fractionnement bio-guidé afin d'obtenir des fractions purifiées actives. Ces dernières nous permettront par la suite d'identifier plus facilement la famille des composés actifs anti-ZIKV.

III.2 Fractionnement bio-guidé des extraits d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum*

En collaboration avec le département de pharmacochimie moléculaire de l'Université de Grenoble. Nous avons lancé un processus de fractionnement bio-guidé sur les deux éco-extraits d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum*. Les différentes étapes de ce fractionnement bio-guidé sont représentées sur la figure 38.

Des tests de cytotoxicité et d'activité antivirale ont été réalisés sur les extraits. Lorsque l'extrait est actif, le fractionnement bio-guidé se poursuit.

La cytotoxicité a été évaluée à 24h post traitement sur des cellules Vero, par le test MTT. Les CC_{50} sont reportées sur la figure 38. Concernant l'activité antivirale, les cellules Vero ont été infectées par le ZIKV-GFP préalablement incubé pendant 1h à 37°C avec différentes concentrations des extraits.

Les extraits 1 et 3 présentent une activité anti-ZIKV avec des IC_{50} de $150,2 \pm 6,05 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $21,4 \pm 1,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivement (figure 38). Les index de sélectivité calculés pour ces extraits sont supérieurs à 7.

Une activité antivirale est toujours observée pour les extraits résiduel d'*A. theiformis* (2) (SI = 45,3) et de *P. mauritianum* (4) (SI = 105,6) (figure 38).

La fraction F8 de l'extrait d'*A. theiformis* montre toujours une activité anti-ZIKV avec un IC_{50} de $205,9 \pm 20,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et un SI = 17,3 (figure 38). Pour l'extrait de *P. mauritianum*, toutes les fractions montrent une activité antivirale. Cependant la fraction F10 est la plus efficace ($IC_{50}=21,5 \pm 4,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$, SI = 52,8) comparativement aux fractions F4 ($IC_{50}=40,3 \pm 8,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, SI = 38,9) et F6 ($IC_{50}=48,8 \pm 12,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$, SI = 35,2) (figure 38).

Ce fractionnement bio-guidé a permis d'obtenir des fractions enrichies en molécules actives. Ces résultats suggèrent que les composés actifs sont présents dans les fractions F8 et F10 pour *A. theiformis* et *P. mauritianum* respectivement. Dans le cas de *P. mauritianum* il semblerait que des composés antiviraux soient également présents dans les fractions F4 et F6.

A partir de ces fractions l'identification des composés est actuellement en cours. Il faut noter que les analyses chromatographiques ont été effectuées en ciblant uniquement les polyphénols. Il est également possible que l'activité antivirale ne soit pas due à un polyphénol.

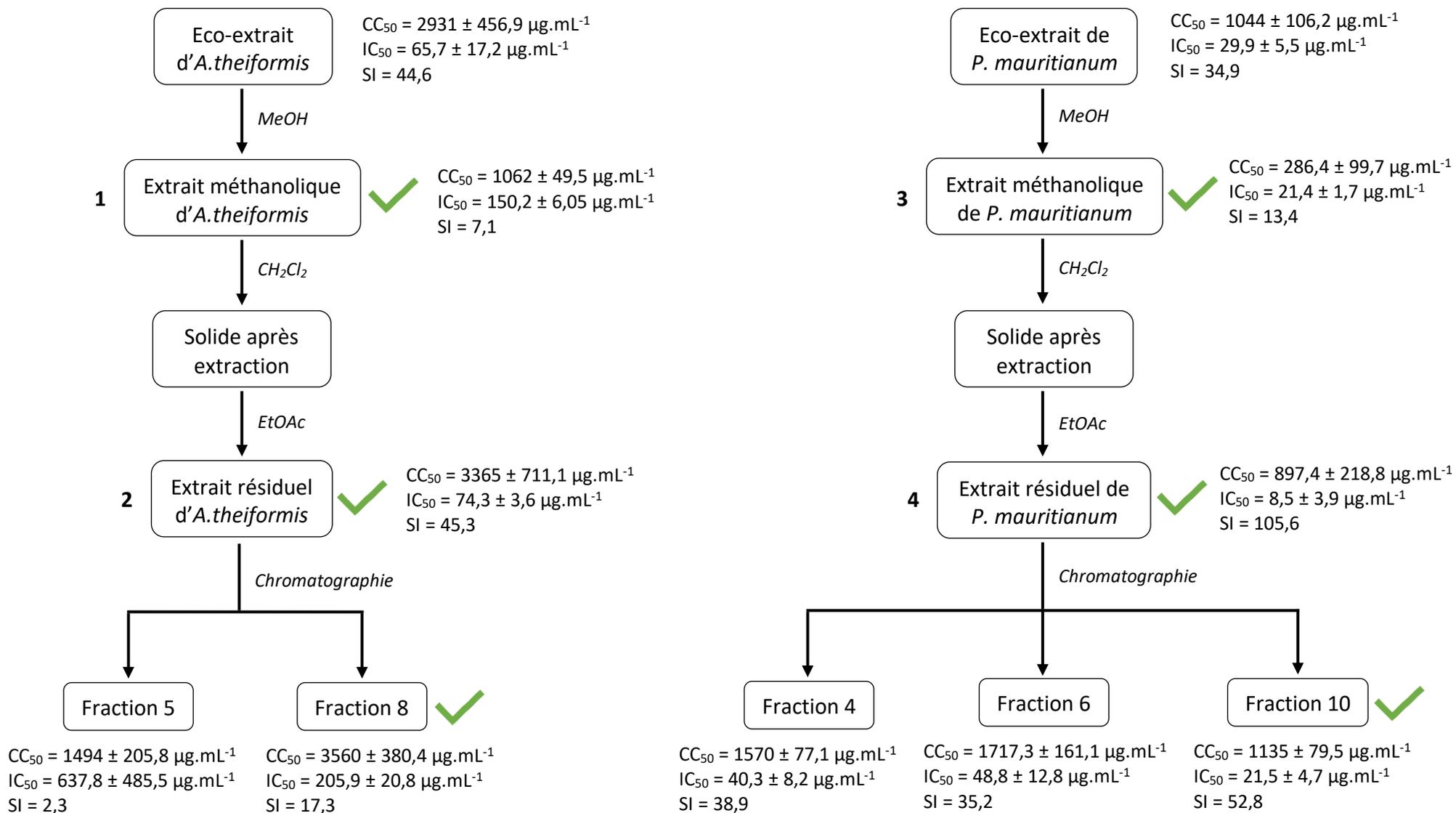


Figure 38 : Schéma des différentes étapes du fractionnement bio-guidé.

MeOH : Méthanol, CH_2Cl_2 : dichlorométhane, EtOAc : acétate d'éthyle, CC_{50} : concentration cytotoxique à 50%, IC_{50} : concentration inhibitrice à 50%, SI : index de sélectivité.

Partie 3 : Discussion générale et perspectives

Ces travaux de thèse ont débuté sur la volonté et la nécessité de développer de nouvelles thérapies antivirales par l'utilisation de plantes médicinales, face à l'arbovirus émergent zika. En effet, même si l'île de La Réunion n'a pas détecté de cas autochtones de zika, d'autres pays de la zone de l'Océan Indien ont été touchés. La présence de son vecteur sur l'île facilitant sa transmission potentielle, a mobilisé la communauté scientifique afin de trouver des moyens de lutte efficaces face à ce problème de santé publique majeur.

Les plantes médicinales réunionnaises inscrites à la pharmacopée française ont été choisies pour cette étude. Selon l'utilisation locale et traditionnelle ainsi que les activités biologiques déjà décrites dans un contexte infectieux, une liste de sept plantes a été établie. Grâce à l'utilisation d'un clone moléculaire du ZIKV avec le gène rapporteur GFP (ZIKV-GFP) pour le criblage de l'activité anti-ZIKV, deux plantes médicinales ont été identifiées pour leur activité antivirale : *Aphloia theiformis* et *Psiloxylon mauritianum*.

Dans cette dernière partie je vais reprendre brièvement les résultats sous forme synthétique, discuter des perspectives de poursuite de cette étude et enfin discuter de façon plus globale de la place des plantes médicinales dans la santé.

Les éco-extraits des deux plantes candidates ont fait l'objet d'analyses plus approfondies sur leur mécanisme d'action face à une infection par ZIKV à des doses non cytotoxiques et non génotoxiques. Les résultats obtenus montrent que les éco-extraits actifs agissent au niveau des phases précoces du cycle viral. Une analyse par qRT-PCR a permis de déterminer que l'étape d'attachement est inhibée par les éco-extraits d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum*. Cette inhibition s'effectue par un effet virucide des extraits sur les particules virales. Dans notre étude l'identification de la (ou des) molécule(s) active(s) responsable(s) de l'activité antivirale a été amorcée mais pas finalisée.

Cette étape permettrait d'affiner la compréhension du mécanisme d'action, par l'utilisation d'études *in silico*. Par exemple, dans le cas de l'EGCG une interaction avec la protéine E de ZIKV a été prédite (Sharma et al., 2017). A partir des molécules identifiées, la mise en place d'une étude Relation Structure-Activité (RSA), afin d'améliorer l'activité des molécules actives, peut être envisagée. Cette approche a été appliquée notamment dans le cas de ZIKV avec différents flavonoïdes (Lim et al., 2016). Une fois la ou les molécules actives identifiées, il serait également envisageable d'effectuer des tests *in vivo* sur petits animaux, comme des souris. Dans l'optique du développement d'un antiviral, des études cliniques sur patients seraient obligatoires.

Le mécanisme d'action mis en évidence pour les deux éco-extraits semble identique, malgré les différences de composition chimique entre *A. theiformis* et *P. mauritianum*. Il est possible que la cible soit identique pour deux molécules de famille différente. Comme l'EGCG et le nanchangmycine qui ciblent l'entrée de ZIKV dans la cellule hôte (Carneiro et al., 2016; Rausch et al., 2017).

Il est également possible que ces molécules actives ne soient pas spécifiques à l'inhibition de l'attachement de ZIKV. En effet, de nombreuses molécules, comme l'EGCG, la curcumine ou

encore le nanchangmycine, possèdent des groupements appelés PAINS pour « pan assay interference compound » qui sont capables d'inhiber de façon non spécifique de nombreuses cibles (Baell and Holloway, 2010; Pouliot and Jeanmart, 2016). Parmi ces PAINS on retrouve notamment le groupement catéchol, présent chez l'EGCG et la quercétine par exemple (Mottin et al., 2018). De plus, ces groupements ont la capacité de former des agrégats (McGovern et al., 2002). Les mêmes observations ont été faites pour différents flavonoïdes ou encore d'autres molécules issues de plantes de la médecine chinoise traditionnelle (Tritsch et al., 2015; Duan et al., 2015). Cette hypothèse pourrait expliquer les modifications morphologiques observées en microscopie électronique lors d'une incubation entre l'extrait *A. theiformis* et les particules de ZIKV.

Afin de vérifier cette hypothèse il faudrait refaire les tests d'inactivation virale en présence ou non d'un détergent non-ionique comme le Triton (Tritsch et al., 2015), avec une concentration de détergent à la fois suffisante pour empêcher les agrégats mais aussi suffisamment diluée pour ne pas abimer la structure des virions (0,01%) (Tritsch et al., 2015; Colavita et al., 2017).

Malgré les difficultés rencontrées pour aboutir à identifier des molécules actives, il est important de souligner l'importance des plantes médicinales dans la stratégie antivirale et plus généralement dans la santé. L'inscription à la pharmacopée française d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum* permet l'étude de ces dernières à partir d'un cadre structuré et montre que ces plantes sont reconnues pour leurs potentiels thérapeutiques. En effet, elles sont utilisées traditionnellement dans des formulations de tisanes contre DENV et CHIKV (Minker, 2007). Notre étude est la seule actuellement qui démontre l'activité anti-ZIKV d'extraits de plantes médicinales. En ce qui concerne l'activité antivirale contre ZIKV, la littérature décrit uniquement des études sur des composés purs. Notre étude montre l'importance des plantes médicinales réunionnaises comme sources de substances antivirales.

Il est connu que les plantes médicinales représentent un fort potentiel dans l'identification de principes actifs pouvant aboutir à la fabrication de médicaments nouveaux. Par exemple, l'artémisinine isolée d'*Artemisia annua*, est à la base des antipaludéens les plus utilisés et les plus efficaces de nos jours (Butler et al., 2010).

De plus, 60% des médicaments anti-cancéreux sont issus de substances naturelles (Guéritte and Sévenet, 2017). On retrouve parmi ces derniers le taxol et le taxotère, isolés de l'If du pacifique (*Taxus brevifolia*) (Clardy and Walsh, 2004). La vinblastine et la vincristine isolées de *Catharanthus roseus* (pervenue de madagascar), sont également utilisées comme anti-cancéreux.

Cependant, en matière d'antiviraux approuvés, peu d'entre eux sont issus de substances naturelles. On retrouve environ un tiers de molécules synthétiques mais inspirées de molécules naturelles (Newman and Cragg, 2007). Depuis quelques années, un regain d'intérêt pour les molécules naturelles dans la lutte antivirale est observé, notamment contre les virus de l'hépatite, de la dengue et plus récemment de zika (Calland et al., 2012b; Teixeira

et al., 2014; Vázquez-Calvo et al., 2017). Des tests *in vivo* ont été effectués sur certains d'entre eux, mais très peu sont testés en essais cliniques.

Il serait donc intéressant de poursuivre les études et vérifier l'efficacité de nos extraits bruts d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum*, *in vivo* sur des modèles animaux, puis chez des patients. Des tests pharmacologiques *in vivo* sur petits animaux permettraient d'observer si l'extrait est toujours actif, et quelle est l'influence de la potentielle biotransformation des molécules actives. Des études cliniques sur le thé ou des extraits de papaye fermentée par exemple, ont été effectuées via une administration orale chez des patients diabétiques. Le ratio LDL/HDL, le taux d'acide urique et de triglycérides sont considérablement améliorés chez les patients avec une alimentation supplémentée en préparations de papaye fermentée et en thé noir. Le taux d'hémolyse et l'accumulation de protéines oxydées sont également réduits (Bahorun et al., 2010, 2012; Somanah et al., 2012, 2014).

Dans un contexte viral, on retrouve également une étude sur le virus H1N1. En effet, des patients atteints du virus ont été traités avec une décoction de 4 plantes médicinales chinoises. Sur 1040 patients infectés, 756 ont été guéris suite à la prise de la décoction sans utilisation d'antiviraux approuvés supplémentaires et sans présenter d'effets secondaires (Labbé and Recasens, 2009).

Ces exemples montrent qu'il serait intéressant d'envisager des études cliniques sur l'activité anti-ZIKV des extraits bruts d'*A. theiformis* et de *P. mauritianum*. L'extrait d'*A. theiformis* présentant également une activité anti-DENV, il serait intéressant de mettre en place des études *in vivo* et des tests cliniques dans le contexte épidémique de DENV actuel à La Réunion. Enfin lors de ces études il serait intéressant de comparer l'activité d'extraits obtenus par micro-ondes avec ceux obtenus par des méthodes plus traditionnelles (infusion et décoction).

Matériels et méthodes

Matériel végétal

Les parties aériennes (feuilles et petites branches) de toutes les plantes sélectionnées ont été récoltées à l'île de La Réunion. La récolte s'est effectuée en Janvier 2016 et 2017 pour *Aphloia theiformis*, *Ayapana triplinervis* et *Hubertia ambavilla* et de Mars à Avril 2016 et 2017 au Brûlé. Pour *Antirhea borbonica*, *Dodonaea viscosa*, *Mussaenda arcuata*, et *Psiloxylon mauritianum* à Saint-Philippe et à Terrain Elisa. L'approvisionnement a été effectué par la Start-up Extrait de Bourbon (EDB). Les vouchers spécimens ont été déposés à l'Herbarium de l'Université de la Réunion.

Préparation des éco-extraits et des extraits traditionnels

La technique d'Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes (ESSAM) a été appliquée aux parties aériennes fraîches des différentes plantes en utilisant l'extracteur IDCO E200 (IDCO SAS, Marseille, France). Il est équipé d'un réacteur multimode de 2,45 GHz délivrant une puissance maximale de 1950 W. la technique ESSAM a été effectuée à pression atmosphérique. 500 g de plantes ont été chauffées à 1000 W en moyenne pendant 30 minutes sans ajout de solvant ou d'eau. L'interaction entre les micro-ondes et la matière végétale permet de récupérer l'eau intracellulaire des plantes directement par gravité.

500 g matière végétale ont été extraits avec de 1L d'eau à 100°C pendant 20 minutes afin d'obtenir une infusion.

Une décoction a été effectuée en mélangeant 500 g de plantes fraîches et 2L d'eau. Le tout est porté et maintenu à ébullition pendant 20 minutes.

Une macération alcoolique a été appliquée à 500 g de plantes. La matière végétale a été extraite avec 2L de solvant hydro alcoolique (70% d'eau et 30% d'éthanol) sur la nuit. L'éthanol présent dans l'extrait a été éliminé par l'utilisation d'un évaporateur rotatif à 40°C.

Tous les extraits obtenus sont ensuite lyophilisés par le lyophilisateur Cryotec 20K (Cryotec, Saint-Gély-du-Fesc, France) généreusement mis à disposition par Claire Desvignes (EcoEx). Les solides obtenus ont été solubilisés dans de l'eau stérile et stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

Culture cellulaire

Différentes lignées cellulaires ont été utilisées, des cellules épithéliales rénales de singes (Vero), des cellules épithéliales pulmonaires humaines (A549) et des cellules hépatiques humaines (Huh7.5). Ces cellules ont été maintenues en culture dans du milieu de culture MEM (Modified Eagle's medium) auquel est ajouté 5% (Vero et Huh7.5) ou 10% (A549) de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur, 2 mM de L-Glutamine, 1 mM de sodium pyruvate, 100 U.mL⁻¹ de pénicilline, 0.1 mg.mL⁻¹ de stréptomycine, 250µg.mL⁻¹ d'amphotéricine B et 1% d'acides aminés non essentiels (NEAA) pour les A549. Les cellules ont été cultivées sous une atmosphère humide à 5% de CO₂ à 37°C.

Des cellules de moustiques *Aedes albopictus* C6/36 (ATCC CRL-1660, Manassas, Virginie, USA) ont également été utilisées. Elles ont été maintenues à 27°C dans un milieu de culture

Leibovitz's L-15 complété avec 10% de sérum de veau inactivé par la chaleur, 1% de pénicilline/streptomycine, 1% d'une solution d'acides aminés non essentiels (Gibco) et 2% de phosphate tryptose (Gibco).

Des cellules de culture primaire issues de plastique mammaire humaine ; des kératinocytes (HKPM) et des fibroblastes (FMA) humains ont également été utilisés. Le milieu utilisé pour les kératinocytes est un milieu Kératinocytes SFM, complété avec 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ d'extrait d'hypophyse bovin (bovine pituitary extract BGE), 0,9 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de facteur de croissance épidermique (Epidermal growth factor EGF) et 500 μL de primocine. Les fibroblastes ont été maintenues dans du DMEM glutamax auquel est ajouté 1% de pénicilline/streptomycine et 10% de sérum de veau foetal non décomplémenté.

Test d'activité mitochondriale (MTT)

Le test colorimétrique au sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) a été utilisé afin de mesurer la viabilité cellulaire.

Les cellules ont étéensemencées la veille du traitement en plaques de 96 puits à une densité de $1\cdot 10^4$ cellules/puits pour les Vero et Huh7.5, $1,5\cdot 10^4$ cellules/puits pour les A549 et les FMA et $2\cdot 10^4$ cellules/puits pour les HKPM. Après 24h de traitement, les cellules sont rincées une fois avec du tampon phosphate salin (PBS), puis 120 μL d'un mélange de milieu de culture et de solution MTT à 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ sont ajoutés dans chaque puit. Suite à une nouvelle incubation de 2h à 37°C, la solution est enlevée et remplacée par 100 μL de DMSO. Après solubilisation des cristaux de formazan, l'absorbance est mesurée grâce à un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 570 nm avec une correction à 690 nm.

Des courbes de régression non linéaire ont été utilisées pour déterminer, la concentration cytotoxique à 50% (CC_{50}) et la concentration maximale non cytotoxique (MNTC) établie à un seuil de 90% de viabilité cellulaire.

Test COMET

Les cellules ont été traitées pendant 24h avec les différents extraits aux concentrations maximales non cytotoxiques, puis récupérées selon le protocole habituel. Elles sont ensuite re-suspendues dans de l'agarose Low Melt (0,6%) et déposées, à une densité minimale de $2\cdot 10^4$ cellules, sur une lame de microscope préalablement recouverte d'agarose et laissée sur glace pendant 10 minutes. Simultanément le contrôle positif est effectué en utilisant une solution de H_2O_2 à 50 μM , gardé sur glace pendant 10 minutes. Les cellules ont été lysées pendant 1h à l'obscurité grâce à une solution alcaline (NaCl 2,5M, Tris 10 mM, EDTA 0,1M, DMSO 10%, Triton 1%, $\text{pH}=10$), après 3 lavages successifs de 5 minutes avec un tampon Tris-HCl (0,4M pH 7,4), les cellules ont été incubées 30 minutes dans un tampon d'électrophorèse (NaOH 0,3M, EDTA 1mM). Après incubation l'électrophorèse a été lancée pendant 30 minutes à 21V. Les cellules ont été ensuite colorées avec un intercalant de l'ADN, le Gel red (50 μL à 1/10000 dans du PBS) pendant 10 minutes après avoir été soumises à 3 autres lavages de 5 minutes.

Les lames ont été observées au microscope Zeiss Axioskop 2.0 équipé d'une caméra Alled vision technologies. Les données sont acquies grâce au logiciel Comet Assay IV.

Cytométrie en flux

Suite à l'infection les cellules ont été rincées, trypsinisées et fixées dans du paraformaldéhyde (PFA) 3,7% pendant 20 minutes. Les analyses ont été effectuées grâce aux cytomètres FACScan ou CytoFLEX par l'utilisation des logiciels, Flowjo et CytExpert respectivement.

Virus

Différentes souches du virus Zika ont été utilisées. Des clones moléculaires de la souche ancestrale Africaine ; ZIKV-MR766 et le clone moléculaire ZIKV-MR766 exprimant la protéine GFP (ZIKV_{GFP}) (Gadea et al., 2016). La souche Zika HD78788 a été obtenue par le Centre Ressource Biologique de l'Institut Pasteur et amplifiée sur des cellules de moustiques C6/36. Des isolats cliniques ont également été utilisés ; l'isolat clinique de la souche épidémique de Polynésie Française PF-25013-18 (ZIKV-PF13) généreusement fourni par l'Institut Malardé et précédemment décrite par notre équipe (Frumence et al., 2016), a été amplifiée sur des cellules Vero. L'isolat clinique de la souche épidémique du Brésil (ZK BR 2015/15261) a été isolé d'un patient atteint de la fièvre Zika dans le Nord-Est du Brésil en 2015 et amplifié sur des cellules C6/36.

Des tests ont été effectués à partir du virus de la dengue. La souche DENV-1/FGA/89 a été isolée en 1989 chez un patient Sud-Américain (GenBank : AF226687). La souche DENV-2/ICC-265 a été isolée chez un patient souffrant de la dengue au Brésil en 2009. La souche DENV-3/5532 a été isolée en 2007 au Paraguay chez un patient souffrant d'une dengue hémorragique (GenBank : HG235027). Enfin le sérotype 4 DENV-4/TVP360 est un clone moléculaire généreusement fourni par le Dr. Ricardo Galler (Fondation Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brésil ; GenBank : KU513442). Toutes les souches du virus de la dengue ont été amplifiées sur des cellules C6/36 et quantifiées (titrées) par immunodétection « foci-forming ».

Titration par plages de lyse

Les titres des virus infectieux sont déterminés par la méthode des plages de lyse. Des cellules Vero ont étéensemencées dans des plaques de 48 puits à une densité de $3 \cdot 10^4$ cellules/puits et incubées sur la nuit à 37°C afin d'obtenir une monocouche confluente de cellules. Le lendemain les cellules ont été incubées avec 0,1 mL de milieu de culture contenant des dilutions en série de 10 en 10 de suspension virale pendant 2h à 37°C. Les cellules et les suspensions virales ont été recouvertes de 0,2 mL de milieu de culture auquel est ajouté 5% de sérum de veau fœtal (SVF) et 0,8% de carboxyméthylcellulose (CMC, Sigma-Aldrich, France). Après 4 jours d'incubation à 37°C, le milieu a été enlevé, les cellules ont été rincées 2

fois avec du PBS puis fixées avec du PFA à 3,7% pendant 20 minutes et colorées grâce à une solution à 0,5% de cristal violet (Sigma-Aldrich, France) diluée dans 20% d'éthanol.

Les plages de lyse ont été comptées dans chaque puits et le titre est exprimé en PFU/mL (plaque forming unit/mL)

Immuno-détection des foyers de lyse

Les cellules C6/36 ont étéensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de 1.10^5 cellules/puits et incubées sur la nuit à 37°C. Les surnageants ont été dilués de 10 en 10 et préparés en duplicata dans du milieu de culture et 0,4 mL de chaque dilution est ajouté aux cellules. L'inoculum a été enlevé après 1h30 d'incubation et les cellules ont été recouvertes de milieu à 1,6% de CMC contenant 10% de SVF, 0,52% de tryptose, 50 mg.mL⁻¹ de gentamicine. L'immuno-marquage grâce à un anticorps monoclonal de souris dirigé contre la protéine E (4G2) a été effectué après 7 jours suivi d'un marquage grâce à un anticorps de chèvre anti-souris conjugué à la phosphatase alcaline (Promega, Madison, WI, USA). Cette dernière est détectée par un substrat contenant une solution de NBT (nitrobleu tetrazolium chloride) et de BCIP (5- bromo-4-chloro-3-indolyphosphate p-toluidine salt) (Promega, Madison, WI, USA). Les foyers ont été comptés et le titre est exprimé en FFU.mL⁻¹ (foci-forming unit.mL⁻¹).

Immunofluorescence

Les cellules Vero ont étéensemencées sur des lamelles de verre dans des plaques 24 puits et incubées sur la nuit à 37°C. A 24h post infection, le milieu a été retiré, les cellules ont été rincées une fois avec du PBS puis fixées à température ambiante avec du paraformaldéhyde à 3,7% pendant 10 minutes. Une fois fixées et rincées 3 fois avec du PBS, les cellules sont perméabilisées avec du triton X-100 à 0,15% dans du PBS pendant 5 minutes. Les lamelles ont été incubées à l'obscurité pendant 1h avec l'anticorps primaire (dirigé contre la protéine d'enveloppe E) directement couplé au fluorophore Alexa 594 (1 : 1000) et le DAPI (1 :500) dans du PBS, 2% BSA.

Après trois lavages au PBS, les lamelles ont été montées sur des lames de microscopie avec du milieu de montage Vectashield (Vector Labs). La fluorescence a été observée à l'aide d'un microscope Nikon Eclipse E2000-U. Les images ont été acquises grâce à une caméra Hamamatsu ORCA-ER et le logiciel d'imagerie NIS-Element AR (Nikon).

Test d'inactivation viral (virucide)

Les extraits de plantes et l'EGCG ont été incubés avec ZIKV_{GFP}, MR766, PF13 (5.10^6 PFU.mL⁻¹) pendant 1h à 37°C. Le mélange a été dilué 50 fois avec du milieu de culture (concentration finale de virus : 10^5 PFU/puit), puis ajouté sur les cellules Vero, préalablementensemencées dans des plaque 6 puits. Les virus ont été mélangés avec les extraits, et immédiatement dilué 50 fois, sans temps d'incubation. Les cellules ont été infectées avec ces mélanges et utilisés

comme contrôles. Après une incubation de 2h à 37°C, l'inoculum a été retiré et les cellules ont été rincées avec du milieu de culture, et à nouveau incubées jusqu'à 24h à 37°C avec du milieu de culture. Puis les cellules ont été analysées par cytométrie en flux comme décrit précédemment.

Coloration négative et immunogold des particules de ZIKV

Les surnageants clarifiés de C6/36 infectées par la souche HD78 ont été incubés pendant 10 minutes avec les extraits. Les préparations ont été filtrées sur un filtre 0,45 µm, absorbées sur des grilles de microscopie électronique formvar/carbone négativement chargée pendant 10 minutes à température ambiante puis fixées au PFA 4% pendant 20 minutes. Les échantillons ont été bloqués avec 50 nM de NH₄Cl, saturés dans du PBS/BSA 1% et marqués avec un anticorps de souris dirigés contre la protéine d'enveloppe E pendant 20 minutes dans du PBS/BSA 1%, suivi par le traitement avec la protéine A-gold pendant 15 minutes.

Enfin, les échantillons ont été fixés avec du glutaraldéhyde à 2,5% dans du tampon sodium cacodylate 1X, colorés avec une solution aqueuse d'acétate d'uranyl à 2% pendant 1 minute, lavés trois fois avec de l'eau ultra pure et séchés pendant 30 minutes.

Les images ont été acquises grâce à un microscope TECNAI SPIRIT 120Kv équipé d'une caméra inversée EAGLE 4Kx4K.

Hybridation *In Situ* par fluorescence (FISH) et analyse par microscopie confocale

Les cellules Vero ont étéensemencées la veille dans des plaques 96 puits à une densité de 0,5.10⁴ cellules par puits et infectées avec les souches ZIKV-PF13 ou MR766 à une MOI de 1 pendant 24h. Simultanément, les souches virales ont été pré-incubées 1h à 37°C avec les extraits avant l'infection des cellules.

Les cellules ont été fixées avec de la PFA 4% pendant 30 minutes à température ambiante, puis incubées avec de l'agglutinine de blé conjugué à Alexa fluor 488 (Thermo Fisher) dans du PBS-BSA 0,5% sur la nuit à 4°C. Suite à l'immuno-marquage, les brins d'ARN positifs des deux souches de ZIKV, ont été détectés grâce à l'utilisation d'un ensemble de sondes conçus par Affymetrix, selon le protocole du fabricant (ViewRNA ISH Cells Assays).

Les sondes couplées à Alexa Fluor 546 reconnaissent une région comprise entre les 2^{ème} et 1144^{ème} nucléotides du génome de ZIKV. Les noyaux sont colorés en bleu par NucBlue (Thermo Fisher Scientific) pendant 15 minutes à température ambiante.

Les images ont été acquises par un microscope confocale à balayage laser, Zeiss LSM 700, à l'objectif X63. Les images ont été traitées avec le logiciel Zen 2 (édition bleue) et analysées avec le logiciel ICY (icy.bioimageanalysis.org) en utilisant le plug-in Spot Detector.

RT-qPCR

L'ARN total ainsi que l'ARN viral ont été extraits des cellules grâce au kit d'extraction RNeasy (Qiagen), puis rétro-transcrit en utilisant 500ng d'ARN total, l'amorce inverse E (5'-TTCACCTTGTGTTGGGC-3') et l'enzyme transcriptase inverse M-MLV (Life Technologies)

pendant 50 minutes à 42°C. La PCR en temps réel a été effectuée sur CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Le brin d'ADN complémentaire ainsi formé est ensuite amplifié en utilisant 0,2 µg d'amorces (forward 5'-GTCTTGGAAACATGGAGG-3' et reverse 5'-TTCACCTTGTGTTGGGC-3') et l'enzyme GoTaq qPCR Master Mix (Promega). Chaque Ct a été calculé dans la phase exponentielle d'amplification en utilisant le programme de l'appareil ABI7500. Un gène synthétique codant pour les nucléotides 954 à 1306 de la souche ZIKV-MR766 (GenBank: LC002520) cloné dans le plasmide pU57 a été utilisé comme matrice pour générer une courbe standard, qui a ensuite servi à effectuer une quantification absolue des virus attachés.

Test de l'entrée virale

Les cellules Vero ont étéensemencées la veille à une densité de $1,2 \cdot 10^4$ cellules par puit dans des plaques de 96 puits (Eppendorf). Elles ont été infectées le lendemain à une MOI de 500 pendant 1h à 4°C par souches virales HD78 ou MR766 de ZIKV préalablement pré-incubées pendant 1h à 37°C avec ou sans les extraits. 1h post infection, les cellules ont été à nouveau incubées à 37°C pendant 90 minutes puis fixées avec de la PFA à 4% pendant 30 minutes à température ambiante. La technique d'hybridation in situ par fluorescence est ensuite appliquée comme décrit précédemment.

Test d'attachement viral

Les cellules Vero ont étéensemencées à une densité de $2 \cdot 10^5$ cellules par puit dans des plaques de 6 puits la veille. Le lendemain, les cellules ont été placées 30 minutes à 4°C, puis infectées par la souche ZIKV-MR766 à une MOI de 1 en présence ou en absence d'extrait. Après 1h d'incubation à 4°C, l'inoculum viral a été enlevé, les cellules ont été rincées avec du MEM froid complété à 2% de SVF. L'ARN total a été extrait en utilisant le kit RNeasy (Qiagen) et une PCR en temps réel a été effectuée sur l'ARN viral en utilisant les amorces pour le gène de la protéine E de ZIKV.

Analyse UPLC-MS

L'analyse UPLC a été effectuée par chromatographie liquide (Agilent1209, Santa Clara, CA) équipé d'une colonne Agilent Zorbax SB-C18 (100 nm x 2,1 nm x 1,8 µM) et d'un détecteur UV-VIS-DAD (détecteur à diode). L'UPLC est couplée au spectromètre de masse à piège à ions Esquire 6000 utilisant une source d'ionisation Electrospray (ESI) (Bruker Daltonics, Billerica, MA). Les analyses ont été effectuées par alternance des modes positif et négatif. Les extraits ont été dissout dans un mélange MeOH/H₂O (1/1, v/v). Les solvants appliqués pour la phase mobile sont H₂O/CH₂O₂ 0,1% (A) et ACN/CH₂O₂ 0,1% (B). Le débit a été de 0,4 ml.min⁻¹ et la température de la colonne a été maintenue à 25°C. Les volumes d'injections étaient de 1 µL. Pour *A. theiformis* la longueur d'onde de détection était 260 nm et pour *P. mauritanum* 280 nm et 360 nm.

Fractionnement bio-guidé

Respectivement 1,58 g et 1,48 g d'éco-extraits d'*A. theiformis* et *P. mauritianum* ont été dissous dans 50 mL de MeOH. Les mélanges ont été agités à température ambiante pendant 48h. Après filtration, les solutions méthanoliques ont été évaporées grâce à un évaporateur rotatif sous pression à 45°C. 1,2 g et 960 mg ont été obtenu pour *A. theiformis* et *P. mauritianum* respectivement.

Les extraits méthanoliques (800 mg) ont été dissous dans 50 mL de dichlorométhane (CH₂Cl₂) et gardés en agitation pendant 36h à température ambiante. Les solides restant après filtration ont été dissous dans 50 mL d'acétate d'éthyle dans les mêmes conditions. Les solutions ont été filtrées et évaporées.

Les extraits obtenus à partir d'acétate d'éthyle ont été fractionnés (500 mg) par chromatographie liquide sur d'une colonne RP-18 (Chromabond, Macherey-Nagel, Düren, Germany) en utilisant un gradient de solvant MeOH/H₂O (10% à 100%). 20 fractions ont été obtenues et assemblées selon leur profile sur chromatographie sur couche mince.

Analyses statistiques

Les valeurs sont exprimées comme moyenne \pm erreur standard (SD) d'au moins trois expériences indépendantes. Les comparaisons entre les différentes concentrations ou les différentes conditions expérimentales ont été effectuées par analyse ANOVA (one-way). Tous les tests statistiques ont été effectués grâce au logiciel Graph-Pad Prism version 7.0. Les valeurs avec $p < 0,05$ sont considérées comme statistiquement significatives à partir d'un test de comparaison multiple de Dunnett.

Les degrés de significativité sont exprimés sur les figures comme suit : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns= non significatif

Références

- Abbink, P., Larocca, R.A., De La Barrera, R.A., Bricault, C.A., Moseley, E.T., Boyd, M., Kirilova, M., Li, Z., Ng'ang'a, D., Nanayakkara, O., et al. (2016). Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. *Science* 353, 1129–1132.
- Abdel-Mageed, W.M., Bayoumi, S.A.H., Chen, C., Vavricka, C.J., Li, L., Malik, A., Dai, H., Song, F., Wang, L., Zhang, J., et al. (2014). Benzophenone C-glucosides and gallotannins from mango tree stem bark with broad-spectrum anti-viral activity. *Bioorg. Med. Chem.* 22, 2236–2243.
- Abdel-Mogib, M., Basaif, S.A., Asiri, A.M., Sobahi, T.R., and Batterjee, S.M. (2001). New clerodane diterpenoid and flavonol-3-methyl ethers from *Dodonaea viscosa*. *Pharm.* 56, 830–831.
- Abubakr, M., Mandal, S.C., and Banerjee, S. (2013). Natural compounds against flaviviral infections. *Nat. Prod. Commun.* 8, 1487–1492.
- Adam, I., Jumaa, A.M., Elbashir, H.M., and Karsany, M.S. (2010). Maternal and perinatal outcomes of dengue in PortSudan, Eastern Sudan. *Virol. J.* 7, 153.
- Adcock, R.S., Chu, Y.-K., Golden, J.E., and Chung, D.-H. (2017). Evaluation of anti-Zika virus activities of broad-spectrum antivirals and NIH clinical collection compounds using a cell-based, high-throughput screen assay. *Antiviral Res.* 138, 47–56.
- Adsersen, A., and Adsersen, H. (1997). Plants from Réunion Island with alleged antihypertensive and diuretic effects—an experimental and ethnobotanical evaluation. *J. Ethnopharmacol.* 58, 189–206.
- Al Bittar, S., Périno-Issartier, S., Dangles, O., and Chemat, F. (2013). An innovative grape juice enriched in polyphenols by microwave-assisted extraction. *Food Chem.* 141, 3268–3272.
- Albulescu, I.C., Kovacikova, K., Tas, A., Snijder, E.J., and van Hemert, M.J. (2017). Suramin inhibits Zika virus replication by interfering with virus attachment and release of infectious particles. *Antiviral Res.* 143, 230–236.
- Ali, H., Kabir, N., Muhammad, A., Shah, M.R., Musharraf, S.G., Iqbal, N., and Nadeem, S. (2014). Hautriwaic acid as one of the hepatoprotective constituent of *Dodonaea viscosa*. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* 21, 131–140.
- Alimonti, J.B., Ribecco-Lutkiewicz, M., Sodja, C., Jezierski, A., Stanimirovic, D.B., Liu, Q., Haqqani, A.S., Conlan, W., and Bani-Yaghoub, M. (2018). Zika virus crosses an in vitro human blood brain barrier model. *Fluids Barriers CNS* 15, 15.
- Allison, S.L., Schlich, J., Stiasny, K., Mandl, C.W., Kunz, C., and Heinz, F.X. (1995). Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *J. Virol.* 69, 695–700.
- Anfasa, F., Siegers, J.Y., van der Kroeg, M., Mumtaz, N., Stalin Raj, V., de Vrij, F.M.S., Widagdo, W., Gabriel, G., Salinas, S., Simonin, Y., et al. (2017). Phenotypic Differences

between Asian and African Lineage Zika Viruses in Human Neural Progenitor Cells. *MSphere* 2.

Anggakusuma, null, Colpitts, C.C., Schang, L.M., Rachmawati, H., Frentzen, A., Pfaender, S., Behrendt, P., Brown, R.J.P., Bankwitz, D., Steinmann, J., et al. (2014). Turmeric curcumin inhibits entry of all hepatitis C virus genotypes into human liver cells. *Gut* 63, 1137–1149.

Aplamedom (2017). *Plantes médicinales de La Réunion inscrites à la Pharmacopée Française*.

Araújo, S. de S., Fernandes, T.C.C., Cardona, Y.T., Almeida, P.M. de, Marin-Morales, M.A., Dos Santos, A.V., Randau, K.P., Benko-Iseppon, A.M., and Brasileiro-Vidal, A.C. (2015). Cytotoxic and genotoxic effects of ethanolic extract of *Euphorbia hyssopifolia* L. on HepG2 cells. *J. Ethnopharmacol.* 170, 16–19.

de Araújo, T.V.B., Rodrigues, L.C., de Alencar Ximenes, R.A., de Barros Miranda-Filho, D., Montarroyos, U.R., de Melo, A.P.L., Valongueiro, S., de Albuquerque, M. de F.P.M., Souza, W.V., Braga, C., et al. (2016). Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. *Lancet Infect. Dis.* 16, 1356–1363.

Arumugasaamy, N., Ettihadieh, L.E., Kuo, C.-Y., Paquin-Proulx, D., Kitchen, S.M., Santoro, M., Placone, J.K., Silveira, P.P., Aguiar, R.S., Nixon, D.F., et al. (2018). Biomimetic Placenta-Fetus Model Demonstrating Maternal-Fetal Transmission and Fetal Neural Toxicity of Zika Virus. *Ann. Biomed. Eng.*

Arun, M., and Asha, V.V. (2008). Gastroprotective effect of *Dodonaea viscosa* on various experimental ulcer models. *J. Ethnopharmacol.* 118, 460–465.

Arung, E.T., Kuspradini, H., Kusuma, I.W., Shimizu, K., and Kondo, R. (2012). Validation of *Eupatorium triplinerve* Vahl leaves, a skin care herb from East Kalimantan, using a melanin biosynthesis assay. *J. Acupunct. Meridian Stud.* 5, 87–92.

Bachmetov, L., Gal-Tanamy, M., Shapira, A., Vorobeychik, M., Giterman-Galam, T., Sathiyamoorthy, P., Golan-Goldhirsh, A., Benhar, I., Tur-Kaspa, R., and Zemel, R. (2012). Suppression of hepatitis C virus by the flavonoid quercetin is mediated by inhibition of NS3 protease activity. *J. Viral Hepat.* 19, e81-88.

Bae, E.A., Han, M.J., Lee, M., and Kim, D.H. (2000). In vitro inhibitory effect of some flavonoids on rotavirus infectivity. *Biol. Pharm. Bull.* 23, 1122–1124.

Baell, J.B., and Holloway, G.A. (2010). New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *J. Med. Chem.* 53, 2719–2740.

Bahorun, T., Luximon-Ramma, A., Gunness, T.K., Sookar, D., Bhoyroo, S., Jugessur, R., Reebye, D., Googoolye, K., Crozier, A., and Aruoma, O.I. (2010). Black tea reduces uric acid and C-reactive protein levels in humans susceptible to cardiovascular diseases. *Toxicology* 278, 68–74.

Bahorun, T., Luximon-Ramma, A., Neergheen-Bhujun, V.S., Gunness, T.K., Googoolye, K.,

- Auger, C., Crozier, A., and Aruoma, O.I. (2012). The effect of black tea on risk factors of cardiovascular disease in a normal population. *Prev. Med.* *54 Suppl*, S98-102.
- Balasubramanian, A., Teramoto, T., Kulkarni, A.A., Bhattacharjee, A.K., and Padmanabhan, R. (2017). Antiviral activities of selected antimalarials against dengue virus type 2 and Zika virus. *Antiviral Res.* *137*, 141–150.
- Barnéoud, L., and Hecketsweiler, C. (2018). Pourquoi la France refuse le vaccin contre la dengue pour ses territoires d’outre-mer. *Le Monde*.
- Barrett, A.D.T., and Higgs, S. (2007). Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. *Annu. Rev. Entomol.* *52*, 209–229.
- Barrows, N.J., Campos, R.K., Powell, S.T., Prasanth, K.R., Schott-Lerner, G., Soto-Acosta, R., Galarza-Muñoz, G., McGrath, E.L., Urrabaz-Garza, R., Gao, J., et al. (2016). A Screen of FDA-Approved Drugs for Inhibitors of Zika Virus Infection. *Cell Host Microbe* *20*, 259–270.
- Basavannacharya, C., and Vasudevan, S.G. (2014). Suramin inhibits helicase activity of NS3 protein of dengue virus in a fluorescence-based high throughput assay format. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *453*, 539–544.
- Baz, M., Goyette, N., Griffin, B.D., Kobinger, G.P., and Boivin, G. (2017). In vitro susceptibility of geographically and temporally distinct Zika viruses to favipiravir and ribavirin. *Antivir. Ther.* *22*, 613–618.
- Behbahani, M., Sayedipour, S., Pourazar, A., and Shanehsazzadeh, M. (2014). In vitro anti-HIV-1 activities of kaempferol and kaempferol-7-O-glucoside isolated from *Securigera securidaca*. *Res. Pharm. Sci.* *9*, 463.
- Bell, T.M., Field, E.J., and Narang, H.K. (1971). Zika virus infection of the central nervous system of mice. *Arch. Gesamte Virusforsch.* *35*, 183–193.
- Bentlin, M.R., de Barros Almeida, R.A.M., Coelho, K.I.R., Ribeiro, A.F., Siciliano, M.M., Suzuki, A., and Fortaleza, C.M.C.B. (2011). Perinatal transmission of yellow fever, Brazil, 2009. *Emerg. Infect. Dis.* *17*, 1779–1780.
- Besnard, M., Lastère, S., Teissier, A., Cao-Lormeau, V.M., and Musso, D. (2014). Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Eurosurveillance* *19*, 20751.
- Besnard, M., Eyrolle-Guignot, D., Guillemette-Artur, P., Lastère, S., Bost-Bezeaud, F., Marcelis, L., Abadie, V., Garel, C., Moutard, M.-L., Jouannic, J.-M., et al. (2016). Congenital cerebral malformations and dysfunction in fetuses and newborns following the 2013 to 2014 Zika virus epidemic in French Polynesia. *Eurosurveillance* *21*, 30181.
- Bierlaire, D., Mauguin, S., Brout, J., and Musso, D. (2017). Zika virus and blood transfusion: the experience of French Polynesia. *Transfusion (Paris)* *57*, 729–733.
- Billoir, F., de Chesse, R., Tolou, H., de Micco, P., Gould, E.A., and de Lamballerie, X. (2000). Phylogeny of the genus flavivirus using complete coding sequences of arthropod-

borne viruses and viruses with no known vector. *J. Gen. Virol.* 81, 781–790.

Blicharski, T., Oniszczyk, A., Olech, M., Oniszczyk, T., Wójtowicz, A., Krawczyk, W., and Nowak, R. (2017). Puffed cereals with added chamomile - quantitative analysis of polyphenols and optimization of their extraction method. *Ann. Agric. Environ. Med. AAEM* 24, 222–228.

de Boer, H.J., Kool, A., Broberg, A., Mziray, W.R., Hedberg, I., and Levenfors, J.J. (2005). Anti-fungal and anti-bacterial activity of some herbal remedies from Tanzania. *J. Ethnopharmacol.* 96, 461–469.

Bogachek, M.V., Zaitsev, B.N., Sekatskii, S.K., Protopopova, E.V., Ternovoi, V.A., Ivanova, A.V., Kachko, A.V., Ivanisenko, V.A., Dietler, G., and Loktev, V.B. (2010). Characterization of glycoprotein E C-end of West Nile virus and evaluation of its interaction force with alphaVbeta3 integrin as putative cellular receptor. *Biochem. Biokhimiia* 75, 472–480.

Bourjot, M., Leysen, P., Eydoux, C., Guillemot, J.-C., Canard, B., Rasoanaivo, P., Guéritte, F., and Litaudon, M. (2012). Flacourtosides A-F, phenolic glycosides isolated from *Flacourtia ramontchi*. *J. Nat. Prod.* 75, 752–758.

Bousbia, N., Abert Vian, M., Ferhat, M.A., Meklati, B.Y., and Chemat, F. (2009). A new process for extraction of essential oil from Citrus peels: Microwave hydrodiffusion and gravity. *J. Food Eng.* 90, 409–413.

Brandão, G.C., Kroon, E.G., Souza Filho, J.D., and Oliveira, A.B. (2017). Antiviral Activity of *Fridericia formosa* (Bureau) L. G. Lohmann (Bignoniaceae) Extracts and Constituents. *J. Trop. Med.* 2017, 6106959.

Brillant, S., Pieribattesti, J.-C., and Marodon, C. (2006). Présentation de deux plantes aromatiques et médicinales de La Réunion à fort potentiel de développement : Ambaville et Fleur jaune. *Ethnopharmacologia* 59–66.

Bullard-Feibelman, K.M., Govero, J., Zhu, Z., Salazar, V., Veselinovic, M., Diamond, M.S., and Geiss, B.J. (2017). The FDA-approved drug sofosbuvir inhibits Zika virus infection. *Antiviral Res.* 137, 134–140.

Butler, A.R., Khan, S., and Ferguson, E. (2010). A brief history of malaria chemotherapy. *J. R. Coll. Physicians Edinb.* 40, 172–177.

Cabrera-Hernandez, A., Thepparit, C., Suksanpaisan, L., and Smith, D.R. (2007). Dengue virus entry into liver (HepG2) cells is independent of hsp90 and hsp70. *J. Med. Virol.* 79, 386–392.

Cairns, D.M., Boorgu, D.S.S.K., Levin, M., and Kaplan, D.L. (2018). Niclosamide rescues microcephaly in a humanized in vivo model of Zika infection using human induced neural stem cells. *Biol. Open* 7.

Calland, N., Albecka, A., Belouzard, S., Wychowski, C., Duverlie, G., Descamps, V., Hober, D., Dubuisson, J., Rouillé, Y., and Séron, K. (2012a). (-)-Epigallocatechin-3-gallate is a new inhibitor of hepatitis C virus entry. *Hepatol. Baltim. Md* 55, 720–729.

Calland, N., Dubuisson, J., Rouillé, Y., and Séron, K. (2012b). Hepatitis C Virus and Natural Compounds: a New Antiviral Approach? *Viruses* 4, 2197.

Calland, N., Sahuc, M.-E., Belouzard, S., Pène, V., Bonnafous, P., Mesalam, A.A., Deloison, G., Descamps, V., Sahpaz, S., Wychowski, C., et al. (2015). Polyphenols Inhibit Hepatitis C Virus Entry by a New Mechanism of Action. *J. Virol.* 89, 10053–10063.

Calvet, G., Aguiar, R.S., Melo, A.S.O., Sampaio, S.A., de Filippis, I., Fabri, A., Araujo, E.S.M., de Sequeira, P.C., de Mendonça, M.C.L., de Oliveira, L., et al. (2016). Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect. Dis.* 16, 653–660.

Cao, B., Parnell, L.A., Diamond, M.S., and Mysorekar, I.U. (2017a). Inhibition of autophagy limits vertical transmission of Zika virus in pregnant mice. *J. Exp. Med.* 214, 2303–2313.

Cao, R.-Y., Xu, Y.-F., Zhang, T.-H., Yang, J.-J., Yuan, Y., Hao, P., Shi, Y., Zhong, J., and Zhong, W. (2017b). Pediatric Drug Nitazoxanide: A Potential Choice for Control of Zika. *Open Forum Infect. Dis.* 4, ofx009.

Cao-Lormeau, V.-M., Blake, A., Mons, S., Lastère, S., Roche, C., Vanhomwegen, J., Dub, T., Baudouin, L., Teissier, A., Larre, P., et al. (2016). Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet Lond. Engl.* 387, 1531–1539.

Capriotti, A.L., Cavaliere, C., Crescenzi, C., Foglia, P., Nescatelli, R., Samperi, R., and Laganà, A. (2014). Comparison of extraction methods for the identification and quantification of polyphenols in virgin olive oil by ultra-HPLC-QToF mass spectrometry. *Food Chem.* 158, 392–400.

Caputo, L., Quintieri, L., Cavalluzzi, M.M., Lentini, G., and Habtemariam, S. (2018). Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Citrus Water-Extracts Obtained by Microwave-Assisted and Conventional Methods. *Biomedicines* 6.

Carneiro, B.M., Batista, M.N., Braga, A.C.S., Nogueira, M.L., and Rahal, P. (2016). The green tea molecule EGCG inhibits Zika virus entry. *Virology* 496, 215–218.

Carocci, M., Hinshaw, S.M., Rodgers, M.A., Villareal, V.A., Burri, D.J., Pilankatta, R., Maharaj, N.P., Gack, M.U., Stavale, E.J., Warfield, K.L., et al. (2015). The bioactive lipid 4-hydroxyphenyl retinamide inhibits flavivirus replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 85–95.

Carvalho, O.V., Botelho, C.V., Ferreira, C.G.T., Ferreira, H.C.C., Santos, M.R., Diaz, M. a. N., Oliveira, T.T., Soares-Martins, J. a. P., Almeida, M.R., and Silva, A. (2013). In vitro inhibition of canine distemper virus by flavonoids and phenolic acids: implications of structural differences for antiviral design. *Res. Vet. Sci.* 95, 717–724.

Cauchemez, S., Besnard, M., Bompard, P., Dub, T., Guillemette-Artur, P., Eyrolle-Guignot, D., Salje, H., Van Kerkhove, M.D., Abadie, V., Garel, C., et al. (2016). Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: a retrospective study. *Lancet*

Lond. Engl. 387, 2125–2132.

Chan, J.F.-W., Chik, K.K.-H., Yuan, S., Yip, C.C.-Y., Zhu, Z., Tee, K.-M., Tsang, J.O.-L., Chan, C.C.-S., Poon, V.K.-M., Lu, G., et al. (2017). Novel antiviral activity and mechanism of bromocriptine as a Zika virus NS2B-NS3 protease inhibitor. *Antiviral Res.* 141, 29–37.

Chang, S.-J., Huang, S.-H., Lin, Y.-J., Tsou, Y.-Y., and Lin, C.-W. (2014). Antiviral activity of *Rheum palmatum* methanol extract and chrysophanol against Japanese encephalitis virus. *Arch. Pharm. Res.* 37, 1117–1123.

Chapman, E.G., Costantino, D.A., Rabe, J.L., Moon, S.L., Wilusz, J., Nix, J.C., and Kieft, J.S. (2014). The Structural Basis of Pathogenic Subgenomic Flavivirus RNA (sfRNA) Production. *Science* 344, 307–310.

Charrier, L., Poirier, F., Maillet, G.O., and Lubrano, C. (2006). Utilisation cosmetique de mangiferine.

Chaudhary, V., Yuen, K.-S., Chan, J.F.-W., Chan, C.-P., Wang, P.-H., Cai, J.-P., Zhang, S., Liang, M., Kok, K.-H., Chan, C.-P., et al. (2017). Selective Activation of Type II Interferon Signaling by Zika Virus NS5 Protein. *J. Virol.* 91.

Chen, H.-L., Chang, J.-K., and Tang, R.-B. (2015). Current recommendations for the Japanese encephalitis vaccine. *J. Chin. Med. Assoc.* 78, 271–275.

Chen, J., Yang, Y.-F., Yang, Y., Zou, P., Chen, J., He, Y., Shui, S.-L., Cui, Y.-R., Bai, R., Liang, Y.-J., et al. (2018). AXL promotes Zika virus infection in astrocytes by antagonizing type I interferon signalling. *Nat. Microbiol.* 3, 302–309.

Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R.E., Fromm, J.R., Esko, J.D., Linhardt, R.J., and Marks, R.M. (1997). Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat. Med.* 3, 866–871.

Cheng, F., Ramos da Silva, S., Huang, I.-C., Jung, J.U., and Gao, S.-J. (2018). Suppression of Zika Virus Infection and Replication in Endothelial Cells and Astrocytes by PKA Inhibitor PKI 14-22. *J. Virol.* 92.

Cheng, Z., Sun, G., Guo, W., Huang, Y., Sun, W., Zhao, F., and Hu, K. (2015). Inhibition of hepatitis B virus replication by quercetin in human hepatoma cell lines. *Virol. Sin.* 30, 261–268.

Cheriyana, B.V., Kadirvelu, P., Nadipelly, J., Shanmugasundaram, J., Sayeli, V., and Subramanian, V. (2017). Anti-nociceptive Effect of 7-methoxy Coumarin from *Eupatorium Triplinerve* vahl (Asteraceae). *Pharmacogn. Mag.* 13, 81–84.

Chinemana, F., Drummond, R.B., Mavi, S., and de Zoysa, I. (1985). Indigenous plant remedies in Zimbabwe. *J. Ethnopharmacol.* 14, 159–172.

Choi, H.J., Song, J.H., Park, K.S., and Baek, S.H. (2010). In vitro anti-enterovirus 71 activity of gallic acid from *Woodfordia fruticosa* flowers. *Lett. Appl. Microbiol.* 50, 438–440.

- Choi, H.J., Song, J.H., and Kwon, D.H. (2012). Quercetin 3-rhamnoside exerts antiinfluenza A virus activity in mice. *Phytother. Res. PTR* 26, 462–464.
- Chu, J.J.-H., and Ng, M.-L. (2004). Interaction of West Nile virus with alpha v beta 3 integrin mediates virus entry into cells. *J. Biol. Chem.* 279, 54533–54541.
- Cire Océan Indien (2018). Point épidémiologique n°67.
- Clardy, J., and Walsh, C. (2004). Lessons from natural molecules. *Nature* 432, 829–837.
- Colavita, F., Quartu, S., Lalle, E., Bordi, L., Lapa, D., Meschi, S., Vulcano, A., Toffoletti, A., Bordi, E., Paglia, M.G., et al. (2017). Evaluation of the inactivation effect of Triton X-100 on Ebola virus infectivity. *J. Clin. Virol.* 86, 27–30.
- Coloma, J., Jain, R., Rajashankar, K.R., García-Sastre, A., and Aggarwal, A.K. (2016). Structures of NS5 Methyltransferase from Zika Virus. *Cell Rep.* 16, 3097–3102.
- Corlay, N., Delang, L., Girard-Valenciennes, E., Neyts, J., Clerc, P., Smadja, J., Guéritte, F., Leyssen, P., and Litaudon, M. (2014). Tiglane diterpenes from *Croton mauritianus* as inhibitors of chikungunya virus replication. *Fitoterapia* 97, 87–91.
- Costa, H.E., Gouilly, J., Mansuy, J.-M., Chen, Q., Levy, C., Cartron, G., Veas, F., Al-Daccak, R., Izopet, J., and Jabrane-Ferrat, N. (2016). ZIKA virus reveals broad tissue and cell tropism during the first trimester of pregnancy. *Sci. Rep.* 6.
- Crance, J.M., Scaramozzino, N., Jouan, A., and Garin, D. (2003). Interferon, ribavirin, 6-azauridine and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses. *Antiviral Res.* 58, 73–79.
- Croft, A.M. (2010). Malaria: prevention in travellers. *BMJ Clin. Evid.* 2010.
- Cunha, A.J.L.A. da, de Magalhães-Barbosa, M.C., Lima-Setta, F., Medronho, R. de A., and Prata-Barbosa, A. (2017). Microcephaly Case Fatality Rate Associated with Zika Virus Infection in Brazil: Current Estimates. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 36, 528–530.
- Danthu, P., Lubrano, C., Flavet, L., Rahajanirina, V., Behra, O., Fromageot, C., Rabevohitra, R., and Roger, E. (2010). Biological factors influencing production of xanthenes in *Aphloia theiformis*. *Chem. Biodivers.* 7, 140–150.
- Dao, T.T., Dang, T.T., Nguyen, P.H., Kim, E., Thuong, P.T., and Oh, W.K. (2012). Xanthenes from *Polygala karensium* inhibit neuraminidases from influenza A viruses. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 3688–3692.
- Dar, H.A., Zaheer, T., Paracha, R.Z., and Ali, A. (2017). Structural analysis and insight into Zika virus NS5 mediated interferon inhibition. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 51, 143–152.
- Das, S., Laxminarayana, S.V., Chandra, N., Ravi, V., and Desai, A. (2009). Heat shock protein 70 on Neuro2a cells is a putative receptor for Japanese encephalitis virus. *Virology* 385, 47–57.

- Davis, C.W., Nguyen, H.-Y., Hanna, S.L., Sánchez, M.D., Doms, R.W., and Pierson, T.C. (2006). West Nile Virus Discriminates between DC-SIGN and DC-SIGNR for Cellular Attachment and Infection. *J. Virol.* *80*, 1290.
- Dejnirattisai, W., Webb, A.I., Chan, V., Jumnainsong, A., Davidson, A., Mongkolsapaya, J., and Screaton, G. (2011). Lectin Switching During Dengue Virus Infection. *J. Infect. Dis.* *203*, 1775.
- Delazar, A., Nahar, L., Hamedeyazdan, S., and Sarker, S.D. (2012). Microwave-assisted extraction in natural products isolation. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *864*, 89–115.
- Delvecchio, R., Higa, L.M., Pezzuto, P., Valadão, A.L., Garcez, P.P., Monteiro, F.L., Loiola, E.C., Dias, A.A., Silva, F.J.M., Aliota, M.T., et al. (2016). Chloroquine, an Endocytosis Blocking Agent, Inhibits Zika Virus Infection in Different Cell Models. *Viruses* *8*.
- Dharmaratne, H.R.W., Tan, G.T., Marasinghe, G.P.K., and Pezzuto, J.M. (2002). Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 replication by *Calophyllum* coumarins and xanthenes. *Planta Med.* *68*, 86–87.
- Dick, G.W.A. (1952). Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* *46*, 521–534.
- Dick, G.W.A., Kitchen, S.F., and Haddow, A.J. (1952). Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* *46*, 509–520.
- Dijoux, M.-G., Lavaud, C., Massiot, G., Le Men-Olivier, L., and Sheeley, D.M. (1993). A saponin from leaves of *Aphloia madagascariensis*. *Phytochemistry* *34*, 497–499.
- Do, T.K.T. (2016). Évaluation des performances de la chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC) dans l'analyse (qualitative et quantitative) des métabolites secondaires dans les extraits naturels. phdthesis. Université Côte d'Azur.
- Don, M.-J., Huang, Y.-J., Huang, R.-L., and Lin, Y.-L. (2004). New phenolic principles from *Hypericum sampsonii*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* *52*, 866–869.
- Duan, D., Doak, A.K., Nedyalkova, L., and Shoichet, B.K. (2015). Colloidal Aggregation and the in Vitro Activity of Traditional Chinese Medicines. *ACS Chem. Biol.* *10*, 978–988.
- Duan, W., Song, H., Wang, H., Chai, Y., Su, C., Qi, J., Shi, Y., and Gao, G.F. (2017). The crystal structure of Zika virus NS5 reveals conserved drug targets. *EMBO J.* *36*, 919–933.
- Duffy, M.R., Chen, T.-H., Hancock, W.T., Powers, A.M., Kool, J.L., Lanciotti, R.S., Pretrick, M., Marfel, M., Holzbauer, S., Dubray, C., et al. (2009). Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* *360*, 2536–2543.
- Dupont-Rouzeyrol, M., O'Connor, O., Calvez, E., Daurès, M., John, M., Grangeon, J.-P., and Gourinat, A.-C. (2015). Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* *21*, 381–382.
- Dupont-Rouzeyrol, M., Biron, A., O'Connor, O., Huguon, E., and Descloux, E. (2016).

- Infectious Zika viral particles in breastmilk. *Lancet Lond. Engl.* 387, 1051.
- Elgner, F., Sabino, C., Basic, M., Ploen, D., Grünweller, A., and Hildt, E. (2018). Inhibition of Zika Virus Replication by Silvestrol. *Viruses* 10.
- Estoppey, D., Lee, C.M., Janoschke, M., Lee, B.H., Wan, K.F., Dong, H., Mathys, P., Filipuzzi, I., Schuhmann, T., Riedl, R., et al. (2017). The Natural Product Cavinafungin Selectively Interferes with Zika and Dengue Virus Replication by Inhibition of the Host Signal Peptidase. *Cell Rep.* 19, 451–460.
- Fagbami, A.H. (1979). Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. *J. Hyg. (Lond.)* 83, 213–219.
- Fan, D., Zhou, X., Zhao, C., Chen, H., Zhao, Y., and Gong, X. (2011). Anti-inflammatory, antiviral and quantitative study of quercetin-3-O- β -D-glucuronide in *Polygonum perfoliatum* L. *Fitoterapia* 82, 805–810.
- Fan, W., Qian, P., Wang, D., Zhi, X., Wei, Y., Chen, H., and Li, X. (2017). Integrin $\alpha\beta 3$ promotes infection by Japanese encephalitis virus. *Res. Vet. Sci.* 111, 67–74.
- Farhat, A., Ginies, C., Romdhane, M., and Chemat, F. (2009). Eco-friendly and cleaner process for isolation of essential oil using microwave energy: Experimental and theoretical study. *J. Chromatogr. A* 1216, 5077–5085.
- Farhat, A., Fabiano-Tixier, A.-S., El Maataoui, M., Maingonnat, J.-F., Romdhane, M., and Chemat, F. (2011). Microwave steam diffusion for extraction of essential oil from orange peel: Kinetic data, extract's global yield and mechanism. *Food Chem.* 125, 255–261.
- Farias, K.J.S., Machado, P.R.L., and da Fonseca, B.A.L. (2013). Chloroquine inhibits dengue virus type 2 replication in Vero cells but not in C6/36 cells. *ScientificWorldJournal* 2013, 282734.
- Farias, K.J.S., Machado, P.R.L., de Almeida Junior, R.F., de Aquino, A.A., and da Fonseca, B.A.L. (2014). Chloroquine interferes with dengue-2 virus replication in U937 cells. *Microbiol. Immunol.* 58, 318–326.
- Farias, K.J.S., Machado, P.R.L., Muniz, J.A.P.C., Imbeloni, A.A., and da Fonseca, B.A.L. (2015). Antiviral activity of chloroquine against dengue virus type 2 replication in Aotus monkeys. *Viral Immunol.* 28, 161–169.
- Fernández-Sanlés, A., Ríos-Marco, P., Romero-López, C., and Berzal-Herranz, A. (2017). Functional Information Stored in the Conserved Structural RNA Domains of Flavivirus Genomes. *Front. Microbiol.* 8.
- Ferreira, A.C., Zaverucha-do-Valle, C., Reis, P.A., Barbosa-Lima, G., Vieira, Y.R., Mattos, M., Silva, P. de P., Sacramento, C., de Castro Faria Neto, H.C., Campanati, L., et al. (2017). Sofosbuvir protects Zika virus-infected mice from mortality, preventing short- and long-term sequelae. *Sci. Rep.* 7, 9409.
- Fialho, L.G., da Silva, V.P., Reis, S.R.N.I., Azeredo, E.L., Kaplan, M.A.C., Figueiredo, M.R.,

and Kubelka, C.F. (2016). Antiviral and Immunomodulatory Effects of *Norantea brasiliensis* Choisy on Dengue Virus-2. *Intervirology* 59, 217–227.

Fink, S.L., Vojtech, L., Wagoner, J., Slivinski, N.S.J., Jackson, K.J., Wang, R., Khadka, S., Luthra, P., Basler, C.F., and Polyak, S.J. (2018). The Antiviral Drug Arbidol Inhibits Zika Virus. *Sci. Rep.* 8, 8989.

Flamand, C., Fritzell, C., Prince, C., Abboud, P., Ardillon, V., Carvalho, L., Demar, M., Boukhari, R., Papaix-Puech, M., Elenga, N., et al. (2017). Epidemiological assessment of the severity of dengue epidemics in French Guiana. *PLoS ONE* 12.

Fonseca, K., Meatherall, B., Zarra, D., Drebot, M., MacDonald, J., Pabbaraju, K., Wong, S., Webster, P., Lindsay, R., and Tellier, R. (2014). First case of Zika virus infection in a returning Canadian traveler. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 91, 1035–1038.

Fornari, T., Vicente, G., Vázquez, E., García-Risco, M.R., and Reglero, G. (2012). Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. *J. Chromatogr. A* 1250, 34–48.

Fortin, H., Vigor, C., Lohézic-Le Dévéhat, F., Robin, V., Le Bossé, B., Boustie, J., and Amoros, M. (2002). In vitro antiviral activity of thirty-six plants from La Réunion Island. *Fitoterapia* 73, 346–350.

Foy, B.D., Kobylinski, K.C., Foy, J.L.C., Blitvich, B.J., Travassos da Rosa, A., Haddow, A.D., Lanciotti, R.S., and Tesh, R.B. (2011). Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 880–882.

Fraser, J.E., Watanabe, S., Wang, C., Chan, W.K.K., Maher, B., Lopez-Denman, A., Hick, C., Wagstaff, K.M., Mackenzie, J.M., Sexton, P.M., et al. (2014). A nuclear transport inhibitor that modulates the unfolded protein response and provides in vivo protection against lethal dengue virus infection. *J. Infect. Dis.* 210, 1780–1791.

Frumence, E., Roche, M., Krejbich-Trotot, P., El-Kalamouni, C., Nativel, B., Rondeau, P., Missé, D., Gadea, G., Viranaicken, W., and Desprès, P. (2016). The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells leading to IFN- β production and apoptosis induction. *Virology* 493, 217–226.

Gadea, G., Bos, S., Krejbich-Trotot, P., Clain, E., Viranaicken, W., El-Kalamouni, C., Mavingui, P., and Desprès, P. (2016). A robust method for the rapid generation of recombinant Zika virus expressing the GFP reporter gene. *Virology* 497, 157–162.

Gaudinski, M.R., Houser, K.V., Morabito, K.M., Hu, Z., Yamshchikov, G., Rothwell, R.S., Berkowitz, N., Mendoza, F., Saunders, J.G., Novik, L., et al. (2018). Safety, tolerability, and immunogenicity of two Zika virus DNA vaccine candidates in healthy adults: randomised, open-label, phase 1 clinical trials. *Lancet Lond. Engl.* 391, 552–562.

Gaudry, A., Bos, S., Viranaicken, W., Roche, M., Krejbich-Trotot, P., Gadea, G., Desprès, P., and El-Kalamouni, C. (2018). The Flavonoid Isoquercitrin Precludes Initiation of Zika Virus Infection in Human Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 19.

Gaunt, M.W., Sall, A.A., de Lamballerie, X., Falconar, A.K., Dzhibanian, T.I., and Gould, E.A. (2001). Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *J. Gen. Virol.* 82, 1867–1876.

Gauvin-Bialecki, A., and Marodon, C. (2008). Essential oil of *Ayapana triplinervis* from Reunion Island: A good natural source of thymohydroquinone dimethyl ether. *Biochem. Syst. Ecol.* 36, 853–856.

Germi, R., Crance, J.-M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R.W.H., Zarski, J.-P., and Drouet, E. (2002). Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology* 292, 162–168.

Getie, M., Gebre-Mariam, T., Rietz, R., Höhne, C., Huschka, C., Schmidtke, M., Abate, A., and Neubert, R.H.H. (2003). Evaluation of the anti-microbial and anti-inflammatory activities of the medicinal plants *Dodonaea viscosa*, *Rumex nervosus* and *Rumex abyssinicus*. *Fitoterapia* 74, 139–143.

Giel-Moloney, M., Goncalvez, A.P., Catalan, J., Lecouturier, V., Girerd-Chambaz, Y., Diaz, F., Maldonado-Arocho, F., Gomila, R.C., Bernard, M.-C., Oomen, R., et al. (2018). Chimeric yellow fever 17D-Zika virus (ChimeriVax-Zika) as a live-attenuated Zika virus vaccine. *Sci. Rep.* 8, 13206.

Go, Y.Y., Balasuriya, U.B.R., and Lee, C.-K. (2014). Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clin. Exp. Vaccine Res.* 3, 58–77.

Godoy, A.S., Lima, G.M.A., Oliveira, K.I.Z., Torres, N.U., Maluf, F.V., Guido, R.V.C., and Oliva, G. (2017). Crystal structure of Zika virus NS5 RNA-dependent RNA polymerase. *Nat. Commun.* 8, 14764.

Gopalsamy, N., Vargas, D., Guého, J., Ricaud, C., and Hostettmann, K. (1988). Saponins from leaves of *Aphloia theiformis*. *Phytochemistry* 27, 3593–3595.

Gourinat, A.-C., O'Connor, O., Calvez, E., Goarant, C., and Dupont-Rouzeyrol, M. (2015). Detection of Zika virus in urine. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 84–86.

Govea-Salas, M., Rivas-Estilla, A.M., Rodríguez-Herrera, R., Lozano-Sepúlveda, S.A., Aguilar-Gonzalez, C.N., Zugasti-Cruz, A., Salas-Villalobos, T.B., and Morlett-Chávez, J.A. (2016). Gallic acid decreases hepatitis C virus expression through its antioxidant capacity. *Exp. Ther. Med.* 11, 619.

Grant, A., Ponia, S.S., Tripathi, S., Balasubramaniam, V., Miorin, L., Sourisseau, M., Schwarz, M.C., Sánchez-Seco, M.P., Evans, M.J., Best, S.M., et al. (2016). Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. *Cell Host Microbe* 19, 882–890.

Guéritte, F., and Sévenet, T. (2017). Les substances naturelles en chimiothérapie anticancéreuse. *Biofutur* 35–38.

Gupta, M., Mazumder, U.K., Chaudhuri, I., Chaudhuri, R.K., Bose, P., Bhattacharya, S.,

- Manikandan, L., and Patra, S. (2002). Antimicrobial activity of *Eupatorium ayapana*. *Fitoterapia* 73, 168–170.
- Gurib-Fakim, A., and Brendler, T. (2004). Medicinal and aromatic plants of Indian Ocean Islands: Madagascar, Comoros, Seychelles and Mascarenes. *Med. Aromat. Plants Indian Ocean Isl. Madag. Comoros Seychelles Mascarenes*.
- Guy, B., Guirakhoo, F., Barban, V., Higgs, S., Monath, T.P., and Lang, J. (2010). Preclinical and clinical development of YFV 17D-based chimeric vaccines against dengue, West Nile and Japanese encephalitis viruses. *Vaccine* 28, 632–649.
- Guzman, M.G., and Harris, E. (2015a). Dengue. *Lancet Lond. Engl.* 385, 453–465.
- Ha, S.-Y., Youn, H., Song, C.-S., Kang, S.C., Bae, J.J., Kim, H.T., Lee, K.M., Eom, T.H., Kim, I.S., and Kwak, J.H. (2014). Antiviral effect of flavonol glycosides isolated from the leaf of *Zanthoxylum piperitum* on influenza virus. *J. Microbiol. Seoul Korea* 52, 340–344.
- Haddow, A.D., Schuh, A.J., Yasuda, C.Y., Kasper, M.R., Heang, V., Huy, R., Guzman, H., Tesh, R.B., and Weaver, S.C. (2012). Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1477.
- Halstead, S.B., and Thomas, S.J. (2010). Japanese encephalitis: new options for active immunization. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 50, 1155–1164.
- Hamel, R., Dejarnac, O., Wichit, S., Ekchariyawat, P., Neyret, A., Luplertlop, N., Perera-Lecoin, M., Surasombatpattana, P., Talignani, L., Thomas, F., et al. (2015). Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J. Virol.* 89, 8880.
- Han, Y., Mesplède, T., Xu, H., Quan, Y., and Wainberg, M.A. (2018). The antimalarial drug amodiaquine possesses anti-ZIKA virus activities. *J. Med. Virol.* 90, 796–802.
- Hao, J., Han, W., Huang, S., Xue, B., and Deng, X. (2002). Microwave-assisted extraction of artemisinin from *Artemisia annua* L. *Sep. Purif. Technol.* 28, 191–196.
- Hastings, A.K., Yockey, L.J., Jagger, B.W., Hwang, J., Uraki, R., Gaitsch, H.F., Parnell, L.A., Cao, B., Mysorekar, I.U., Rothlin, C.V., et al. (2017). TAM Receptors Are Not Required for Zika Virus Infection in Mice. *Cell Rep.* 19, 558–568.
- Haviernik, J., Štefánik, M., Fojtíková, M., Kali, S., Tordo, N., Rudolf, I., Hubálek, Z., Eyer, L., and Ruzek, D. (2018). Arbidol (Umifenovir): A Broad-Spectrum Antiviral Drug That Inhibits Medically Important Arthropod-Borne Flaviviruses. *Viruses* 10.
- Heinz, F.X., and Stiasny, K. (2012). Flaviviruses and their antigenic structure. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 55, 289–295.
- Hilgard, P., and Stockert, R. (2000). Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology* 32, 1069–1077.
- Hotta, S. (1952). Experimental studies on dengue. I. Isolation, identification and modification of the virus. *J. Infect. Dis.* 90, 1–9.

Hsoidrou, S., Bousta, D., Lachkar, M., Hassane, S.O.S., Youbi-Hamsas, A.E., Mansouri, L.E.L., Benjilali, J., El-Hajaji, H., and Farah, A. (2014). Phytochemical screening, immunomodulatory and anti-inflammatory activities of the phenolic fraction of *Aphloia theiformis* (Vahl) Benn. plant used in comorian traditional medicine. *Phytothérapie* *12*, 354–359.

Hsu, W.-C., Chang, S.-P., Lin, L.-C., Li, C.-L., Richardson, C.D., Lin, C.-C., and Lin, L.-T. (2015). Limonium sinense and gallic acid suppress hepatitis C virus infection by blocking early viral entry. *Antiviral Res.* *118*, 139–147.

Iranpour, M., Moghadam, A.R., Yazdi, M., Ande, S.R., Alizadeh, J., Wiechec, E., Lindsay, R., Drebot, M., Coombs, K.M., and Ghavami, S. (2016). Apoptosis, autophagy and unfolded protein response pathways in Arbovirus replication and pathogenesis. *Expert Rev. Mol. Med.* *18*.

Isaacs, C.E., Wen, G.Y., Xu, W., Jia, J.H., Rohan, L., Corbo, C., Di Maggio, V., Jenkins, E.C., and Hillier, S. (2008). Epigallocatechin gallate inactivates clinical isolates of herpes simplex virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* *52*, 962–970.

Jeong, H.J., Ryu, Y.B., Park, S.-J., Kim, J.H., Kwon, H.-J., Kim, J.H., Park, K.H., Rho, M.-C., and Lee, W.S. (2009). Neuraminidase inhibitory activities of flavonols isolated from *Rhodiola rosea* roots and their in vitro anti-influenza viral activities. *Bioorg. Med. Chem.* *17*, 6816–6823.

Jiang, J., Li, S., Li, M., and Xiang, J. (2004). Antiviral effect of chinonin against herpes simplex virus. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci. Hua Zhong Ke Ji Xue Xue Bao Yi Xue Ying Wen Ban Huazhong Keji Daxue Xuebao Yixue Yingdewen Ban* *24*, 521–524.

Jiménez de Oya, N., Blázquez, A.-B., Casas, J., Saiz, J.-C., and Martín-Acebes, M.A. (2018). Direct Activation of Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase (AMPK) by PF-06409577 Inhibits Flavivirus Infection through Modification of Host Cell Lipid Metabolism. *Antimicrob. Agents Chemother.* *62*.

Jindadamrongwech, S., Thepparit, C., and Smith, D.R. (2004). Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch. Virol.* *149*, 915–927.

Johari, J., Kianmehr, A., Mustafa, M.R., Abubakar, S., and Zandi, K. (2012). Antiviral Activity of Baicalein and Quercetin against the Japanese Encephalitis Virus. *Int. J. Mol. Sci.* *13*, 16785–16795.

Jonville, M.C., Kodja, H., Humeau, L., Fournel, J., De Mol, P., Cao, M., Angenot, L., and Frédérick, M. (2008). Screening of medicinal plants from Reunion Island for antimalarial and cytotoxic activity. *J. Ethnopharmacol.* *120*, 382–386.

Jonville, M.C., Kodja, H., Strasberg, D., Pichette, A., Ollivier, E., Frédérick, M., Angenot, L., and Legault, J. (2011). Antiplasmodial, anti-inflammatory and cytotoxic activities of various plant extracts from the Mascarene Archipelago. *J. Ethnopharmacol.* *136*, 525–531.

- Josse, A., Robin, J.-R., and ROUILLARD, F. (2001). Utilisation de la mangiférine ou ses dérivés pour une application cosmétique.
- Jouannic, J.-M., Friszer, S., Leparac-Goffart, I., Garel, C., and Eyrolle-Guignot, D. (2016). Zika virus infection in French Polynesia. *The Lancet* 387, 1051–1052.
- Julander, J.G., Siddharthan, V., Evans, J., Taylor, R., Tolbert, K., Apuli, C., Stewart, J., Collins, P., Gebre, M., Neilson, S., et al. (2017). Efficacy of the broad-spectrum antiviral compound BCX4430 against Zika virus in cell culture and in a mouse model. *Antiviral Res.* 137, 14–22.
- Kabilan, L., Rajendran, R., Arunachalam, N., Ramesh, S., Srinivasan, S., Samuel, P.P., and Dash, A.P. (2004). Japanese encephalitis in India: an overview. *Indian J. Pediatr.* 71, 609–615.
- Kamiyama, N., Soma, R., Hidano, S., Watanabe, K., Umekita, H., Fukuda, C., Noguchi, K., Gendo, Y., Ozaki, T., Sonoda, A., et al. (2017). Ribavirin inhibits Zika virus (ZIKV) replication in vitro and suppresses viremia in ZIKV-infected STAT1-deficient mice. *Antiviral Res.* 146, 1–11.
- Khalil, N.M., Sperotto, J.S., and Manfron, M.P. (2006). Antiinflammatory activity and acute toxicity of *Dodonaea viscosa*. *Fitoterapia* 77, 478–480.
- Khurram, M., Khan, M.A., Hameed, A., Abbas, N., Qayum, A., and Inayat, H. (2009). Antibacterial activities of *Dodonaea viscosa* using contact bioautography technique. *Mol. Basel Switz.* 14, 1332–1341.
- Kim, J.-A., Seong, R.-K., Kumar, M., and Shin, O.S. (2018). Favipiravir and Ribavirin Inhibit Replication of Asian and African Strains of Zika Virus in Different Cell Models. *Viruses* 10.
- Kim, M., Kim, S.-Y., Lee, H.W., Shin, J.S., Kim, P., Jung, Y.-S., Jeong, H.-S., Hyun, J.-K., and Lee, C.-K. (2013). Inhibition of influenza virus internalization by (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Antiviral Res.* 100, 460–472.
- Kim, S.Y., Zhao, J., Liu, X., Fraser, K., Lin, L., Zhang, X., Zhang, F., Dordick, J.S., and Linhardt, R.J. (2017). Interaction of Zika Virus Envelope Protein with Glycosaminoglycans. *Biochemistry* 56, 1151–1162.
- Kollaritsch, H., and Rendi-Wagner, P. (2013). Principles of Immunization. *Travel Med.* 67–76.
- Kratz, J.M., Andrighetti-Fröhner, C.R., Leal, P.C., Nunes, R.J., Yunes, R.A., Trybala, E., Bergström, T., Barardi, C.R.M., and Simões, C.M.O. (2008a). Evaluation of anti-HSV-2 activity of gallic acid and pentyl gallate. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 903–907.
- Kratz, J.M., Andrighetti-Fröhner, C.R., Kolling, D.J., Leal, P.C., Cirne-Santos, C.C., Yunes, R.A., Nunes, R.J., Trybala, E., Bergström, T., Frugulhetti, I.C.P.P., et al. (2008b). Anti-HSV-1 and anti-HIV-1 activity of gallic acid and pentyl gallate. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103, 437–442.

- Kroschewski, H., Allison, S.L., Heinz, F.X., and Mandl, C.W. (2003). Role of heparan sulfate for attachment and entry of tick-borne encephalitis virus. *Virology* 308, 92–100.
- Kuadkitkan, A., Wikan, N., Fongsaran, C., and Smith, D.R. (2010). Identification and characterization of prohibitin as a receptor protein mediating DENV-2 entry into insect cells. *Virology* 406, 149–161.
- Kuivanen, S., Bespalov, M.M., Nandania, J., Ianevski, A., Velagapudi, V., De Brabander, J.K., Kainov, D.E., and Vapalahti, O. (2017). Obatoclax, saliphenylhalamide and gemcitabine inhibit Zika virus infection in vitro and differentially affect cellular signaling, transcription and metabolism. *Antiviral Res.* 139, 117–128.
- Kumar, A., Hou, S., Airo, A.M., Limonta, D., Mancinelli, V., Branton, W., Power, C., and Hobman, T.C. (2016). Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. *EMBO Rep.* 17, 1766–1775.
- Kuno, G., Chang, G.J., Tsuchiya, K.R., Karabatsos, N., and Cropp, C.B. (1998). Phylogeny of the genus Flavivirus. *J. Virol.* 72, 73–83.
- Labbé, C., and Recasens, O. (2009). Des plantes chinoise contre H1N1. *Tout Sur Chine* 73.
- Lanciotti, R.S., Kosoy, O.L., Laven, J.J., Velez, J.O., Lambert, A.J., Johnson, A.J., Stanfield, S.M., and Duffy, M.R. (2008). Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1232–1239.
- Lani, R., Hassandarvish, P., Shu, M.-H., Phoon, W.H., Chu, J.J.H., Higgs, S., Vanlandingham, D., Abu Bakar, S., and Zandi, K. (2016). Antiviral activity of selected flavonoids against Chikungunya virus. *Antiviral Res.* 133, 50–61.
- Lanko, K., Eggermont, K., Patel, A., Kaptein, S., Delang, L., Verfaillie, C.M., and Neyts, J. (2017). Replication of the Zika virus in different iPSC-derived neuronal cells and implications to assess efficacy of antivirals. *Antiviral Res.* 145, 82–86.
- Lavergne, R. (2016). Tisaneurs et Plantes médicinales indigènes à La Réunion. *Le Monde* (2018). Vaccin de Sanofi contre la dengue : avis positif pour une autorisation dans l'UE.
- Le Sage, F., Meilhac, O., and Gonthier, M.-P. (2017). Anti-inflammatory and antioxidant effects of polyphenols extracted from *Antirhea borbonica* medicinal plant on adipocytes exposed to *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* lipopolysaccharides. *Pharmacol. Res.* 119, 303–312.
- Ledoux, A., Cao, M., Jansen, O., Lucia, M., Campos, P.-E., Payet, B., Clerc, P., Grondin, I., Girard-Valenciennes, E., Hermann, T., et al. (2018). Antiplasmodial, Anti-chikungunya virus and Antioxidant Activities of 64 endemic Plants from the Mascarene Islands. *Int. J. Antimicrob. Agents.*
- Lee, E., Pavy, M., Young, N., Freeman, C., and Lobigs, M. (2006). Antiviral effect of the heparan sulfate mimetic, PI-88, against dengue and encephalitic flaviviruses. *Antiviral Res.* 69, 31–38.

- Lee, I., Bos, S., Li, G., Wang, S., Gadea, G., Desprès, P., and Zhao, R.Y. (2018). Probing Molecular Insights into Zika Virus–Host Interactions. *Viruses* 10.
- Lee, J.-H., Bae, S.Y., Oh, M., Seok, J.H., Kim, S., Chung, Y.B., Gowda K, G., Mun, J.Y., Chung, M.S., and Kim, K.H. (2016a). Antiviral effects of black raspberry (*Rubus coreanus*) seed extract and its polyphenolic compounds on norovirus surrogates. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80, 1196–1204.
- Lee, J.-H., Oh, M., Seok, J.H., Kim, S., Lee, D.B., Bae, G., Bae, H.-I., Bae, S.Y., Hong, Y.-M., Kwon, S.-O., et al. (2016b). Antiviral Effects of Black Raspberry (*Rubus coreanus*) Seed and Its Gallic Acid against Influenza Virus Infection. *Viruses* 8.
- Lee, S.H., Tang, Y.Q., Rathkrishnan, A., Wang, S.M., Ong, K.C., Manikam, R., Payne, B.J., Jaganath, I.B., and Sekaran, S.D. (2013). Effects of cocktail of four local Malaysian medicinal plants (*Phyllanthus* spp.) against dengue virus 2. *BMC Complement. Altern. Med.* 13, 192.
- Lei, J., Hansen, G., Nitsche, C., Klein, C.D., Zhang, L., and Hilgenfeld, R. (2016). Crystal structure of Zika virus NS2B-NS3 protease in complex with a boronate inhibitor. *Science* 353, 503–505.
- Leonardi, W., Zilbermintz, L., Cheng, L.W., Zozaya, J., Tran, S.H., Elliott, J.H., Polukhina, K., Manasherob, R., Li, A., Chi, X., et al. (2016). Bithionol blocks pathogenicity of bacterial toxins, ricin, and Zika virus. *Sci. Rep.* 6, 34475.
- Lewis, L., and Taylor, H.G. (1947). Japanese B encephalitis; clinical observations in an outbreak on Okinawa Shima. *Arch. Neurol. Psychiatry* 57, 430–463.
- Li, C., Zhu, X., Ji, X., Quanquin, N., Deng, Y.-Q., Tian, M., Aliyari, R., Zuo, X., Yuan, L., Afridi, S.K., et al. (2017a). Chloroquine, a FDA-approved Drug, Prevents Zika Virus Infection and its Associated Congenital Microcephaly in Mice. *EBioMedicine* 24, 189–194.
- Li, Z., Brecher, M., Deng, Y.-Q., Zhang, J., Sakamuru, S., Liu, B., Huang, R., Koetzner, C.A., Allen, C.A., Jones, S.A., et al. (2017b). Existing drugs as broad-spectrum and potent inhibitors for Zika virus by targeting NS2B-NS3 interaction. *Cell Res.* 27, 1046.
- Lim, H., Nguyen, T.T.H., Kim, N.M., Park, J.-S., Jang, T.-S., and Kim, D. (2016). Inhibitory effect of flavonoids against NS2B-NS3 protease of ZIKA virus and their structure activity relationship. *Biotechnol. Lett.* 1–7.
- Lin, H., Guo, X., Zhang, S., Dial, S.L., Guo, L., Manjanatha, M.G., Moore, M.M., and Mei, N. (2014). Mechanistic evaluation of Ginkgo biloba leaf extract-induced genotoxicity in L5178Y cells. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 139, 338–349.
- Liu, P., Ridilla, M., Patel, P., Betts, L., Gallichotte, E., Shahidi, L., Thompson, N.L., and Jacobson, K. (2017). Beyond attachment: Roles of DC-SIGN in dengue virus infection. *Traffic Cph. Den.* 18, 218–231.
- Liu, S., DeLalio, L.J., Isakson, B.E., and Wang, T.T. (2016a). AXL-Mediated Productive Infection of Human Endothelial Cells by Zika Virus. *Circ. Res.* 119, 1183–1189.

- Liu, Z., Zhao, J., Li, W., Shen, L., Huang, S., Tang, J., Duan, J., Fang, F., Huang, Y., Chang, H., et al. (2016b). Computational screen and experimental validation of anti-influenza effects of quercetin and chlorogenic acid from traditional Chinese medicine. *Sci. Rep.* *6*, 19095.
- Lorenz, I.C., Allison, S.L., Heinz, F.X., and Helenius, A. (2002). Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* *76*, 5480–5491.
- Lucas, C., Robin, J.-R., and Mariette, V. (2006). Composition cosmétique blanchissante contenant un extrait d'Aphloia en association avec au moins un autre extrait de plante active.
- Lulu, S.S., Thabitha, A., Vino, S., Priya, A.M., and Rout, M. (2016). Naringenin and quercetin--potential anti-HCV agents for NS2 protease targets. *Nat. Prod. Res.* *30*, 464–468.
- Luo, X., Yang, J., Chen, F., Lin, X., Chen, C., Zhou, X., Liu, S., and Liu, Y. (2018). Structurally Diverse Polyketides From the Mangrove-Derived Fungus *Diaporthe* sp. SCSIO 41011 With Their Anti-influenza A Virus Activities. *Front. Chem.* *6*, 282.
- Lyu, S.-Y., Rhim, J.-Y., and Park, W.-B. (2005). Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in vitro. *Arch. Pharm. Res.* *28*, 1293–1301.
- Ma, W., Li, S., Ma, S., Jia, L., Zhang, F., Zhang, Y., Zhang, J., Wong, G., Zhang, S., Lu, X., et al. (2016). Zika Virus Causes Testis Damage and Leads to Male Infertility in Mice. *Cell* *167*, 1511-1524.e10.
- Mahmood, N., Piacente, S., Pizza, C., Burke, A., Khan, A.I., and Hay, A.J. (1996). The anti-HIV activity and mechanisms of action of pure compounds isolated from *Rosa damascena*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *229*, 73–79.
- Mahomoodally, M.F., Korumtollee, H.N., and Chady, Z.Z.B.K. (2014). *Psiloxylon mauritianum* (Bouton ex Hook.f.) Baillon (Myrtaceae): A promising traditional medicinal plant from the Mascarene Islands. *J. Intercult. Ethnopharmacol.* *3*, 192–195.
- Manokaran, G., Finol, E., Wang, C., Gunaratne, J., Bahl, J., Ong, E.Z., Tan, H.C., Sessions, O.M., Ward, A.M., Gubler, D.J., et al. (2015). Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness. *Science* *350*, 217–221.
- Mansuy, J.M., Dutertre, M., Mengelle, C., Fourcade, C., Marchou, B., Delobel, P., Izopet, J., and Martin-Blondel, G. (2016). Zika virus: high infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen? *Lancet Infect. Dis.* *16*, 405.
- Marcondes, C.B., and Ximenes, M. de F.F. de M. (2016). Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes* (*Stegomyia*) mosquitoes. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* *49*, 4–10.
- Marimoutou, M., Le Sage, F., Smadja, J., Lefebvre d'Hellencourt, C., Gonthier, M.-P., and Robert-Da Silva, C. (2015). Antioxidant polyphenol-rich extracts from the medicinal plants *Antirhea borbonica*, *Doratoxylon apetalum* and *Gouania mauritiana* protect 3T3-L1 preadipocytes against H₂O₂, TNF α and LPS inflammatory mediators by regulating the

expression of superoxide dismutase and NF- κ B genes. *J. Inflamm. Lond. Engl.* *12*, 10.

Matos Lopes, T.R., de Oliveira, F.R., Malheiros, F.F., de Andrade, M.A., Monteiro, M.C., and Baetas Gonçalves, A.C. (2015). Antimicrobial bioassay-guided fractionation of a methanol extract of *Eupatorium triplinerve*. *Pharm. Biol.* *53*, 897–903.

Maves, R.C., Oré, R.M.C., Porter, K.R., and Kochel, T.J. (2010). Immunogenicity of a Psoralen-Inactivated Dengue Virus Type 1 Vaccine Candidate in Mice. *Clin. Vaccine Immunol.* *17*, 304–306.

McGovern, S.L., Caselli, E., Grigorieff, N., and Shoichet, B.K. (2002). A Common Mechanism Underlying Promiscuous Inhibitors from Virtual and High-Throughput Screening. *J. Med. Chem.* *45*, 1712–1722.

Meertens, L., Carnec, X., Lecoin, M.P., Ramdasi, R., Guivel-Benhassine, F., Lew, E., Lemke, G., Schwartz, O., and Amara, A. (2012). The TIM and TAM Families of Phosphatidylserine Receptors Mediate Dengue Virus Entry. *Cell Host Microbe* *12*, 544.

Meertens, L., Labeau, A., Dejarnac, O., Cipriani, S., Sinigaglia, L., Bonnet-Madin, L., Le Charpentier, T., Hafirassou, M.L., Zamborlini, A., Cao-Lormeau, V.-M., et al. (2017). Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Rep.* *18*, 324–333.

Melo, A.S., Monteiro, M.C., da Silva, J.B., de Oliveira, F.R., Vieira, J.L.F., de Andrade, M.A., Baetas, A.C., Sakai, J.T., Ferreira, F.A., Cunha Sousa, P.J. da, et al. (2013). Antinociceptive, neurobehavioral and antioxidant effects of *Eupatorium triplinerve* Vahl on rats. *J. Ethnopharmacol.* *147*, 293–301.

Merino-Ramos, T., Jiménez de Oya, N., Saiz, J.-C., and Martín-Acebes, M.A. (2017). Antiviral Activity of Nordihydroguaiaretic Acid and Its Derivative Tetra-O-Methyl Nordihydroguaiaretic Acid against West Nile Virus and Zika Virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* *61*.

Mesci, P., Macia, A., Moore, S.M., Shiryayev, S.A., Pinto, A., Huang, C.-T., Tejwani, L., Fernandes, I.R., Suarez, N.A., Kolar, M.J., et al. (2018). Blocking Zika virus vertical transmission. *Sci. Rep.* *8*, 1218.

Micewicz, E.D., Khachatoorian, R., French, S.W., and Ruchala, P. (2017). Identification of novel small-molecule inhibitors of Zika virus infection. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*

Miladi, S., Abid, N., Debarnôt, C., Damak, M., Canard, B., Aouni, M., and Selmi, B. (2012). In vitro antiviral activities of extracts derived from *Daucus maritimus* seeds. *Nat. Prod. Res.* *26*, 1027–1032.

Miller, J.L., deWet, B.J.M., Martinez-Pomares, L., Radcliffe, C.M., Dwek, R.A., Rudd, P.M., and Gordon, S. (2008). The Mannose Receptor Mediates Dengue Virus Infection of Macrophages. *PLoS Pathog.* *4*.

Min, B.S., Tomiyama, M., Ma, C.M., Nakamura, N., and Hattori, M. (2001). Kaempferol acetylramnosides from the rhizome of *Dryopteris crassirhizoma* and their inhibitory effects

on three different activities of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* *49*, 546–550.

Minker, C. (2007). La flore médicinale réunionnaise et le chikungunya. Thèse Exercice.

Mitchell, C. (2017). PAHO/WHO - Countries with local transmission | PAHO/WHO.

Mlakar, J., Korva, M., Tul, N., Popović, M., Poljšak-Prijatelj, M., Mraz, J., Kolenc, M., Resman Rus, K., Vesnaver Vipotnik, T., Fabjan Vodusek, V., et al. (2016). Zika Virus Associated with Microcephaly. *N. Engl. J. Med.* *374*, 951–958.

Moghaddam, E., Teoh, B.-T., Sam, S.-S., Lani, R., Hassandarvish, P., Chik, Z., Yueh, A., Abubakar, S., and Zandi, K. (2014). Baicalin, a metabolite of baicalein with antiviral activity against dengue virus. *Sci. Rep.* *4*, 5452.

Moller-Tank, S., and Maury, W. (2014). Phosphatidylserine receptors: enhancers of enveloped virus entry and infection. *Virology* *468–470*, 565–580.

Monath, T.P., and Vasconcelos, P.F.C. (2015). Yellow fever. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* *64*, 160–173.

Mootosamy, A., and Fawzi Mahomoodally, M. (2014). Ethnomedicinal application of native remedies used against diabetes and related complications in Mauritius. *J. Ethnopharmacol.* *151*, 413–444.

Mottin, M., Borba, J.V.V.B., Braga, R.C., Torres, P.H.M., Martini, M.C., Proenca-Modena, J.L., Judice, C.C., Costa, F.T.M., Ekins, S., Perryman, A.L., et al. (2018). The A-Z of Zika drug discovery. *Drug Discov. Today*.

Mounce, B.C., Cesaro, T., Moratorio, G., Hooikaas, P.J., Yakovleva, A., Werneke, S.W., Smith, E.C., Poirier, E.Z., Simon-Loriere, E., Prot, M., et al. (2016). Inhibition of Polyamine Biosynthesis Is a Broad-Spectrum Strategy against RNA Viruses. *J. Virol.* *90*, 9683–9692.

Mounce, B.C., Cesaro, T., Carrau, L., Vallet, T., and Vignuzzi, M. (2017). Curcumin inhibits Zika and chikungunya virus infection by inhibiting cell binding. *Antiviral Res.* *142*, 148–157.

Muhammad, A., Tel-Çayan, G., Öztürk, M., Duru, M.E., Nadeem, S., Anis, I., Ng, S.W., and Shah, M.R. (2016). Phytochemicals from *Dodonaea viscosa* and their antioxidant and anticholinesterase activities with structure–activity relationships. *Pharm. Biol.* *54*, 1649–1655.

Mukhopadhyay, S., Kuhn, R.J., and Rossmann, M.G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat. Rev. Microbiol.* *3*, 13–22.

Mumtaz, N., Jimmerson, L.C., Bushman, L.R., Kiser, J.J., Aron, G., Reusken, C.B.E.M., Koopmans, M.P.G., and van Kampen, J.J.A. (2017). Cell-line dependent antiviral activity of sofosbuvir against Zika virus. *Antiviral Res.* *146*, 161–163.

Musso, D., Nhan, T., Robin, E., Roche, C., Bierlaire, D., Zisou, K., Yan, A.S., Cao-Lormeau, V.M., and Broult, J. (2014). Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014.

Eurosurveillance 19, 20761.

Musso, D., Roche, C., Nhan, T.-X., Robin, E., Teissier, A., and Cao-Lormeau, V.-M. (2015a). Detection of Zika virus in saliva. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 68, 53–55.

Musso, D., Roche, C., Robin, E., Nhan, T., Teissier, A., and Cao-Lormeau, V.-M. (2015b). Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 359–361.

Naidoo, R., Patel, M., Gulube, Z., and Fenyvesi, I. (2012). Inhibitory activity of *Dodonaea viscosa* var. *angustifolia* extract against *Streptococcus mutans* and its biofilm. *J. Ethnopharmacol.* 144, 171–174.

Navarro-Sanchez, E., Altmeyer, R., Amara, A., Schwartz, O., Fieschi, F., Virelizier, J.-L., Arenzana-Seisdedos, F., and Desprès, P. (2003). Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep.* 4, 723.

Neergheen-Bhujun, V.S., Munogee, N., and Coolen, V. (2014). Antioxidant and anti-inflammatory efficacies of polyherbal formulations and elixirs traditionally used in Mauritius for the treatment of rheumatoid arthritis. *J. Herb. Med.* 4, 1–9.

Nerio, L.S., Olivero-Verbel, J., and Stashenko, E. (2010). Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresour. Technol.* 101, 372–378.

Newman, D.J., and Cragg, G.M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* 70, 461–477.

Niu, H.-M., Zeng, D.-Q., Long, C.-L., Peng, Y.-H., Wang, Y.-H., Luo, J.-F., Wang, H.-S., Shi, Y.-N., Tang, G.-H., and Zhao, F.-W. (2010). Clerodane diterpenoids and prenylated flavonoids from *Dodonaea viscosa*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 12, 7–14.

Nowakowski, T.J., Pollen, A.A., Di Lullo, E., Sandoval-Espinosa, C., Bershteyn, M., and Kriegstein, A.R. (2016). Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell* 18, 591–596.

Nutan, Modi, M., Goel, T., Das, T., Malik, S., Suri, S., Rawat, A.K.S., Srivastava, S.K., Tuli, R., Malhotra, S., et al. (2013). Ellagic acid & gallic acid from *Lagerstroemia speciosa* L. inhibit HIV-1 infection through inhibition of HIV-1 protease & reverse transcriptase activity. *Indian J. Med. Res.* 137, 540–548.

Oehler, E., Watrin, L., Larre, P., Leparac-Goffart, I., Lastere, S., Valour, F., Baudouin, L., Mallet, H., Musso, D., and Ghawche, F. (2014). Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* 19.

Ojo, O.O., Oluyeye, J.O., and Famurewa, O. (2009). Antiviral properties of two Nigerian plants. *Afr. J. Plant Sci.* 3, 157–159.

Okamoto, K., Kinoshita, H., Parquet, M.D.C., Raekiansyah, M., Kimura, D., Yui, K., Islam,

- M.A., Hasebe, F., and Morita, K. (2012). Dengue virus strain DEN2 16681 utilizes a specific glycochain of syndecan-2 proteoglycan as a receptor. *J. Gen. Virol.* *93*, 761–770.
- Olivier, W.J., Kilah, N.L., Horne, J., Bissember, A.C., and Smith, J.A. (2016). ent-Labdane Diterpenoids from *Dodonaea viscosa*. *J. Nat. Prod.* *79*, 3117–3126.
- Olivon, F., Palenzuela, H., Girard-Valenciennes, E., Neyts, J., Pannecouque, C., Roussi, F., Grondin, I., Leyssen, P., and Litaudon, M. (2015). Antiviral Activity of Flexibilane and Tiglane Diterpenoids from *Stillingia lineata*. *J. Nat. Prod.* *78*, 1119–1128.
- Olschläger, V., Schrader, A., and Hockertz, S. (2009). Comparison of primary human fibroblasts and keratinocytes with immortalized cell lines regarding their sensitivity to sodium dodecyl sulfate in a neutral red uptake cytotoxicity assay. *Arzneimittelforschung.* *59*, 146–152.
- Olson, J.G., Ksiazek, T.G., Suhandiman, null, and Triwibowo, null (1981). Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* *75*, 389–393.
- Orhan, D.D., Özçelik, B., Ozgen, S., and Ergun, F. (2010). Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiol. Res.* *165*, 496–504.
- Ortíz-López, F.J., Monteiro, M.C., González-Menéndez, V., Tormo, J.R., Genilloud, O., Bills, G.F., Vicente, F., Zhang, C., Roemer, T., Singh, S.B., et al. (2015). Cyclic colisporifungin and linear cavinafungins, antifungal lipopeptides isolated from *Colispora cavincola*. *J. Nat. Prod.* *78*, 468–475.
- Özçelik, B., Kartal, M., and Orhan, I. (2011). Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharm. Biol.* *49*, 396–402.
- Paixão, E.S., Barreto, F., Teixeira, M. da G., Costa, M. da C.N., and Rodrigues, L.C. (2016). History, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Zika: A Systematic Review. *Am. J. Public Health* *106*, 606.
- Pascoalino, B.S., Courtemanche, G., Cordeiro, M.T., Gil, L.H.V.G., and Freitas-Junior, L. (2016). Zika antiviral chemotherapy: identification of drugs and promising starting points for drug discovery from an FDA-approved library. *F1000Research* *5*, 2523.
- Patel, M., and Coogan, M.M. (2008). Antifungal activity of the plant *Dodonaea viscosa* var. *angustifolia* on *Candida albicans* from HIV-infected patients. *J. Ethnopharmacol.* *118*, 173–176.
- Patel, R.V., Shaeer, K.M., Patel, P., Garmaza, A., Wiangkham, K., Franks, R.B., Pane, O., and Carris, N.W. (2016). EPA-Registered Repellents for Mosquitoes Transmitting Emerging Viral Disease. *Pharmacotherapy* *36*, 1272–1280.
- Pellissier, A. (1954). [Serological investigation on the incidence of neurotropic viruses in French Equatorial Africa]. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* *47*, 223–227.
- Pengsuparp, T., Cai, L., Constant, H., Fong, H.H., Lin, L.Z., Kinghorn, A.D., Pezzuto, J.M., Cordell, G.A., Ingolfssdóttir, K., and Wagner, H. (1995). Mechanistic evaluation of new plant-

derived compounds that inhibit HIV-1 reverse transcriptase. *J. Nat. Prod.* *58*, 1024–1031.

Pereira, R.C., Silva, A.N.M.R., Souza, M.C.O., Silva, M.V., Neves, P.P.C.C., Silva, A.A.M.V., Matos, D.D.C.S., Herrera, M.A.O., Yamamura, A.M.Y., Freire, M.S., et al. (2015). An inactivated yellow fever 17DD vaccine cultivated in Vero cell cultures. *Vaccine* *33*, 4261–4268.

Perera-Lecoin, M., Meertens, L., Carnec, X., and Amara, A. (2013). Flavivirus entry receptors: an update. *Viruses* *6*, 69–88.

Périno, S., Pierson, J.T., Ruiz, K., Cravotto, G., and Chemat, F. (2016). Laboratory to pilot scale: Microwave extraction for polyphenols lettuce. *Food Chem.* *204*, 108–114.

Périno-Issartier, S., Zill-e-Huma, Abert-Vian, M., and Chemat, F. (2011). Solvent Free Microwave-Assisted Extraction of Antioxidants from Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) Food By-Products. *Food Bioprocess Technol.* *4*, 1020–1028.

Périno-Issartier, S., Ginies, C., Cravotto, G., and Chemat, F. (2013). A comparison of essential oils obtained from lavandin via different extraction processes: Ultrasound, microwave, turbohydrodistillation, steam and hydrodistillation. *J. Chromatogr. A* *1305*, 41–47.

Persaud, M., Martinez-Lopez, A., Buffone, C., Porcelli, S.A., and Diaz-Griffero, F. (2018). Infection by Zika viruses requires the transmembrane protein AXL, endocytosis and low pH. *Virology* *518*, 301–312.

Petersen, L.R., Brault, A.C., and Nasci, R.S. (2013). West Nile virus: review of the literature. *JAMA* *310*, 308–315.

Petersen, L.R., Jamieson, D.J., Powers, A.M., and Honein, M.A. (2016). Zika Virus. *N. Engl. J. Med.* *374*, 1552–1563.

Picot, M.C.N., and Mahomoodally, M.F. (2017). Effects of *Aphloia theiformis* on key enzymes related to diabetes mellitus. *Pharm. Biol.* *55*, 864–872.

Picot, M.C.N., Zengin, G., Mollica, A., Stefanucci, A., Carradori, S., and Mahomoodally, M.F. (2017a). In vitro and in silico Studies of Mangiferin from *Aphloia theiformis* on Key Enzymes Linked to Diabetes Type 2 and Associated Complications. *Med. Chem. Shariqah United Arab Emir.* *13*, 633–640.

Picot, M.C.N., Bender, O., Atalay, A., Zengin, G., Loffredo, L., Hadji-Minaglou, F., and Mahomoodally, M.F. (2017b). Multiple pharmacological targets, cytotoxicity, and phytochemical profile of *Aphloia theiformis* (Vahl.) Benn. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* *89*, 342–350.

Ping, K.Y., Darah, I., Chen, Y., and Sasidharan, S. (2013). Cytotoxicity and genotoxicity assessment of *Euphorbia hirta* in MCF-7 cell line model using comet assay. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* *3*, 692–696.

Pirzada, A.J., Shaikh, W., Usmanghani, K., and Mohiuddin, E. (2010). Antifungal activity of

Dodonaea viscosa Jacq extract on pathogenic fungi isolated from superficial skin infection. *Pak. J. Pharm. Sci.* 23, 337–340.

Pitts, J.D., Li, P.-C., de Wispelaere, M., and Yang, P.L. (2017). Antiviral activity of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide (4-HPR) against Zika virus. *Antiviral Res.* 147, 124–130.

Pouliot, M., and Jeanmart, S. (2016). Pan Assay Interference Compounds (PAINS) and Other Promiscuous Compounds in Antifungal Research. *J. Med. Chem.* 59, 497–503.

Poullain, C. (2004). Contribution à l'étude des plantes endémiques et indigènes de la Réunion, recherche d'activités biologiques et de principes actifs dans 75 plantes.

Poullain, C., Girard-Valenciennes, E., and Smadja, J. (2004). Plants from reunion island: evaluation of their free radical scavenging and antioxidant activities. *J. Ethnopharmacol.* 95, 19–26.

Prow, N.A., Liu, L., Nakayama, E., Cooper, T.H., Yan, K., Eldi, P., Hazlewood, J.E., Tang, B., Le, T.T., Setoh, Y.X., et al. (2018). A vaccinia-based single vector construct multi-pathogen vaccine protects against both Zika and chikungunya viruses. *Nat. Commun.* 9, 1230.

Quoc, L.P.T., and Muoi, N.V. (2016). Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from *Polygonum multiflorum* thunb. roots. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 15, 181–189.

Raekiansyah, M., Mori, M., Nonaka, K., Agoh, M., Shiomi, K., Matsumoto, A., and Morita, K. (2017). Identification of novel antiviral of fungus-derived brefeldin A against dengue viruses. *Trop. Med. Health* 45, 32.

Rangasamy, O., Raelison, G., Rakotoniriana, F.E., Cheuk, K., Urverg-Ratsimamanga, S., Quetin-Leclercq, J., Gurib-Fakim, A., and Subratty, A.H. (2007). Screening for anti-infective properties of several medicinal plants of the Mauritian flora. *J. Ethnopharmacol.* 109, 331–337.

Rangasamy, O., Mahomoodally, F.M., Gurib-Fakim, A., and Quetin-Leclercq, J. (2014). Two anti-staphylococcal triterpenoid acids isolated from *Psiloxylon mauritianum* (Bouton ex Hook.f.) Baillon, an endemic traditional medicinal plant of Mauritius. *South Afr. J. Bot.* 93, 198–203.

Rausch, K., Hackett, B.A., Weinbren, N.L., Reeder, S.M., Sadovsky, Y., Hunter, C.A., Schultz, D.C., Coyne, C.B., and Cherry, S. (2017). Screening Bioactives Reveals Nanchangmycin as a Broad Spectrum Antiviral Active against Zika Virus. *Cell Rep.* 18, 804–815.

Reis, L.C.B., Carneiro, L.M., Branco, C.R.C., and Branco, A. (2015). Comparison of Conventional Microwave and Focused Microwave-assisted Extraction to Enhance the Efficiency of the Extraction of Antioxidant Flavonols from *Jocote* Pomace (*Spondias purpurea* L.). *Plant Foods Hum. Nutr. Dordr. Neth.* 70, 160–169.

Reyes-Del Valle, J., Chávez-Salinas, S., Medina, F., and Del Angel, R.M. (2005). Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J. Virol.* 79, 4557–4567.

Reznik, S.E., and Ashby, C.R. (2017). Sofosbuvir: an antiviral drug with potential efficacy against Zika infection. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* 55, 29–30.

Richard, A.S., Shim, B.-S., Kwon, Y.-C., Zhang, R., Otsuka, Y., Schmitt, K., Berri, F., Diamond, M.S., and Choe, H. (2017). AXL-dependent infection of human fetal endothelial cells distinguishes Zika virus from other pathogenic flaviviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 2024–2029.

Roth, A., Mercier, A., Lepers, C., Hoy, D., Duituturaga, S., Benyon, E., Guillaumot, L., and Souares, Y. (2014). Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections - an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012-2014. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* 19.

Rothan, H.A., Zulqarnain, M., Ammar, Y.A., Tan, E.C., Rahman, N.A., and Yusof, R. (2014). Screening of antiviral activities in medicinal plants extracts against dengue virus using dengue NS2B-NS3 protease assay. *Trop. Biomed.* 31, 286–296.

Sacramento, C.Q., de Melo, G.R., de Freitas, C.S., Rocha, N., Hoelz, L.V.B., Miranda, M., Fintelman-Rodrigues, N., Marttorelli, A., Ferreira, A.C., Barbosa-Lima, G., et al. (2017). The clinically approved antiviral drug sofosbuvir inhibits Zika virus replication. *Sci. Rep.* 7, 40920.

Şahin, S., Samli, R., Tan, A.S.B., Barba, F.J., Chemat, F., Cravotto, G., and Lorenzo, J.M. (2017). Solvent-Free Microwave-Assisted Extraction of Polyphenols from Olive Tree Leaves: Antioxidant and Antimicrobial Properties. *Mol. Basel Switz.* 22.

Salas-Benito, J., Reyes-Del Valle, J., Salas-Benito, M., Ceballos-Olvera, I., Mosso, C., and del Angel, R.M. (2007). Evidence that the 45-kD glycoprotein, part of a putative dengue virus receptor complex in the mosquito cell line C6/36, is a heat-shock related protein. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 283–290.

Salinas, J.L., Walteros, D.M., Styczynski, A., Garzón, F., Quijada, H., Bravo, E., Chaparro, P., Madero, J., Acosta-Reyes, J., Ledermann, J., et al. (2017). Zika virus disease-associated Guillain-Barré syndrome-Barranquilla, Colombia 2015-2016. *J. Neurol. Sci.* 381, 272–277.

Salinas-Sánchez, D.O., Herrera-Ruiz, M., Pérez, S., Jiménez-Ferrer, E., and Zamilpa, A. (2012). Anti-inflammatory activity of hautriwaic acid isolated from *Dodonaea viscosa* leaves. *Mol. Basel Switz.* 17, 4292–4299.

Salinas-Sánchez, D.O., Zamilpa, A., Pérez, S., Herrera-Ruiz, M., Tortoriello, J., González-Cortazar, M., and Jiménez-Ferrer, E. (2015). Effect of Hautriwaic Acid Isolated from *Dodonaea viscosa* in a Model of Kaolin/Carrageenan-Induced Monoarthritis. *Planta Med.* 81, 1240–1247.

Samoisy, A.K., and 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.

Samoisy, A.K., and Mahomoodally, M.F. (2015). Ethnopharmacological analysis of

medicinal plants used against non-communicable diseases in Rodrigues Island, Indian Ocean. *J. Ethnopharmacol.* *173*, 20–38.

Sanofi (2017). Sanofi - Sanofi actualise l'information concernant son vaccin contre la dengue - Sanofi.

Santos, F.J.B.D., Moura, D.J., Péres, V.F., Sperotto, A.R. de M., Caramão, E.B., Cavalcante, A.A. de C.M., and Saffi, J. (2012). Genotoxic and mutagenic properties of *Bauhinia platyptala* extract, a traditional Brazilian medicinal plant. *J. Ethnopharmacol.* *144*, 474–482.

Septembre-Malaterre, A., Le Sage, F., Hatia, S., Catan, A., Janci, L., and Gonthier, M.-P. (2016). Curcuma longa polyphenols improve insulin-mediated lipid accumulation and attenuate proinflammatory response of 3T3-L1 adipose cells during oxidative stress through regulation of key adipokines and antioxidant enzymes. *BioFactors Oxf. Engl.* *42*, 418–430.

Shaheen, M., Borsanyiova, M., Mostafa, S., Chawla-Sarkar, M., Bopegamage, S., and El-Esnawy, N. (2015). In vitro effect of *Dodonaea viscosa* extracts on the replication of coxsackievirus B3 (Nancy) and rotavirus (SA-11). *J. Microbiol. Antimicrob. Agents* *1*.

Sharma, N., Murali, A., Singh, S.K., and Giri, R. (2017). Epigallocatechin gallate, an active green tea compound inhibits the Zika virus entry into host cells via binding the envelope protein. *Int. J. Biol. Macromol.* *104*, 1046–1054.

Shinohara, K., Kutsuna, S., Takasaki, T., Moi, M.L., Ikeda, M., Kotaki, A., Yamamoto, K., Fujiya, Y., Mawatari, M., Takeshita, N., et al. (2016). Zika fever imported from Thailand to Japan, and diagnosed by PCR in the urines. *J. Travel Med.* *23*.

Shiryaev, S.A., Mesci, P., Pinto, A., Fernandes, I., Sheets, N., Shresta, S., Farhy, C., Huang, C.-T., Strongin, A.Y., Muotri, A.R., et al. (2017). Repurposing of the anti-malaria drug chloroquine for Zika Virus treatment and prophylaxis. *Sci. Rep.* *7*, 15771.

Silva, M.C., Guerrero-Plata, A., Gilfoy, F.D., Garofalo, R.P., and Mason, P.W. (2007). Differential activation of human monocyte-derived and plasmacytoid dendritic cells by West Nile virus generated in different host cells. *J. Virol.* *81*, 13640–13648.

da Silva, N.S., Undurraga, E.A., Verro, A.T., and Nogueira, M.L. (2018). Comparison between the traditional (1997) and revised (2009) WHO classifications of dengue disease: a retrospective study of 30 670 patients. *Trop. Med. Int. Health* *TM IH*.

Simmonds, P., Becher, P., Bukh, J., Gould, E.A., Meyers, G., Monath, T., Muerhoff, S., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Smith, D.B., et al. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *J. Gen. Virol.* *98*, 2–3.

Simões, L.R., Maciel, G.M., Brandão, G.C., Kroon, E.G., Castilho, R.O., and Oliveira, A.B. (2011). Antiviral activity of *Distictella elongata* (Vahl) Urb. (Bignoniaceae), a potentially useful source of anti-dengue drugs from the state of Minas Gerais, Brazil. *Lett. Appl. Microbiol.* *53*, 602–607.

Sirohi, D., Chen, Z., Sun, L., Klose, T., Pierson, T.C., Rossmann, M.G., and Kuhn, R.J. (2016). The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science* *352*, 467–470.

Smadja, J., and Marodon, C. (2016). Le grand livres des Plantes médicinales de l'île de La Réunion Inscrites à la pharmacopée Française.

Smithburn, K.C., Hughes, T.P., Burke, A.W., Paul, J.H., Smithburn, K.C., Hughes, T.P., Burke-Doe, A., Paul, J.H., Hughes, T., Burke, W., et al. (1940). A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda.

Somanah, J., Aruoma, O.I., Gunness, T.K., Kowelssur, S., Dambala, V., Murad, F., Googoolye, K., Daus, D., Indelicato, J., Bourdon, E., et al. (2012). Effects of a short term supplementation of a fermented papaya preparation on biomarkers of diabetes mellitus in a randomized Mauritian population. *Prev. Med.* *54 Suppl*, S90-97.

Somanah, J., Bourdon, E., Rondeau, P., Bahorun, T., and Aruoma, O.I. (2014). Relationship between fermented papaya preparation supplementation, erythrocyte integrity and antioxidant status in pre-diabetics. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* *65*, 12–17.

Song, H., Qi, J., Haywood, J., Shi, Y., and Gao, G.F. (2016). Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *23*, 456–458.

Sprogøe, K., Staerk, D., Jäger, A.K., Adersen, A., Hansen, S.H., Witt, M., Landbo, A.-K.R., Meyer, A.S., and Jaroszewski, J.W. (2007). Targeted natural product isolation guided by HPLC-SPE-NMR: constituents of *Hubertia* species. *J. Nat. Prod.* *70*, 1472–1477.

Sreekeesoon, D.P., and Mahomoodally, M.F. (2014). Ethnopharmacological analysis of medicinal plants and animals used in the treatment and management of pain in Mauritius. *J. Ethnopharmacol.* *157*, 181–200.

Stewart, R.D., Bryant, S.N., and Sheffield, J.S. (2013). West Nile Virus Infection in Pregnancy. *Case Rep. Infect. Dis.* *2013*.

Stiasny, K., and Heinz, F.X. (2006). Flavivirus membrane fusion. *J. Gen. Virol.* *87*, 2755–2766.

Stramer, S.L., Fang, C.T., Foster, G.A., Wagner, A.G., Brodsky, J.P., and Dodd, R.Y. (2005). West Nile virus among blood donors in the United States, 2003 and 2004. *N. Engl. J. Med.* *353*, 451–459.

Su, C.M., Liao, C.L., Lee, Y.L., and Lin, Y.L. (2001). Highly sulfated forms of heparin sulfate are involved in japanese encephalitis virus infection. *Virology* *286*, 206–215.

Suroowan, S., and Mahomoodally, F. (2013). Complementary and alternative medicine use among Mauritian women. *Complement. Ther. Clin. Pract.* *19*, 36–43.

Suthar, M.S., Diamond, M.S., and Gale, M. (2013). West Nile virus infection and immunity. *Nat. Rev. Microbiol.* *11*, 115–128.

Tai Technologies (2018). CO2 supercritique.

Tambyah, P.A., Koay, E.S.C., Poon, M.L.M., Lin, R.V.T.P., Ong, B.K.C., and Transfusion-

Transmitted Dengue Infection Study Group (2008). Dengue hemorrhagic fever transmitted by blood transfusion. *N. Engl. J. Med.* *359*, 1526–1527.

Tan, C.W., Sam, I.-C., Chong, W.L., Lee, V.S., and Chan, Y.F. (2017). Polysulfonate suramin inhibits Zika virus infection. *Antiviral Res.* *143*, 186–194.

Tan, P.C., Rajasingam, G., Devi, S., and Omar, S.Z. (2008). Dengue Infection in Pregnancy: Prevalence, Vertical Transmission, and Pregnancy Outcome. *Obstet. Gynecol.* *111*, 1111.

Tan, S.K.*, Phippen, R., Rohana Yusof, Noorsaadah Abd Rahman, Halijah Ibrahim, and Norzulaani Khalid (2006). Screening of selected Zingiberaceae extracts for dengue-2 virus protease inhibitory activities. *Sunway Acad. J.* *3*, 1–7.

Tang, H., Hammack, C., Ogden, S.C., Wen, Z., Qian, X., Li, Y., Yao, B., Shin, J., Zhang, F., Lee, E.M., et al. (2016). Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell* *18*, 587–590.

Tang, L.I.C., Ling, A.P.K., Koh, R.Y., Chye, S.M., and Voon, K.G.L. (2012). Screening of anti-dengue activity in methanolic extracts of medicinal plants. *BMC Complement. Altern. Med.* *12*, 3.

Tantely, M.L., Goodman, S.M., Rakotondranaivo, T., and Boyer, S. (2016). Review of West Nile virus circulation and outbreak risk in Madagascar: Entomological and ornithological perspectives. *Parasite* *23*.

Tappe, D., Pérez-Girón, J.V., Zammarchi, L., Rissland, J., Ferreira, D.F., Jaenisch, T., Gómez-Medina, S., Günther, S., Bartoloni, A., Muñoz-Fontela, C., et al. (2016). Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* *205*, 269.

Tauber, E., Kollaritsch, H., Korinek, M., Rendi-Wagner, P., Jilma, B., Firbas, C., Schranz, S., Jong, E., Klingler, A., Dewasthaly, S., et al. (2007). Safety and immunogenicity of a Vero-cell-derived, inactivated Japanese encephalitis vaccine: a non-inferiority, phase III, randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* *370*, 1847–1853.

Tebas, P., Roberts, C.C., Muthumani, K., Reuschel, E.L., Kudchodkar, S.B., Zaidi, F.I., White, S., Khan, A.S., Racine, T., Choi, H., et al. (2017). Safety and Immunogenicity of an Anti-Zika Virus DNA Vaccine - Preliminary Report. *N. Engl. J. Med.*

Teixeira, R.R., Pereira, W.L., Oliveira, A.F.C. da S., da Silva, A.M., de Oliveira, A.S., da Silva, M.L., da Silva, C.C., and de Paula, S.O. (2014). Natural products as source of potential dengue antivirals. *Mol. Basel Switz.* *19*, 8151–8176.

Theiler, M., and Smith, H.H. (1937a). The effect of prolonged cultivation in vitro upon the pathogenicity of yellow fever virus. *J. Exp. Med.* *65*, 767–786.

Theiler, M., and Smith, H.H. (1937b). The Use of Yellow Fever Virus Modified by in Vitro Cultivation for Human Immunization. *J. Exp. Med.* *65*, 787–800.

Thongtan, T., Wikan, N., Wintachai, P., Rattananungsan, C., Srisomsap, C., Cheepsunthorn,

- P., and Smith, D.R. (2012). Characterization of putative Japanese encephalitis virus receptor molecules on microglial cells. *J. Med. Virol.* *84*, 615–623.
- Tiwari, S., Singh, R.K., Tiwari, R., and Dhole, T.N. (2012). Japanese encephalitis: a review of the Indian perspective. *Braz. J. Infect. Dis. Off. Publ. Braz. Soc. Infect. Dis.* *16*, 564–573.
- Tognarelli, J., Ulloa, S., Villagra, E., Lagos, J., Aguayo, C., Fasce, R., Parra, B., Mora, J., Becerra, N., Lagos, N., et al. (2016). A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. *Arch. Virol.* *161*, 665–668.
- Tong, X., Smith, J., Bukreyeva, N., Koma, T., Manning, J.T., Kalkeri, R., Kwong, A.D., and Paessler, S. (2018). Merimepodib, an IMPDH inhibitor, suppresses replication of Zika virus and other emerging viral pathogens. *Antiviral Res.* *149*, 34–40.
- Touret, F., Gilles, M., Klitting, R., Aubry, F., de Lamballerie, X., and Nougairède, A. (2018). Live Zika virus chimeric vaccine candidate based on a yellow fever 17-D attenuated backbone. *Emerg. Microbes Infect.* *7*, 161.
- Tritsch, D., Zinglé, C., Rohmer, M., and Grosdemange-Billiard, C. (2015). Flavonoids: True or promiscuous inhibitors of enzyme? The case of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase. *Bioorganic Chem.* *59*, 140–144.
- Unni, S.K., Růžek, D., Chhatbar, C., Mishra, R., Johri, M.K., and Singh, S.K. (2011). Japanese encephalitis virus: from genome to infectome. *Microbes Infect.* *13*, 312–321.
- Upadhyay, A.K., Cyr, M., Longenecker, K., Tripathi, R., Sun, C., and Kempf, D.J. (2017). Crystal structure of full-length Zika virus NS5 protein reveals a conformation similar to Japanese encephalitis virus NS5. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* *73*, 116–122.
- Ürményi, F.G.G., Saraiva, G. do N., Casanova, L.M., Matos, A.D.S., de Magalhães Camargo, L.M., Romanos, M.T.V., and Costa, S.S. (2016). Anti-HSV-1 and HSV-2 Flavonoids and a New Kaempferol Triglycoside from the Medicinal Plant *Kalanchoe daigremontiana*. *Chem. Biodivers.* *13*, 1707–1714.
- Vázquez-Calvo, Á., Jiménez de Oya, N., Martín-Acebes, M.A., Garcia-Moruno, E., and Saiz, J.-C. (2017). Antiviral Properties of the Natural Polyphenols Delphinidin and Epigallocatechin Gallate against the Flaviviruses West Nile Virus, Zika Virus, and Dengue Virus. *Front. Microbiol.* *8*, 1314.
- Veerapur, V.P., Prabhakar, K.R., Kandadi, M.R., Srinivasan, K.K., and Unnikrishnan, M.K. (2010a). Antidiabetic effect of *Dodonaea viscosa* aerial parts in high fat diet and low dose streptozotocin-induced type 2 diabetic rats: a mechanistic approach. *Pharm. Biol.* *48*, 1137–1148.
- Veerapur, V.P., Prabhakar, K.R., Thippeswamy, B.S., Bansal, P., Srinivasan, K.K., and Unnikrishnan, M.K. (2010b). Antidiabetic effect of *Dodonaea viscosa* (L). Lacq. aerial parts in high fructose-fed insulin resistant rats: a mechanism based study. *Indian J. Exp. Biol.* *48*, 800–810.

Vega-Almeida, T.O., Salas-Benito, M., De Nova-Ocampo, M.A., Del Angel, R.M., and Salas-Benito, J.S. (2013). Surface proteins of C6/36 cells involved in dengue virus 4 binding and entry. *Arch. Virol.* *158*, 1189–1207.

Venturi, G., Zammarchi, L., Fortuna, C., Remoli, M.E., Benedetti, E., Fiorentini, C., Trotta, M., Rizzo, C., Mantella, A., Rezza, G., et al. (2016). An autochthonous case of Zika due to possible sexual transmission, Florence, Italy, 2014. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* *21*, 30148.

Verma, R., Khanna, P., and Chawla, S. (2014). Yellow fever vaccine: an effective vaccine for travelers. *Hum. Vaccines Immunother.* *10*, 126–128.

Vissoci, J.R.N., Rocha, T.A.H., Silva, N.C. da, Queiroz, R.C. de S., Thomaz, E.B.A.F., Amaral, P.V.M., Lein, A., Branco, M. dos R.F.C., Junior, J.A., Rodrigues, Z.M.R., et al. (2018). Zika virus infection and microcephaly: Evidence regarding geospatial associations. *PLoS Negl. Trop. Dis.* *12*, e0006392.

Wabo, H.K., Chabert, P., Tane, P., Noté, O., Tala, M.F., Peluso, J., Muller, C., Kikuchi, H., Oshima, Y., and Lobstein, A. (2012). Labdane-type diterpenes and flavones from *Dodonaea viscosa*. *Fitoterapia* *83*, 859–863.

Wang, B., Tan, X.-F., Thurmond, S., Zhang, Z.-M., Lin, A., Hai, R., and Song, J. (2017a). The structure of Zika virus NS5 reveals a conserved domain conformation. *Nat. Commun.* *8*, 14763.

Wang, C., Yang, S.N.Y., Smith, K., Forwood, J.K., and Jans, D.A. (2017b). Nuclear import inhibitor N-(4-hydroxyphenyl) retinamide targets Zika virus (ZIKV) nonstructural protein 5 to inhibit ZIKV infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *493*, 1555–1559.

Wang, H., Li, Z., Niu, J., Xu, Y., Ma, L., Lu, A., Wang, X., Qian, Z., Huang, Z., Jin, X., et al. (2018). Antiviral effects of ferric ammonium citrate. *Cell Discov.* *4*.

Wang, J.N., Hou, C.Y., Liu, Y.L., Lin, L.Z., Gil, R.R., and Cordell, G.A. (1994). Swertifrancheside, an HIV-reverse transcriptase inhibitor and the first flavone-xanthone dimer, from *Swertia franchetiana*. *J. Nat. Prod.* *57*, 211–217.

Wang, P., Hu, K., Luo, S., Zhang, M., Deng, X., Li, C., Jin, W., Hu, B., He, S., Li, M., et al. (2016). DC-SIGN as an attachment factor mediates Japanese encephalitis virus infection of human dendritic cells via interaction with a single high-mannose residue of viral E glycoprotein. *Virology* *488*, 108–119.

Wang, W.-X., Qian, J.-Y., Wang, X.-J., Jiang, A.-P., and Jia, A.-Q. (2014). Anti-HIV-1 activities of extracts and phenolics from *Smilax china* L. *Pak. J. Pharm. Sci.* *27*, 147–151.

Wang, Z.-Y., Wang, Z., Zhen, Z.-D., Feng, K.-H., Guo, J., Gao, N., Fan, D.-Y., Han, D.-S., Wang, P.-G., and An, J. (2017c). Axl is not an indispensable factor for Zika virus infection in mice. *J. Gen. Virol.* *98*, 2061–2068.

Watrin, L., Ghawché, F., Larre, P., Neau, J.-P., Mathis, S., and Fournier, E. (2016). Guillain-Barré Syndrome (42 Cases) Occurring During a Zika Virus Outbreak in French Polynesia.

Medicine (Baltimore) 95, e3257.

Weber, C., Sliva, K., von Rhein, C., Kümmerer, B.M., and Schnierle, B.S. (2015). The green tea catechin, epigallocatechin gallate inhibits chikungunya virus infection. *Antiviral Res.* 113, 1–3.

Weinbren, M.P., and Williams, M.C. (1958). Zika virus: further isolations in the Zika area, and some studies on the strains isolated. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 52, 263–268.

WHO (2015). Japanese encephalitis.

WHO (2018a). Dengue and severe dengue.

WHO (2018b). Yellow fever.

Wichit, S., Hamel, R., Bernard, E., Talignani, L., Diop, F., Ferraris, P., Liegeois, F., Ekchariyawat, P., Luplertlop, N., Surasombatpattana, P., et al. (2017). Imipramine Inhibits Chikungunya Virus Replication in Human Skin Fibroblasts through Interference with Intracellular Cholesterol Trafficking. *Sci. Rep.* 7, 3145.

Wong, G., He, S., Siragam, V., Bi, Y., Mbikay, M., Chretien, M., and Qiu, X. (2017). Antiviral activity of quercetin-3- β -O-D-glucoside against Zika virus infection. *Viol. Sin.* 32, 545–547.

Wong, P.-S.J., Li, M.I., Chong, C.-S., Ng, L.-C., and Tan, C.-H. (2013). *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse): a potential vector of Zika virus in Singapore. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2348.

Wu, W., Li, R., Li, X., He, J., Jiang, S., Liu, S., and Yang, J. (2015). Quercetin as an Antiviral Agent Inhibits Influenza A Virus (IAV) Entry. *Viruses* 8.

Xie, X., Kum, D.B., Xia, H., Luo, H., Shan, C., Zou, J., Muruato, A.E., Medeiros, D.B.A., Nunes, B.T.D., Dallmeier, K., et al. (2018). A Single-Dose Live-Attenuated Zika Virus Vaccine with Controlled Infection Rounds that Protects against Vertical Transmission. *Cell Host Microbe* 24, 487-499.e5.

Xu, H.-T., Hassounah, S.A., Colby-Germinario, S.P., Oliveira, M., Fogarty, C., Quan, Y., Han, Y., Golubkov, O., Ibanescu, I., Brenner, B., et al. (2017). Purification of Zika virus RNA-dependent RNA polymerase and its use to identify small-molecule Zika inhibitors. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 727–734.

Xu, M., Lee, E.M., Wen, Z., Cheng, Y., Huang, W.-K., Qian, X., Tcw, J., Kouznetsova, J., Ogden, S.C., Hammack, C., et al. (2016). Identification of small-molecule inhibitors of Zika virus infection and induced neural cell death via a drug repurposing screen. *Nat. Med.* 22, 1101–1107.

Yamaguchi, K., Honda, M., Ikigai, H., Hara, Y., and Shimamura, T. (2002). Inhibitory effects of (–)-epigallocatechin gallate on the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Antiviral Res.* 53, 19–34.

- Yang, C.-M., Cheng, H.-Y., Lin, T.-C., Chiang, L.-C., and Lin, C.-C. (2005). Acetone, ethanol and methanol extracts of *Phyllanthus urinaria* inhibit HSV-2 infection in vitro. *Antiviral Res.* *67*, 24–30.
- Yang, S., Xu, M., Lee, E.M., Gorshkov, K., Shiryayev, S.A., He, S., Sun, W., Cheng, Y.-S., Hu, X., Tharappel, A.M., et al. (2018). Emetine inhibits Zika and Ebola virus infections through two molecular mechanisms: inhibiting viral replication and decreasing viral entry. *Cell Discov.* *4*, 31.
- Yang, Z.-F., Bai, L.-P., Huang, W., Li, X.-Z., Zhao, S.-S., Zhong, N.-S., and Jiang, Z.-H. (2014). Comparison of in vitro antiviral activity of tea polyphenols against influenza A and B viruses and structure-activity relationship analysis. *Fitoterapia* *93*, 47–53.
- Yi, G., Xu, X., Abraham, S., Petersen, S., Guo, H., Ortega, N., Shankar, P., and Manjunath, N. (2017). A DNA Vaccine Protects Human Immune Cells against Zika Virus Infection in Humanized Mice. *EBioMedicine* *25*, 87–94.
- Yoosook, C., Bunyapraphatsara, N., Boonyakiat, Y., and Kantasuk, C. (2000). Anti-herpes simplex virus activities of crude water extracts of Thai medicinal plants. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* *6*, 411–419.
- Yun, S.-I., and Lee, Y.-M. (2014). Japanese encephalitis: the virus and vaccines. *Hum. Vaccines Immunother.* *10*, 263–279.
- Zandi, K., Teoh, B.-T., Sam, S.-S., Wong, P.-F., Mustafa, M.R., and AbuBakar, S. (2011). Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. *Viol. J.* *8*, 560.
- Zandi, K., Lim, T.-H., Rahim, N.-A., Shu, M.-H., Teoh, B.-T., Sam, S.-S., Danlami, M.-B., Tan, K.-K., and Abubakar, S. (2013). Extract of *Scutellaria baicalensis* inhibits dengue virus replication. *BMC Complement. Altern. Med.* *13*, 91.
- Zanluca, C., Melo, V.C.A. de, Mosimann, A.L.P., Santos, G.I.V. dos, Santos, C.N.D. dos, and Luz, K. (2015). First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* *110*, 569.
- Zhang, L.-B., Ji, J., Lei, C., Wang, H.-Y., Zhao, Q.-S., and Hou, A.-J. (2012a). Isoprenylated flavonoid and adipogenesis-promoting constituents of *Dodonaea viscosa*. *J. Nat. Prod.* *75*, 699–706.
- Zhang, T., Wu, Z., Du, J., Hu, Y., Liu, L., Yang, F., and Jin, Q. (2012b). Anti-Japanese-encephalitis-viral effects of kaempferol and daidzin and their RNA-binding characteristics. *PloS One* *7*, e30259.
- Zhang, Y., Wang, Z., Chen, H., Chen, Z., and Tian, Y. (2014). Antioxidants: potential antiviral agents for Japanese encephalitis virus infection. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* *24*, 30–36.
- Zhang, Z., Li, Y., Loh, Y.R., Phoo, W.W., Hung, A.W., Kang, C., and Luo, D. (2016). Crystal structure of unlinked NS2B-NS3 protease from Zika virus. *Science* *354*, 1597–1600.

- Zhao, B., Yi, G., Du, F., Chuang, Y.-C., Vaughan, R.C., Sankaran, B., Kao, C.C., and Li, P. (2017). Structure and function of the Zika virus full-length NS5 protein. *Nat. Commun.* 8, 14762.
- Zhao, C.-N., Zhang, J.-J., Li, Y., Meng, X., and Li, H.-B. (2018). Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from *Melastoma sanguineum* Fruit: Optimization and Identification. *Mol. Basel Switz.* 23.
- Zheng, M.S., and Lu, Z.Y. (1990). Antiviral effect of mangiferin and isomangiferin on herpes simplex virus. *Chin. Med. J. (Engl.)* 103, 160–165.
- Zhu, X.M., Song, J.X., Huang, Z.Z., Wu, Y.M., and Yu, M.J. (1993). [Antiviral activity of mangiferin against herpes simplex virus type 2 in vitro]. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 14, 452–454.
- Zhu, Y.-Z., Cao, M.-M., Wang, W.-B., Wang, W., Ren, H., Zhao, P., and Qi, Z.-T. (2012a). Association of heat-shock protein 70 with lipid rafts is required for Japanese encephalitis virus infection in Huh7 cells. *J. Gen. Virol.* 93, 61–71.
- Zhu, Y.-Z., Xu, Q.-Q., Wu, D.-G., Ren, H., Zhao, P., Lao, W.-G., Wang, Y., Tao, Q.-Y., Qian, X.-J., Wei, Y.-H., et al. (2012b). Japanese encephalitis virus enters rat neuroblastoma cells via a pH-dependent, dynamin and caveola-mediated endocytosis pathway. *J. Virol.* 86, 13407–13422.
- Zill-E-Huma, null, Abert Vian, M., Maingonnat, J.F., and Chemat, F. (2009). Clean recovery of antioxidant flavonoids from onions: optimising solvent free microwave extraction method. *J. Chromatogr. A* 1216, 7700–7707.
- Zmurko, J., Marques, R.E., Schols, D., Verbeken, E., Kaptein, S.J.F., and Neyts, J. (2016). The Viral Polymerase Inhibitor 7-Deaza-2'-C-Methyladenosine Is a Potent Inhibitor of In Vitro Zika Virus Replication and Delays Disease Progression in a Robust Mouse Infection Model. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004695.

Publications et participation à des congrès

Publications :

Gilles Gadea, Sandra Bos, Pascale Krejbich-trotot, Elodie Clain, Wildriss Viranaicken, Chaker El Kalamouni, Patrick Mavingui, Philippe Desprès. (2016), **“A robust method for the rapid generation of recombinant Zika virus expressing the GFP reporter gene.”**
Virology 497: 157-162

Elodie Clain, Laura Sinigaglia, Andrea Cristine Koishi, Olivier Gorgette, Gilles Gadea, Wildriss Viranaicken, Pascale Krejbich-Trotot, Patrick Mavingui, Philippe Desprès, Claudia Nunes Duarte dos Santos, Pascale Guiraud, Nolwenn Jouvenet, Chaker El Kalamouni. (2018), **“Extract from *Aphloia theiformis*, an edible indigenous plant from Reunion Island, impairs Zika virus attachment to the host cell surface.”**
Scientific reports 8 (1) : 10856

Elodie Clain, David Beal, Walid Rachidi, Ahcène Boumendjel, Pascale Guiraud, Chaker El Kalamouni. **“*Psiloxylon mauritianum* inhibits Zika virus entry.”** (en rédaction)

Communication par affiche:

Elodie Clain, Laura Sinigaglia, Andrea Cristine Koishi, Olivier Gorgette, Gilles Gadea, Wildriss Viranaicken, Pascale Krejbich-Trotot, Patrick Mavingui, Philippe Desprès, Claudia Nunes Duarte dos Santos, Pascale Guiraud, Nolwenn Jouvenet, Chaker El Kalamouni. **“*Aphloia theiformis* extract inhibits Zika virus entry through interaction with infectious particles.”**, International Conference on Biodiversity, Health and Food, **14-16 Décembre 2017**, Saint-Denis (Reunion Island).

Communication orale :

Elodie Clain, Laura Sinigaglia, Andrea Cristine Koishi, Olivier Gorgette, Gilles Gadea, Wildriss Viranaicken, Pascale Krejbich-Trotot, Patrick Mavingui, Philippe Desprès, Claudia Nunes Duarte dos Santos, Pascale Guiraud, Nolwenn Jouvenet, Chaker El Kalamouni. **“Extract from *Aphloia theiformis*, an edible indigenous plant from Reunion Island, impairs Zika virus attachment to the host cell surface.”** 7th International Congress on medicinal and aromatics plants (CIPAM), 25-28 Juin 2018, Toulouse (France)

Annexes

Annexe 1:



A robust method for the rapid generation of recombinant Zika virus expressing the GFP reporter gene



Gilles Gadea, Sandra Bos, Pascale Krejbich-Trotot, Elodie Clain, Wildriss Viranaicken, Chaker El-Kalamouni, Patrick Mavingui, Philippe Desprès*

Université de La Réunion, CNRS UMR 9192, INSERM U1187, IRD UMR 249, Unité Mixte 134 Processus Infectieux Insulaire Tropical (PIMIT), Plateforme Technologique CYROI, 97490 Sainte Clotilde, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 June 2016
Returned to author for revisions
13 July 2016
Accepted 18 July 2016

Keywords:

Arbovirus
Emerging disease
Flavivirus
Zika virus
Molecular clones
Recombinant virus
GFP reporter

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) infection is a major public health problem with severe human congenital and neurological anomalies. The screening of anti-ZIKV compounds and neutralizing antibodies needs reliable and rapid virus-based assays. Here, we described a convenient method leading to the rapid production of molecular clones of ZIKV. To generate a molecular clone of ZIKV strain MR766^{NIID}, the viral genome was directly assembled into Vero cells after introduction of four overlapping synthetic fragments that cover the full-length genomic RNA sequence. Such strategy has allowed the production of a recombinant ZIKV expressing the GFP reporter gene that is stable over two culturing rounds on Vero cells. Our data demonstrate that the ZIKV reporter virus is a very reliable GFP-based tool for analyzing viral growth and measuring the neutralizing antibody as well as rapid screening of antiviral effect of different classes of inhibitors.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Zika virus (ZIKV) is a mosquito-borne, enveloped RNA virus first discovered in Uganda in 1947 (Dick et al., 1952). ZIKV belongs to the *Flaviviridae* family, *Flavivirus* genus, and is related to medically important flaviviruses such as dengue (DENV), West Nile (WNV), yellow fever (YFV), and Japanese encephalitis (JEV) (Plourde and Boch, 2016; Musso and Gubler, 2016; Weaver et al., 2016). Flavivirus genomic RNA contains a single open reading frame, which is translated into a single large polyprotein that is subsequently cleaved into three structural proteins (C, prM/M and E) and seven non structural proteins NS1 to NS5 by cellular and viral proteases.

Until recently, ZIKV outbreaks were sporadic and self-limiting and ZIKV infection remained relatively less studied in view of its low case numbers as well as low clinical impact relative to other mosquito-borne flaviviruses. The first large epidemic was reported from Yap Island in 2007 followed by a major outbreak of its related disease, Zika fever, in French Polynesia in 2013 (Duffy et al., 2009; Roth et al., 2014). Since 2015, Brazil has become the epicenter of the current ZIKV epidemic, which has rapidly spread across the Americas and Caribbean (Gatherer and Kohl, 2015). It is now considered as major public health issue with the clusters of severe

congenital and neurological anomalies urging WHO to declare a Public Health Emergency of International Concern in 2016 (Sikka et al., 2016). Considering the significant increase in ZIKV threat, specific antiviral therapies and vaccines are urgently needed to control ZIKV-related diseases. The development of therapies for ZIKV requires both insights into the viral life cycle and strategies to identify potent antiviral inhibitors.

Virus reporter systems afford the ability to visualize and monitor viral expression inside the infected host cells (Ren et al., 2016). The development of flavivirus reverse technologies has allowed the construction of infectious full-length cDNA molecules containing reporter luciferase or green fluorescent protein (GFP) gene for both DENV and WNV (Pierson et al., 2005; Zou et al., 2011; Aubry et al., 2015). In the present study, we decided to generate a recombinant ZIKV expressing the reporter GFP gene using the reverse genetic method designed ISA (for Infectious-Subgenomic-Amplicons) (Aubry et al., 2014; De Wispelaere et al., 2015).

2. Results and discussion

To generate a molecular clone of ZIKV derived from Uganda 47 (MR766^{NIID}) strain, the full-length viral genome of 10,807 nucleotides was directly assembled into Vero cells after electroporation of the four overlapping synthetic fragments that encode

* Corresponding author.

E-mail address: philippe.despres@univ-reunion.fr (P. Desprès).

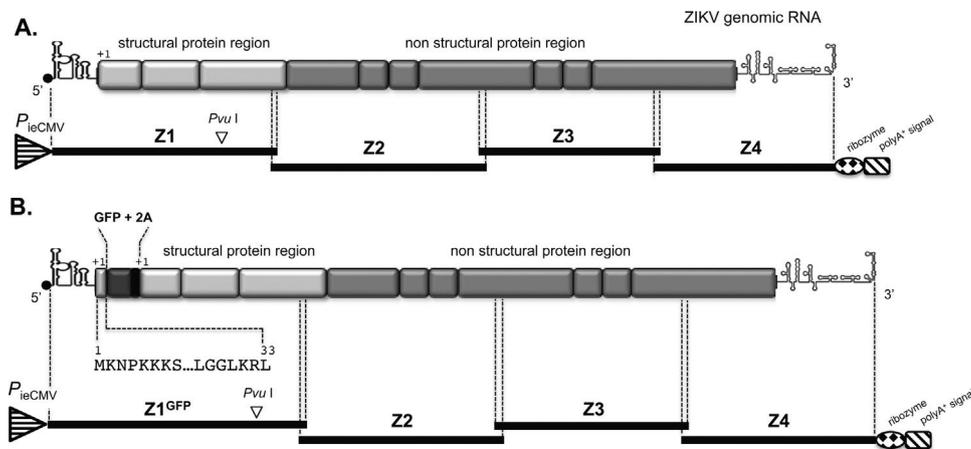


Fig. 1. Schematic representation of the strategy used to construct the molecular clone ZIKV-MR766^{NIID-MC} and its derived mutant ZIKV_{GFP}. Description of overlapping fragments Z1 (or Z1^{GFP}) to Z4 covering the full-length viral genomic RNA. The position of the unique *Pvu* I cleavage site located in the viral E gene is indicated. In (A), Z1 contains the CMV promoter upstream of the viral 5' NTR followed by the structural protein region. Z4 contains a ribozyme followed by a polyadenylation signal downstream of the viral 3' NTR. In (B), the Z1^{GFP} derived from Z1 contains the eGFP gene fused in frame to the first 33 amino acids of the ZIKV C protein. The 2A protease is immediately adjacent to the reporter eGFP gene. The eGFP-2A cassette is juxtaposed to the viral RNA sequence coding for the structural proteins starting with the first amino acid of C (+1) followed by the nonstructural proteins and ended by the 3'NTR.

the different parts of genomic RNA, according to the ISA method. The cDNA sequences have been previously amplified by PCR from plasmids in which synthetic fragments, quoted Z1 to Z4, were inserted (Fig. 1). Primers were designed so that the Z1 to Z4 fragments shared a sequence homology of 41 (Z1 and Z2), 39 (Z2 and Z3), and 34 (Z3 and Z4) nucleotides. The Z1 fragment contains the CMV promoter, which allows transcriptional initiation, immediately adjacent of the 5' non-translated region (NTR) followed by the structural protein region of MR766^{NIID} (Fig. 1A). A silent mutation at positions 1145–1150 located in the E gene that creates the unique restriction site *Pvu* I was introduced into the Z1 fragment. The Z4 fragment contains the hepatitis delta virus ribozyme followed by an SV40 poly(A) signal, which are juxtaposed to ZIKV 3' NTR (Fig. 1A). Five days post-electroporation, cell culture supernatant was collected and used to infect Vero cells in a first round of amplification (P1). Molecular clone of ZIKV-MR766^{NIID} (ZIKV-MR766^{NIID-MC}) was recovered 6 days later and amplified another 3 days on fresh Vero cells in order to grow final virus stocks P2 for further studies. A PCR fragment spanning the engineered *Pvu* I site into the E gene was amplified using RT-PCR from viral RNA (vRNA) extracted from ZIKV-MR766^{NIID-MC}. A similar PCR fragment derived from ZIKV strain PF-2013–18, which should be not cleavable by *Pvu* I, served as a negative control (Frumence et al., 2016). As shown in Fig. 2A, the RT-PCR product obtained from ZIKV-MR766^{NIID-MC}, but not ZIKV strain PF-2013–18, was readily cleaved by *Pvu* I indicating that it is a suitable genetic marker for the molecular clone of ZIKV strain MR-766. The infectivity of ZIKV-MR766^{NIID-MC} was determined by using a standard plaque-forming assay on Vero cells (Frumence et al., 2016). We noted that a majority of virus plaques was of large size (Fig. 2B). The P2 stock of ZIKV-MR766^{NIID-MC} grown on Vero cells reached an infectious titre up to 7.7 log PFU mL⁻¹. Viral growth was next studied on Vero cells infected at multiplicity of infection (MOI) of 1 (Fig. 2C). Virus progeny production increased by 1 log between 24 h and 48 h post-infection (p.i.) to reach almost 8 log PFU.mL⁻¹ showing that the replication of molecular clone ZIKV-MR766^{NIID-MC} was greatly efficient in Vero cells.

We decided to produce a GFP-expressing ZIKV derived from molecular clone ZIKV-MR766^{NIID} (Fig. 1B). We used a strategy in which a reporter protein is expressed as an additional part of the structural protein region of flavivirus and then excised from the viral polyprotein by the viral 2A protease factor (Zou et al., 2011; Zhang et al., 2016). To generate a viable reporter ZIKV, the plasmid

pZ1^{GFP} was derived from pZ1 in which the eGFP reporter gene followed by the sequence encoding the protease 2A factor were fused in frame with the amino acids C-1 to C-33 of ZIKV (Fig. 1B) (Zhang et al., 2016). The N-terminal region of the C protein from ZIKV is thought to comprise a potential circularization sequence that is essential for flavivirus RNA replication (Clyde et al., 2008). In the pZ1^{GFP}, the complete coding region of ZIKV-MR766^{NIID-MC} was immediately adjacent to the C-terminus of 2A protease that generates the authentic N-terminus of the C protein.

To generate the GFP-expressing mutant of ZIKV-MR766^{NIID-MC} named ZIKV_{GFP}, the recombinant viral genome of 11,587 nucleotides was directly assembled in Vero cells after electroporation of fragments Z1^{GFP}, Z2, Z3, and Z4. The production of P1 and P2 stocks of ZIKV_{GFP} was made as previously. The PCR fragment spanning the *Pvu* I site into the E gene of ZIKV_{GFP} was readily cleaved by *Pvu* I showing that GFP-expressing mutant of ZIKV-MR766^{NIID-MC} retained the genetic marker (Fig. 2A). We found that the infectious titre of ZIKV_{GFP} stock P2 (6 log PFU mL⁻¹) was 1.5 log lower as compared to ZIKV-MR766^{NIID-MC}. The plaque morphology of ZIKV_{GFP} was different to that of the parent with a phenotype of small plaques (Fig. 2B). We noted that infection of Vero cells with the P2 of ZIKV_{GFP} or ZIKV-MR766^{NIID-MC} at the MOI of 1 resulted in similar virus progeny production at 24 h and 48 h p.i. (Fig. 2C). A rapid generation of wild-type variants could explain the high viral titers of ZIKV_{GFP} observed at P3. The issue regarding the genetic stability of the GFP-expressing mutant of ZIKV-MR766^{NIID-MC} is addressed later in our study.

The expression of GFP in Vero cells infected 48 h with ZIKV_{GFP} at the MOI of 1 was first analyzed by immunofluorescence (IF) assays (Fig. 2D). Infected cells were treated with a low concentration of Triton X-100 (0.01%) leading to a permeabilization of the plasma membrane alone and then incubated with anti-flavivirus E mAb 4G2 (Mertens et al., 2010). There was a marked immunostaining of the E protein in the vicinity of the surface of ZIKV-infected cells (Fig. 2D, ZIKV E). The GFP expression was clearly visualized in Vero cells positive for the ZIKV E protein (Fig. 2D). To study the subcellular distribution of GFP, cells were treated with 0.1% Triton X-100 and then incubated with a specific antibody directed against the ER-resident protein calnexin (CNX). At 48 h p.i., the GFP signal was mainly visualized within a distinct, large dot-like structure in the vicinity of the ER compartment (Fig. 2D, CNX). In the context of viral polyprotein expressed by ZIKV_{GFP}, the 2A protease ensures the release of the adjacent fusion

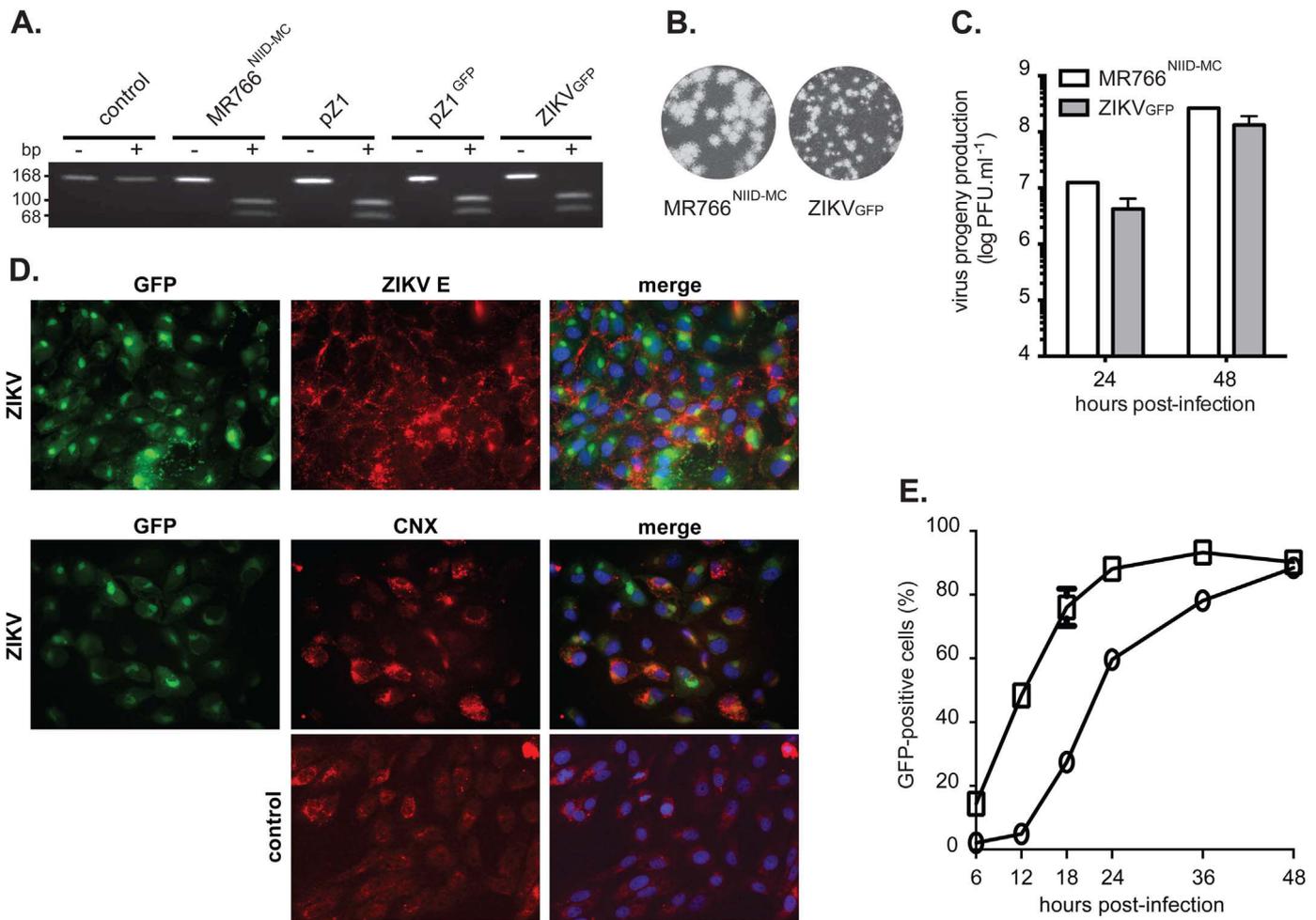


Fig. 2. Characterization of ZIKV-MR766^{NIID-MC} and ZIKV_{GFP}. *In (A)*, RNA was extracted from viral stocks and RT-PCR was performed to amplify a 168-nt fragment into the E gene surrounding the *Pvu I* cleavage site. The PCR products were subjected to digestion by *Pvu I* (+) or mock-treated (-). The wild-type ZIKV strain PF-2013-18 (control) served as a negative control for *Pvu I* cleavage. The expected sizes of the digestion products on a 2.2% agarose gel are indicated. *In (B)*, plaque morphology of ZIKV-MR766^{NIID-MC} and derived mutant ZIKV_{GFP} in Vero cells. *In (C)*, viral growth analysis on Vero cells. Cells were infected at the MOI of 1 and viral titers were determined at 24 h and 48 h p.i. *In (D)*, IF analysis of GFP expression in Vero cells infected with ZIKV_{GFP} or mock-infected (control). Fixed cells were treated 4 min with Triton X-100 at 0.01% (ZIKV E) or 0.1% (CNX) in PBS. The ZIKV E protein and the ER-marker CNX were immunostained with mAb 4G2 or anti-CNX antibody, respectively. Nuclei were stained with DAPI. The ZIKV E protein or CNX (red), eGFP fluorescence (green), and nuclei (blue) were visualized by fluorescence microscopy. The same magnification of $\times 40$ is used throughout. *In (E)*, time-course analysis of GFP expression in Vero cells infected with ZIKV_{GFP} at MOI of 0.1 (open circle) or 1 (open box). FACS analysis of GFP fluorescence was performed on PFA-fixed cells at various times p.i. Error bars indicate the standard deviations of experiments in triplicate. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

protein between the segment (C-1 to C-33) of ZIKV C protein and GFP. The possible association of the N-terminal charged amino acids of C with the cytoplasmic side of the ER membrane could explain the subcellular distribution of GFP in infected cells (Markoff et al., 1997).

We assessed the capacity of ZIKV_{GFP} to grow in human and mosquito cells (Suppl. Fig. S1). Given that South Pacific epidemic ZIKV strain PF-2013-18 exhibited a high level of replication in human epithelial A549 cells (Frumence et al., 2016), we investigated whether the GFP-expressing mutant of ZIKV-MR766^{NIID-MC} has capability to replicate in A549 cells by IF analysis. The GFP expression was readily detected in ZIKV_{GFP}-infected A549 cells (Suppl. Fig. S1). Immunostaining assay with anti-E mAb 4G2 confirmed that GFP is suitable for the monitoring of ZIKV infection in A549 cells (Suppl. Fig. S1). We next analyzed the GFP expression in *Aedes* mosquito C6/36 cells infected 48 h with ZIKV_{GFP} at the MOI of 1. IF analysis detected GFP expression in ZIKV_{GFP}-infected C6/36 cells (Suppl. Fig. S1). Together these results showed that the GFP-expressing mutant of ZIKV-MR766^{NIID-MC} is also a reliable tool for the monitoring of ZIKV replication in human and mosquito cells.

To further validate ZIKV_{GFP}, the kinetic of GFP expression was examined in Vero cells infected with low (0.1) and high (1.0) MOI (Fig. 2E). FACS analysis showed that percentage of GFP-positive Vero cells increased with the time of infection to reach a plateau at 24 h (high MOI) or 48 h (low MOI) p.i. We determined whether increase of GFP signal during the time course of ZIKV_{GFP} infection was associated to an increase in vRNA replication (Suppl. Fig. S2). The production of intracellular vRNA in ZIKV_{GFP}-infected Vero cells was analyzed by quantitative real-time RT-PCR (RT-qPCR) using primer pair specific to the ZIKV E gene or eGFP-2A cassette. The couple of primers targeting the E gene showed that production of vRNA was markedly increased in ZIKV_{GFP}-infected Vero cells since 18 h p.i. (Suppl. Fig. S2; left). Accumulation of intracellular vRNA was also verified using the eGFP-2A cassette primer pair. This is consistent with the assumption that the increase of GFP expression is attributable to an increased production of intracellular vRNA in ZIKV_{GFP}-infected Vero cells. Altogether, these results demonstrate that the GFP-expressing mutant of ZIKV-MR766^{NIID-MC} is a reliable tool to monitor viral growth in host cells infected by ZIKV.

Since ZIKV is sensitive to the antiviral effect of Type-I interferon (IFN) (Frumence et al., 2016), we evaluated the antiviral effect of

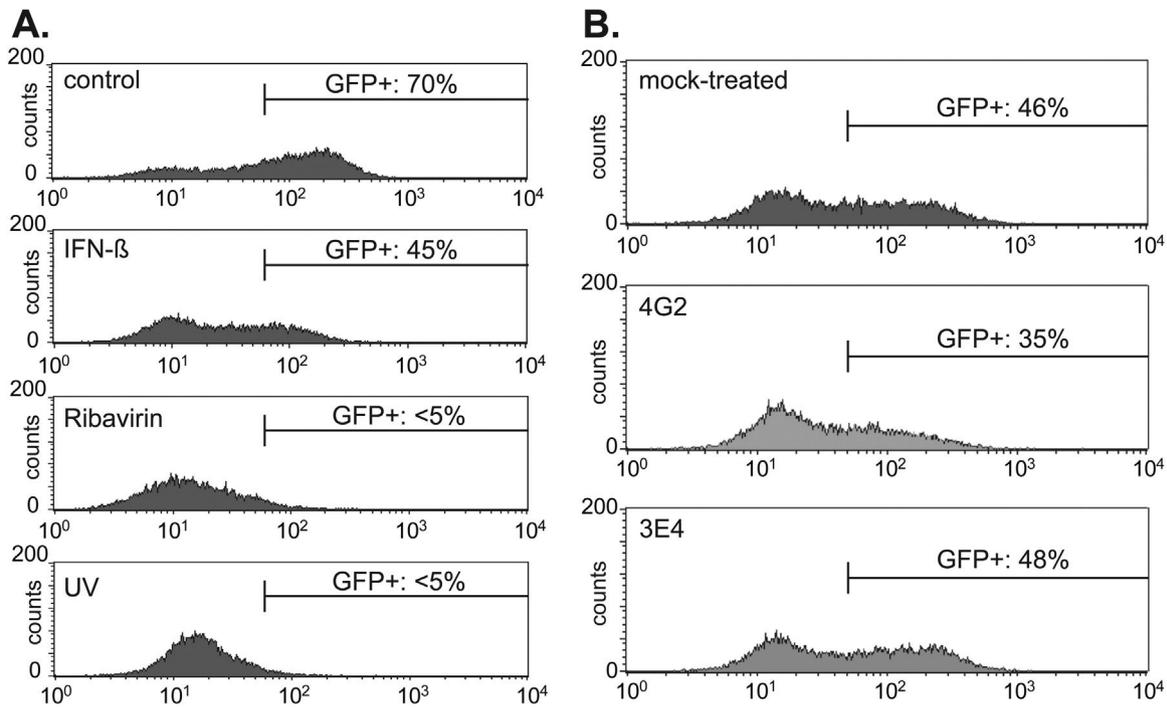


Fig. 3. Inhibition of ZIKV_{GFP} by IFN- β , ribavirin and neutralizing antibody. *In* (A), the GFP fluorescence in Vero cells infected 24 h with ZIKV_{GFP} was examined by FACS analysis. Vero cells were treated with 10^5 UI mL⁻¹ of IFN- β 2 h prior virus infection (MOI of 0.1) or 100 μ M ribavirin 2 h after virus exposure. UV-treated ZIKV_{GFP} served as a positive control. *In* (B), ZIKV_{GFP} was incubated 2 h with 10 μ g mL⁻¹ mAb 4G2 or anti-CHIK.E2 mAb 3E4 (negative control). Vero cells were infected 24 h with mixed virus-antibody and the GFP-positive cells were examined by FACS analysis.

IFN- β on ZIKV_{GFP} by FACS analysis (Fig. 3A). IFN- β treatment of Vero cells 2 h prior ZIKV_{GFP} infection resulted in a significant reduction of GFP-positive cells at 24 h p.i. (Fig. 3A). We next examined whether ZIKV_{GFP} was inhibited by the well-known antiviral inhibitor ribavirin as an analog of guanosine. At the high concentration of ribavirin (1 mM), the progeny production of ZIKV-MR766^{NIID-MC} was reduced at 24 h p.i. by 3 log confirming the potent antiviral effect of ribavirin against ZIKV (Zmurko et al., 2016). Addition of 100 μ M ribavirin 2 h after ZIKV_{GFP} exposure resulted in a basal expression level of GFP at 24 h p.i. (Fig. 3A). Furthermore, we tested the neutralizing activity of mouse *pan*-flavivirus E mAb 4G2 on ZIKV_{GFP} (Fig. 3B). For neutralization test, ZIKV_{GFP} (4.5 log PFU) was mixed with mAb 4G2 (10 μ g) for 2 h at 37 °C. The virus-antibody mix was assessed for GFP expression on Vero cells at 24 h p.i. The anti-Chikungunya E2 mAb 3E4 served as a negative control (Bréhin et al., 2008). Incubation of ZIKV_{GFP} with mAb 4G2 resulted in a reduction of GFP-positive Vero cells whereas 3E4 had no effect (Fig. 3B). Altogether, these results showed that ZIKV_{GFP} could be used as GFP-based assay to measure antiviral activity of different classes of inhibitors as well as capturing of neutralizing anti-ZIKV antibodies.

We mentioned earlier the possibility that GFP-expressing mutant of ZIKV-MR766^{NIID-MC} was unstable after a limited number of passages on Vero cells. First, we can exclude the possibility that the recovered ZIKV_{GFP} represented contamination with the wild-type fragment Z1 since the purified PCR product Z1^{GFP} was detected alone (Supplemental Fig. S3). To further the investigation, we decided to perform a continuous culturing ZIKV_{GFP} on Vero cells on four rounds, P1 to P4 (3–4 days by round), P1 being considered as the first viral stock after recovering the viral supernatants from Vero cells in which the fragments Z1^{GFP} to Z4 were introduced. To evaluate the stability of GFP gene, viral supernatants were collected after each round. These supernatants were used to infect Vero cells and the GFP fluorescence was tested by FACS analysis. As shown in Fig. 4A, the number of GFP-expressing cells was dramatically reduced from P3. RT-PCR analysis confirmed

that the eGFP gene was excluded from ZIKV-MR766^{NIID-MC} genomic RNA from P3 (Fig. 4B). Thus, the P2 stock of ZIKV_{GFP} is a powerful GFP-based assay for monitoring viral replication inside the infected cells.

Recently, Shan et al. (2016) described an infectious cDNA clone of ZIKV and derived mutant with a luciferase gene reporter. In the present study, we demonstrated that the ISA method is a very well suited genetic inverse method allowing the rapid implementation of molecular clones of ZIKV. Furthermore, we have easily generated a recombinant live ZIKV expressing GFP with a genomic stability on at least two passages on Vero cells. We demonstrated that our mutant ZIKV_{GFP} is suitable for the study of the dynamics of viral replication within the host cells as well as screening of neutralizing antibodies and antiviral compounds. We believe that both ZIKV-MR766^{NIID-MC} and ZIKV_{GFP} are reliable tools for further investigation on viral determinants that contribute to the pathological effects of ZIKV infection. Such molecular clones of ZIKV will be helpful to the understanding of severe congenital brain malformations and neurological manifestations in humans (Cao-Lor-meau et al., 2016; Quick et al., 2016).

3. Methods

3.1. Cells and reagents

Vero cells (ATCC, CCL-81) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS). Interferon- β was purchased from Peprotech. Ribavirin was purchased from Sigma. The mouse anti-*pan* flavivirus envelope E protein mAb 4G2 and anti-CHIK. E2 mAb 3E4 were produced and purified by RD Biotech (Besançon, France). The rabbit anti-calnexin antibody was purchased from Santa-Cruz. Donkey anti-mouse Alexa Fluor 594 IgG (H+L) antibody was purchased from Invitrogen.

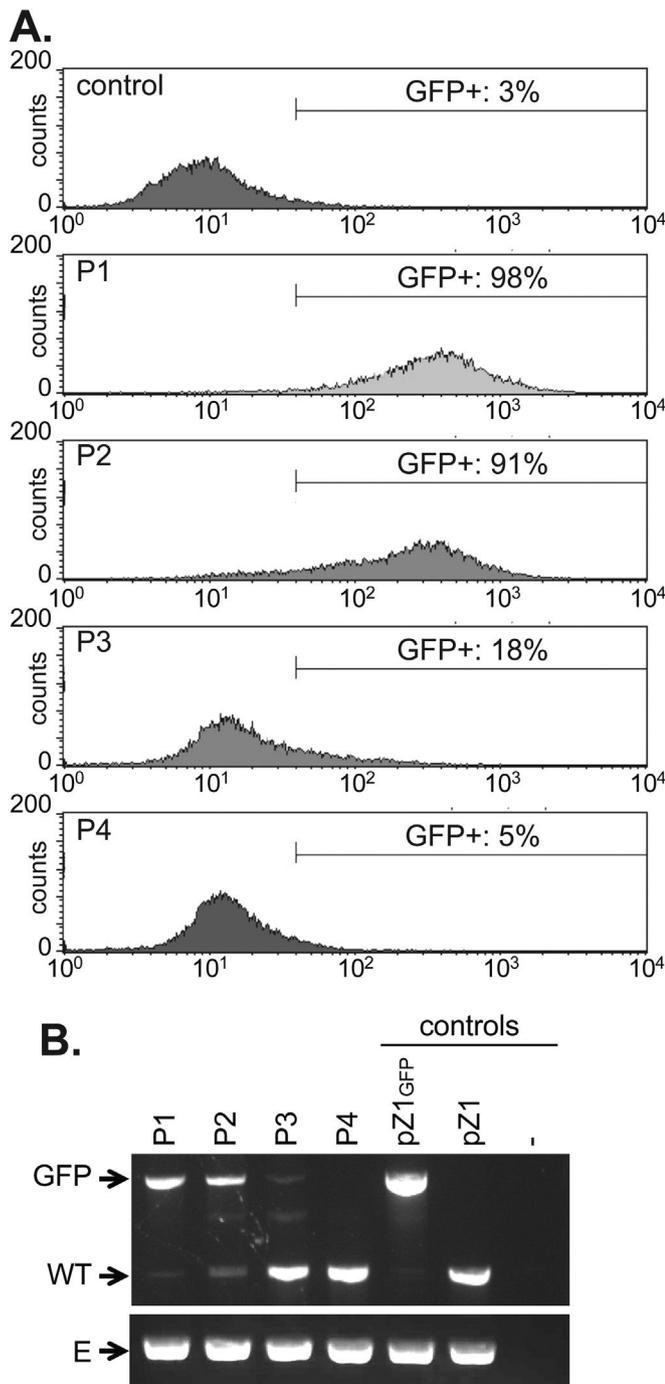


Fig. 4. Stability of GFP reporter gene in ZIKV_{GFP}. In (A), ZIKV_{GFP} was serially passaged on Vero cells and viral supernatants recovered from P1 to P4 were tested for GFP fluorescence 24 h p.i. by FACS analysis. In (B), viral RNA was extracted from viral supernatant recovered from P1 to P4 and RT-PCR was performed with a couple of primers surrounding the eGFP-2A cassette. As controls of fragment sizes, plasmids pZ1 and pZ1-GFP were amplified by PCR using the same primer pair. As a positive control, RT-PCR assay on viral RNA was performed with primers locating at the E gene. The PCR products were analyzed on 0.8% (GFP/WT) or 2% (E) agarose gels.

3.2. Molecular clone design of ZIKV

The construction of molecular clone ZIKV-MR766^{NIID} was based on the sequence of ZIKV strain MR766 Uganda 47-NIID (Genbank access # LC002520) using the ISA method allowing the rapid generation of molecular clones of flaviviruses (Aubry et al., 2014; De Wispelaere et al., 2015). Four synthetic genes Z1 to Z4 covering

the full-length genome of ZIKV strain MR766-NIID were synthesized and cloned into plasmid pUC57 by GeneCust (Luxembourg). The first synthetic fragment (Z1) was designed to contain the ZIKV structural proteins. A cytomegalovirus (CMV) promoter sequence driving the expression of viral fragment from nucleotides 1–2252 of genomic RNA was included in Z1. The three other synthetic genes comprised the portions of the genome coding for the non-structural proteins from nucleotides 2210–5616 (Z2), 5577–8201 (Z3) and 8167–10,801 (Z4) (Fig. 1A). Also, Z4 contained the complete 3' UTR sequence of ZIKV strain MR766-NIID immediately adjacent to the hepatitis delta virus ribozyme and was followed by a simian virus 40 polyadenylation sequence. The Z1 to Z4 sequences cloned into their respective plasmids, pZ1 to pZ4, were amplified by PCR using Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Scientific) and primer pairs, which are listed in Supplemental Table 1. The PCR program is the following: initial PCR activation step at 98 °C (30 s), 35 cycles of denaturation at 98 °C (10 s), annealing at 60 °C (20 s) and elongation at 72 °C (2 min), ended by final elongation step at 72 °C (5 min). The PCR products were purified using RNA mini spin purification kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions.

The molecular strategy allowing the insertion of a reporter gene in the flavivirus structural proteins region was already described for DENV and WNV (Zou et al., 2011; Zhang et al., 2016). The Z1 sequence was used for the design of a new synthetic fragment Z1^{GFP} that contains the eGFP reporter gene derived from the plasmid pEGFP-N1 (Clontech) followed by the sequence encoding the porcine teschovirus 2A protease factor. The cassette eGFP-2A was fused in-frame downstream the first 99 nucleotides encoding the N-terminal part of C protein from ZIKV strain MR766-NIID (Fig. 1B). The cassette eGFP-2A was followed by the ZIKV structural protein sequence. In this construct, 2A is designed to release the GFP cassette from the N-terminus of C. The Z1^{GFP} sequence was amplified by PCR from plasmid pZ1^{GFP} as described above.

3.3. Rescue of ZIKV molecular clones

To produce an infectious reconstituted ZIKV, 5 μg of each purified PCR products, Z1 or Z1^{GFP} to Z4, were directly introduced within Vero cells as previously described with modifications (De Wispelaere et al., 2015). Vero cells (5.10⁶) were resuspended in 400 μL cold PBS 1X buffer and electroporated by two successive pulses of 100 V, 50 μF for 0.9–1.3 ms and 450 V, 50 μF for 0.6–0.9 ms. The electroporated cells were then transferred to a culture flask containing pre-heated growth medium. After 5 days, cell supernatants were recovered and used to infect a flask of 80% confluent Vero cells. When cytopathic effect was apparent (2–7 days), the virus supernatants were clarified and stored at –80 °C as virus stock passage 1 (P1). A second passage on Vero cells (P2) was used for the studies of ZIKV infection.

3.4. Immunofluorescence assay

Cells grown on coverslips were fixed with 3.7% paraformaldehyde (PFA) at room temperature for 10 min. For permeabilization, fixed cells were incubated with Triton X-100 in PBS for 4 min. Cells were incubated overnight with primary antibody PBS supplemented with bovine serum albumin (BSA). Donkey anti-mouse Alexa Fluor 594 IgG was used as secondary antibody. Nucleus morphology was revealed by DAPI staining. The coverslips were mounted with Vectashield (Vector Labs), and fluorescence was observed using a Nikon Eclipse E2000-U microscope. Images were captured and processed using a Hamamatsu ORCA-ER camera and the imaging software NIS-Element AR (Nikon).

3.5. Flow cytometry assay

To detect GFP-expressing cells, cells were fixed with 3.7% PFA in PBS at room temperature for 10 min. Fixed cells were subjected to a flow cytometric analysis using FACScan flow cytometer (Becton Dickinson). The percentage of GFP-positive cells was determined using FlowJo software.

3.6. Plaque forming assay

Viral titre was determined by a standard plaque-forming assay as previously described with minor modifications (Frumence et al., 2016). Briefly, Vero cells grown in 24-well culture plate were infected with tenfold dilutions of virus samples for 2 h at 37 °C and then incubated with 0.4% carboxymethylcellulose (CMC) for 4 days. The cells were fixed by 3.7% PFA in PBS and stained with 0.5% crystal violet in 20% ethanol. Viral titers were expressed as plaque-forming units per mL (PFU mL⁻¹).

3.7. RT-PCR on viral RNA

Genomic RNA was extracted from viral supernatants using Trizol Reagent (Life technologies). RT-PCR was performed using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) and the GoTaq[®] enzyme (Promega) according to manufacturer's recommended procedures. We used the primer pair Z1-E-F and Z1-E-R (listed in Supplemental Table 1) to amplify the 5' region of the genomic RNA between the nucleotides 1046–1213 from ZIKV strain MR766^{NIID-MC} or PF-2013–18. The couple of primers Z1–5'NTR-F and Z1-E-R (listed in Supplemental Table 1) was used to amplify the 5' region of the genomic RNA between the nucleotides 32–2092 from the ZIKV_{GFP} clone. Viral RNA was amplified by RT-PCR with the following program: initial PCR activation step at 95 °C (2 min), 35 cycles of denaturation at 95 °C (30 s), annealing at 62 °C (2 min) and elongation at 72 °C (30 s), ended by final elongation step at 72 °C (5 min). The samples were resolved by agarose gel electrophoresis. Alternatively, the resulting PCR products were purified as described above and then subjected to enzymatic digestion by *Pvu* I. RT-qPCR was performed using M-MLV Reverse Transcriptase and the GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega). All steps were conducted according to manufacturer's instructions. The qPCR data sets were analyzed using the $\Delta\Delta C_t$ method and the results were normalized to Human Glycerolaldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), which was used as internal control. The primers used in this study are listed in Supplemental Table 1.

Acknowledgments

We are grateful to ML. Gougeon, M. de Wispelaere, M. Roche, and E. Frumence, for helpful discussion and assistance during the course of this work. This research was supported in part by the grant ZIKAVAx from the INSERM-transfert, France. EC is supported by a grant Dired from the Conseil Général de La Réunion, France.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2016.07.015>.

References

Aubry, F., Nougairède, A., de Fabritus, L., Querat, G., Gould, E.A., de Lamballerie, X., 2014. Single-stranded positive-sense RNA viruses generate in days using

- infectious subgenomic amplicons. *J. Gen. Virol.* 95, 2462–2467.
- Aubry, F., Nougairède, A., Gould, E.A., de Lamballerie, X., 2015. Flavivirus reverse genetic systems, construction techniques and applications. *Antivir. Res.* 114, 67–85.
- Bréhin, A.C., Rubrecht, L., Navarro-Sanchez, M.E., Maréchal, V., Frenkiel, M.P., Lapalud, P., Laune, D., Sall, A.A., Desprès, 2008. Production and characterization of mouse monoclonal antibodies reactive to Chikungunya envelope E2 glycoprotein. *Virology* 371, 185–195. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2007.09.028>.
- Cao-Lormeau, M., Blake, A., Mons, S., Lastère, S., Roche, C., Vanhomwegen, J., Dub, T., Baudouin, L., Teissier, A., Lare, P., Vial, A.L., Decam, C., Choumet, V., Halstead, S., Willison, H.J., Musset, L., Manuguerra, J.C., Desprès, P., Fournier, E., Mallet, H.P., Musso, D., Fontanet, A., Neil, J., Ghawché, F., 2016. Guillain-barré syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet*, dx.doi.org/10.1016/j.lancet.2016.07.028.
- Clyde, K., Barrera, J., Harris, E., 2008. The capsid-coding region hairpin element (CHP) is a critical determinant of dengue virus and West Nile virus RNA synthesis. *Virology* 379, 314–323. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2008.06.034>.
- De Wispelaere, M., Frenkiel, M.P., Desprès, P., 2015. A Japanese encephalitis virus genotype 5 molecular clone is highly neuropathogenic in a mouse model: impact of the structural protein region on virulence. *J. Virol.* 89, 5862–5875. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00358-15>.
- Dick, G.W.A., Kitchen, S.F., Haddock, A.J., 1952. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 46, 509–520. [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4).
- Duffy, M.R., Chen, T.H., Hancock, W.T., Powers, A.M., Kool, J.L., Lanciotti, R.S., Pretrick, M., Marfel, M., Holzbauer, S., Dubray, C., Guillaumot, L., Griggs, A., Bel, M., Lambert, A.J., Laven, J., Kosoy, O., Panella, A., Biggerstaff, B.J., Fischer, M., Hayes, E.B., 2009. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* 360, 2536–2543. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0805715>.
- Frumence, E., Roche, M., Krejbich-Trotot, P., El-Kalamouni, C., Nativel, B., Rondeau, P., Missé, D., Gadea, G., Viranaicken, W., Desprès, P., 2016. The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells leading to IFN- β production and apoptosis induction. *Virology* 493, 217–226. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2016.03.006>.
- Gatherer, D., Kohl, A., 2015. Zika virus: a previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas. *J. Gen. Virol.* <http://dx.doi.org/10.1099/jgv.0.000381>.
- Markoff, L., Falgout, B., Chang, A., 1997. A conserved internal hydrophobic domain mediates the stable membrane integration of the dengue virus capsid protein. *Virology* 233, 105–117.
- Mertens, E., Kajaste-Rudnitski, A., Torres, S., Funk, A., Frenkiel, M.P., Iteman, I., Khromykh, A., Desprès, P., 2010. Viral determinants in the NS3 helicase and 2K peptide that promote West Nile virus resistance to antiviral action of 2',5'-oligoadenylate synthetase 1b. *Virology* 399, 176–185.
- Musso, D., Gubler, D.J., 2016. Zika virus. *Clin. Microbiol. Rev.* <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00072-15>.
- Pierson, T.C., Diamond, M.S., Ahmed, A.A., Valentine, L.E., Davis, C.W., Samuel, M.A., Hanna, S.L., Puffer, B.A., Doms, R.W., 2005. An infectious West Nile virus that expresses a GFP reporter gene. *Virology* 334, 28–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2005.01.021>.
- Plourde, A.R., Boch, E.M., 2016. A literature review of Zika virus. *Emerg. Infect. Dis.* <http://dx.doi.org/10.3201/eid2207151990>.
- Quick, K.M., Bowen, J.R., Johnson, E.L., Mc Donald, C.E., Hauiliang, M., O'Neal, J.T., Rajakumar, A., Wrammert, J., Rimawi, B.H., Pulendran, B., Shinazi, R.F., Chakraborty, R., Suthar, M.S., 2016. Zika virus infects human placenta macrophages. *Cell Host Microbe* <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.015>.
- Ren, L., Peng, Z., Chen, X., Ouyang, H., 2016. Live cell reporter systems for positive-sense single strand RNA viruses. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 178, 1567–1585. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-015-1968-5>.
- Roth, A., Mercier, A., Lepers, C., Hoy, D., Duituraga, S., Benyon, E., Guillaumot, L., Souarès, Y., 2014. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections - an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. *Eurosurveillance* 19, 20929. <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.41.20929>.
- Shan, C., Xie, X., Muruato, A.E., Rossi, S.L., Roundy, C.M., Azar, S.R., Yang, Y., Tesh, R. B., Bourne, N., Barrett, A.D., Vasilakis, N., Weaver, S.C., Shi, P.Y., 2016. An infectious cDNA clone of Zika Virus to study viral virulence, mosquito transmission, and antiviral inhibitors. *Cell Host Microbe*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.004>.
- Sikka, V., Chattu, V.K., Popli, R.K., Galwankar, S.C., Kelkar, D., Sawicki, S.G., Stawicki, S.P., Papadimos, T.J., 2016. The emergence of Zika Virus as a global health security threat: a review and a consensus statement of the INDESEM joint working group (JWG). *J. Glob. Infect. Dis.* 8, 3–15. <http://dx.doi.org/10.4103/0974-777X.176140>.
- Weaver, S.C., Costa, F., Garcia-Blanco, M.A., Ko, A.L., Ribeiro, G.S., Saade, G., Sji, P.Y., Valisakis, N., 2016. Zika virus: History, emergence, biology and prospects for control. *Antivir. Res.* 130, 69–80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.03.010>.
- Zhang, P.T., Shan, C., Li, X.D., Liu, S.Q., Deng, C.L., Ye, H.Q., Shang, B.D., Shi, P.Y., IV, M., Shen, B.F., Qin, C.F., Zhang, B., 2016. Generation of a recombinant West Nile virus stably expressing the *Gussia* luciferase for neutralization assay. *Virus Res.* 211, 17–24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2015.09.015>.
- Zmurko, J., Marques, R.E., Schols, D., Verbeken, E., Kaptein, S.J., Neyts, J., 2016. The viral polymerase inhibitor 7-Deaza-2'-C-Methyladenosine is a potent inhibitor of in vitro Zika virus replication and early disease progression in a robust mouse infection model. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, e0004695.
- Zou, G., Xu, H.Y., Qing, M., Wang, Q.Y., Shi, P.Y., 2011. Development and characterization of a stable luciferase dengue virus for high-throughput screening. *Antivir. Res.* 91, 11–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.05.001>.

Annexe 2 :

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Extract from *Aphloia theiformis*, an edible indigenous plant from Reunion Island, impairs Zika virus attachment to the host cell surface

Elodie Clain¹, Laura Sinigaglia², Andrea Cristine Koishi³, Olivier Gorgette⁴, Gilles Gadea¹, Wildriss Viranaicken¹, Pascale Krejbich-Trotot¹, Patrick Mavingui¹, Philippe Desprès¹, Claudia Nunes Duarte dos Santos³, Pascale Guiraud¹, Nolwenn Jouvenet² & Chaker El Kalamouni¹

The mosquito-borne Zika virus (ZIKV) belongs to the flavivirus genus of the *Flaviviridae* family. Contemporary epidemic strains of ZIKV are associated with congenital malformations in infants, including microcephaly, as well as Guillain-Barré syndrome in adults. A risk of human-to-human transmission of ZIKV is also well documented. A worldwide research effort has been undertaken to identify safe and effective strategies to prevent or treat ZIKV infection. We show here that extract from *Aphloia theiformis*, an edible endemic plant from Indian Ocean islands, exerts a potent antiviral effect against ZIKV strains of African and Asian lineages, including epidemic strains. The antiviral effect of *A. theiformis* extract was extended to clinical isolates of dengue virus (DENV) of the four serotypes in human hepatocytes. *A. theiformis* inhibited virus entry in host cells by acting directly on viral particles, thus impairing their attachment to the cell surface. Electron microscopic observations revealed that organization of ZIKV particles was severely affected by *A. theiformis*. We propose a model of antiviral action for *A. theiformis* against flaviviruses that highlights the potential of medicinal plants as promising sources of naturally-derived antiviral compounds to prevent ZIKV and DENV infections.

Zoonotic Zika virus (ZIKV) is a mosquito-borne virus that emerged in 2007 in Micronesia and since has caused important outbreaks in the South Pacific, Americas and South-East Asia. These recent ZIKV epidemics were associated with severe fetal brain injuries and neurological defects in adults, such as Guillain-Barre syndrome^{1,2}. ZIKV infection is now identified as a sexually-transmitted illness as well³⁻⁵. In 2016, Zika infection was declared an emerging epidemic threat worldwide by the World Health Organization.

ZIKV is a member of the flavivirus genus, a group of small, enveloped viruses, which also includes Dengue virus (DENV), West Nile virus (WNV) and Yellow fever virus⁶. The genome consists of a single-stranded, positive-sense RNA molecule of around 10,7 kb, encoding a polyprotein precursor that is processed by the viral protease NS3 to give rise to 7 non-structural (NS) proteins and 3 structural proteins (Capsid C, pre-membrane prM and Envelope E). The NS proteins are mainly involved in viral RNA replication, while the structural proteins constitute the virion^{7,8}.

The early stages of ZIKV infection require the attachment of the virion to the cell surface. This first step is mainly mediated by the interaction between phosphatidylserine exposed at the surface of the virus and the cellular receptor Axl⁹ and probably also mobilizes close contacts between the E protein and the cell membrane. Following Axl mediated-binding, the virus enters target cells through clathrin-mediated endocytosis⁹. The low-pH environment of endosomes triggers fusion between the viral envelope and the endosomal membrane. This fusion event leads to the release of the viral nucleocapsid into the cytosol.

¹Université de La Réunion, UM134 Processus Infectieux Insulaire Tropical (PIMIT), INSERM U1187, CNRS UMR 9192, IRD UMR 249, Plateforme Technologique CYROI, 97490, Sainte, Clotilde, France. ²UMR CNRS 3569, Viral Genomics and Vaccination Unit, Pasteur Institute, 75724, Paris, France. ³Laboratorio de Virologia Molecular, Instituto Carlos Chagas, ICC/FIOCRUZ/PR, Curitiba, Parana, Brazil. ⁴Ultrastructural Bioluminescence (UTechS/UBI), Pasteur Institute, 75724, Paris, France. Elodie Clain and Laura Sinigaglia contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.E.K. (email: chaker.el-kalamouni@univ-reunion.fr)

To date, there is still no vaccination or specific treatment available for ZIKV. Therefore, it is of utmost urgency to develop safe and effective anti-ZIKV compounds, not only to mitigate ZIKV-associated morbidities but also to impair the chain of transmission. The features of E mediated events make the development of entry inhibitors an attractive possibility¹⁰. Medicinal plants, which have been used as treatment or prevention against human diseases for millenaries, remain a remarkable source of potential antiviral compounds. Indeed, numerous enveloped RNA viruses are sensitive to a broad range of phytochemicals, including alkaloids, coumarins, flavonoids, terpenoids, polyphenols and saponins^{11,12}. It has been recently reported that ZIKV is sensitive to polyphenol epigallocatechin gallate (EGCG) from green tea and to curcumin^{13–15}. The Reunion Island which belongs to the Mascarene Archipelago, is described as a biodiversity hotspot, based on its remarkable flora and endemic species¹⁶. Previous studies have shown that some edible and medicinal plants from Reunion island exert remarkable antioxidant activities due to their high-content of polyphenols, alkaloids and saponins, such as *Aphloia theiformis* (*A. theiformis*), *Hubertia ambavilla* (*H. ambavilla*) and *Ayapana triplinervis* (*A. triplinervis*)^{17–20}. Hence, we evaluated whether solvent-free extracts of *A. theiformis*, *H. ambavilla* and *A. triplinervis*, which were recently listed into the French *pharmacopoeia*, prevents ZIKV infection *in vitro*.

Results

A. theiformis extract inhibits the early stage of ZIKV infection. Prior to evaluate the anti-ZIKV properties of extracts from *A. theiformis*, *A. triplinervis* and *H. ambavilla*, we determined their maximal non-cytotoxic doses on Vero cells using a MTT assay, which assesses cell metabolic activity (Fig. 1a). Plotting cell viability against different concentrations of plant extracts revealed concentration-dependent toxicity in Vero cells (Fig. 1a). The concentrations that inhibited 50% of cell viability (CC_{50}) were up to $3000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for all tested plant extracts. A concentration of $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of plant extracts that maintained 95% of cell viability (Fig. 1a) was chosen for testing potential anti-ZIKV activity.

Time-of-drug addition approach was performed to determine which stages of ZIKV infection could be targeted by the 3 medicinal plants extracts (Fig. 1b). A chimeric molecular clone of the ZIKV strain MR766 expressing a GFP reporter gene as an additional part of the structural protein region (ZIKV_{GFP})²¹ was used for monitoring viral replication by flow cytometry in Vero cells. The number of GFP positive cells decreased around 90% compared to non-treated control cells when $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of *A. theiformis* extract was added throughout the experiment (Fig. 1b and c). Similar results were obtained when *A. theiformis* extract was added concomitantly with virus input (adsorption) for 2 hours (Fig. 1b and c). In contrast, little or no antiviral effect was observed when *A. theiformis* extract was added *prior* adsorption or after virus exposure (Fig. 1b and c). Treatment of cells with *H. ambavilla* and *A. triplinervis* showed no significant effect on ZIKV_{GFP} replication regardless of the experimental conditions tested (Fig. 1c). These results suggest that *A. theiformis*-mediated inhibition of ZIKV infection was not associated with an impairment of viral replication but rather to an inability of ZIKV to initiate a productive infection into the host-cell.

To investigate whether *A. theiformis* extract renders virus particles unable to initiate viral infection in the host-cell, viral inactivation assay was performed. ZIKV_{GFP} preparation was incubated with $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of *A. theiformis* extract for 1 hour at 37°C prior to Vero cells infection. Such treatment of ZIKV_{GFP} resulted in around 85% reduction of GFP-positive cells at 24 hours post-infection (hpi) compared to cells infected plant-extract-free ZIKV_{GFP} (Fig. 1d). The infectivity of ZIKV_{GFP} treated with *H. ambavilla* and *A. triplinervis* extracts was similar to that of non-treated virus (Fig. 1d), further suggesting that these 2 plants do not possess anti-ZIKV activities.

We next wondered whether the antiviral activity of *A. theiformis* extract was affected by the extraction process (Fig. S1a). Three extractions were performed using plants harvested at different times in the year 2016 and their antiviral activity was evaluated. Our data showed that the antiviral activity of *A. theiformis* was not affected by the extraction itself, suggesting that the concentration of the active components is stable and does not vary from one extraction to the other.

To ensure that *A. theiformis* extract did not exert non-lethal cytotoxic effects that would have been missed in the MTT assays (Fig. 1a), the effect of $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of *A. theiformis* extract on the growth of Vero cells was evaluated using flow cytometry analysis (Fig. S1b). Our data showed that *A. theiformis* extract did not affect the growth of Vero cells. Moreover, to evaluate the potential cytotoxic effect of *A. theiformis* extract on human cells, MTT cell viability assays were performed on the human hepatoma cell lines Huh7.5, which are extensively used in *Flaviviridae* research (Fig. S1c). A concentration of $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of plant extract maintained 100% of Huh7.5 cells viability (Fig. S1c). We conclude that the antiviral activity of the compound is not due to its cytotoxicity.

To establish a causal relationship between the reduced percentage of GFP-positive cells in the samples treated with *A. theiformis* extract and a loss of ZIKV infectivity, the presence of infectious viral particles in the inoculum was titrated by plaque-forming assay (Fig. 1e). A dose-dependent effect of *A. theiformis* on ZIKV infectivity was observed, with a 2-log reduction in infectivity of viral inoculum at non-cytotoxic concentrations of plant extract (Fig. 1e). A complete inhibition of ZIKV infectivity was observed in the presence of $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of *A. theiformis* extract (Fig. 1e). The concentration of *A. theiformis* extract that inhibited 50% of viral infectivity (IC_{50}) was $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, obtained using nonlinear regression following the construction of a sigmoidal concentration-response curve (Fig. 1e). Based on the determined cytotoxicity and antiviral efficacy ($SI = CC_{50}/IC_{50}$), the Selectivity Index of *A. theiformis* extract is 30.

To determine the kinetic of *A. theiformis* extract-mediated inactivation of ZIKV, a time-response curve was determined on Vero cells. Only ten to fifteen minutes were required to inhibit GFP expression by 50% at non-cytotoxic concentrations of *A. theiformis* extract (Fig. 1f). Together, these results suggest that *A. theiformis* acts by interfering with at least one of the early steps of ZIKV infection, such as attachment to cell membrane, receptor-mediated cell entry, fusion and/or decapsidation within the cell cytoplasm.

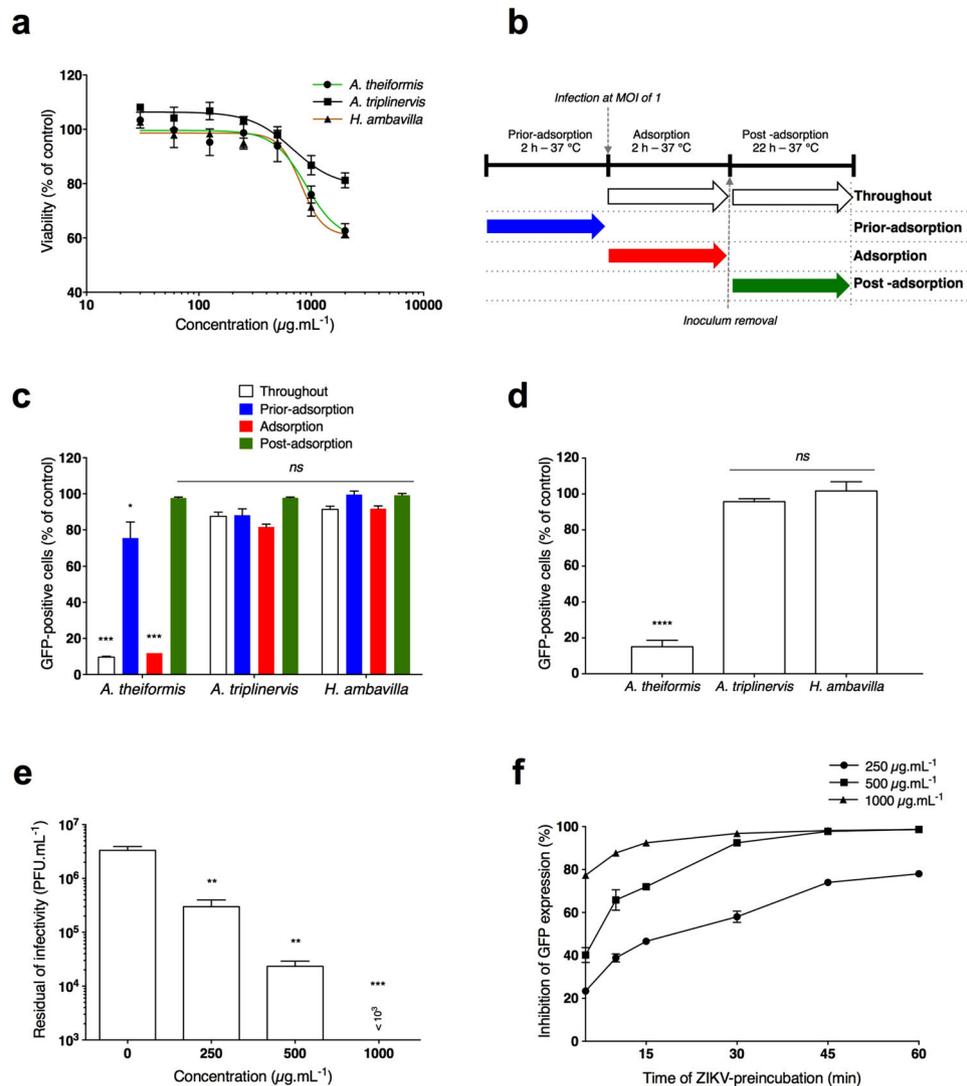


Figure 1. *A. theiformis* extract targets early stages of ZIKV replication cycle. (a) Viability of Vero cells incubated with different concentrations of plant extracts. Cells were cultured in the presence of increased concentrations of plant extracts for 72 h. Cell metabolic activity was evaluated by MTT assay. Results are means \pm SD of four independent experiments and are expressed as relative value compared to untreated cells. (b) Schematic representation of time-of-drug addition assay used to characterise antiviral activity of the plant extracts ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) on ZIKV_{GFP} infection of Vero cells. Arrows indicate the presence of plant extract during the infection. (c) Flow cytometric analysis of GFP expression in Vero cells infected with ZIKV_{GFP} at MOI of 1 under the experimental conditions shown in (b). Results are means \pm SD of four independent experiments and are expressed as relative value compared to untreated infected cells. (d) Vero cells were infected with ZIKV_{GFP} pre-incubated during 1 h at 37 °C with plant extracts ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Flow cytometric analysis of GFP fluorescence was performed 24 hpi. The results shown are means \pm SD of four independent experiments and are expressed as relative value compared to untreated infected cells. (e) ZIKV_{GFP} was incubated with three different concentrations of *A. theiformis* and the residual infectious particles were titrated by plaque forming assay. The results shown are means \pm SD of four independent experiments. (f) GFP expression in Vero cells infected with ZIKV_{GFP} (MOI 1) pre-incubated for various times with three different concentrations of *A. theiformis* at 37 °C. Flow cytometric analysis of GFP fluorescence was performed 24 hpi. The relative percentages of inhibition are means \pm SD of four independent experiments. One-way ANOVA and Dunnett's test for multiple comparisons (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns = not significant compared to untreated control).

***A. theiformis* inhibits both historical African and contemporary Asian ZIKV strains.** To further validate the role of *A. theiformis* extract on ZIKV replication, the African lineage virus strain ZIKV-MR766²² and the contemporary Asian lineage strain ZIKV-PF13²³, which was responsible for the 2015 epidemic in French Polynesia, were incubated with *A. theiformis* extract for 1 hour at 37 °C prior to Vero cells infection. Quantification of viral infectivity by plaque-forming assay revealed that both viral strains were as sensitive as ZIKV_{GFP} to different *A. theiformis* extract concentrations (Fig. 2a,b). Indeed, as observed for ZIKV_{GFP} (Fig. 1e), *A. theiformis* extract lowered infectivity of the two viral strains up to 2-log at non-cytotoxic dose (Fig. 2a,b).

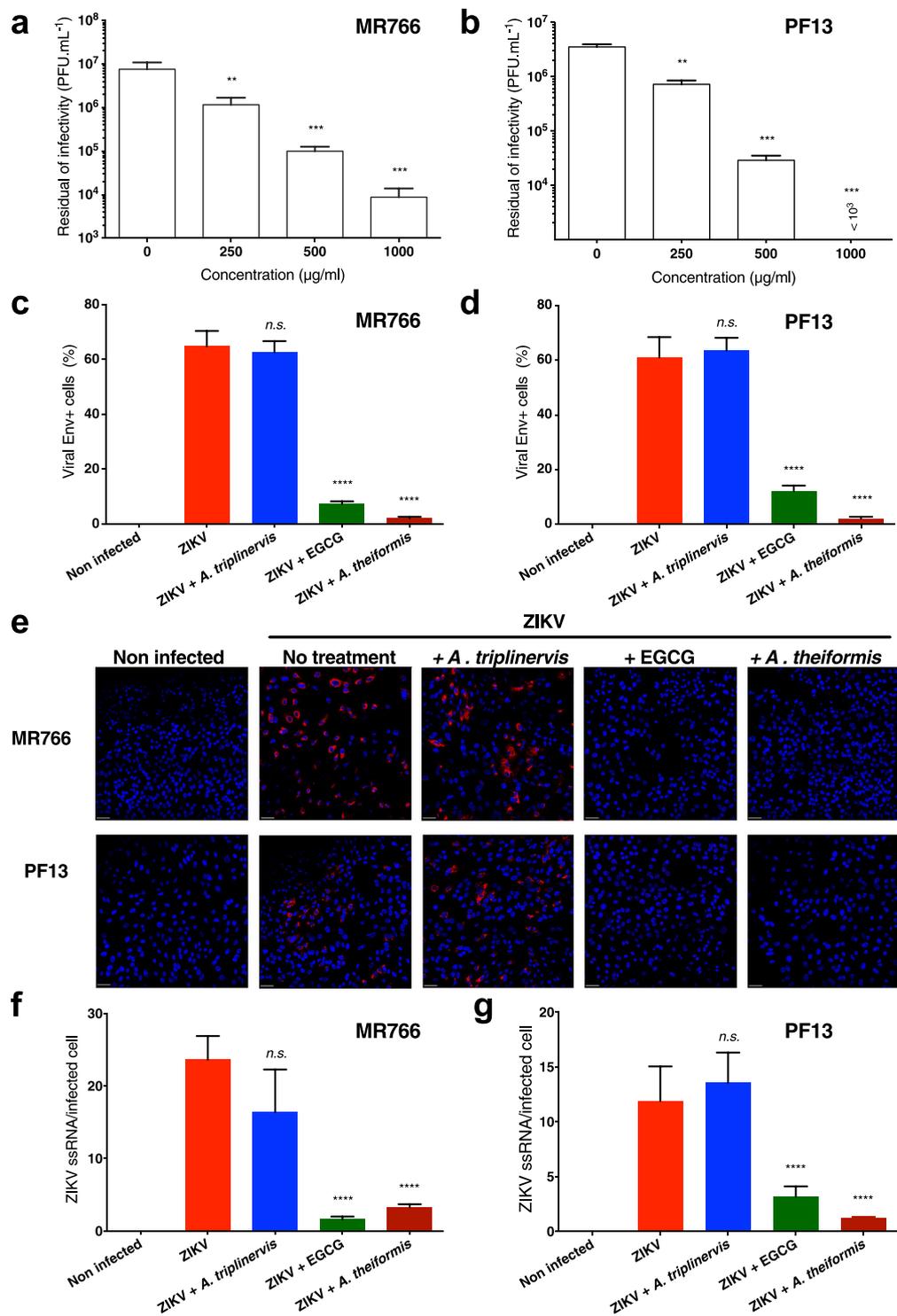


Figure 2. *A. theiformis* extract exerts a potent antiviral effect against an African and an Asian ZIKV strains. ZIKV-MR766 or ZIKV-PF13 were incubated with *A. theiformis* extract for 1 h at 37 °C. Vero cells were left uninfected or were infected at an MOI of 1 for 24 h. (a,b) The infectious released particles were titrated by plaque forming assay. The results shown are means \pm SD of four independent experiments. (c,d) Quantification of the number of cells positive for the viral protein E expression in ZIKV-infected Vero cells by immunofluorescence and confocal microscopy. *A. triplinervis* and EGCG (100 μ M) were used as negative and positive controls, respectively. The results shown are means \pm SD of four independent experiments. (e) Vero cells were processed for FISH using a probe specific for viral RNA (red) and then stained with NucBlue to visualize nuclei (blue). Images are representative of three independent experiments. Scale bars are 50 μ m. (f,g) Quantification of the percentage of Vero cells positive for ssRNA from the experiments represented in e. Data are means \pm SD of three independent experiments.

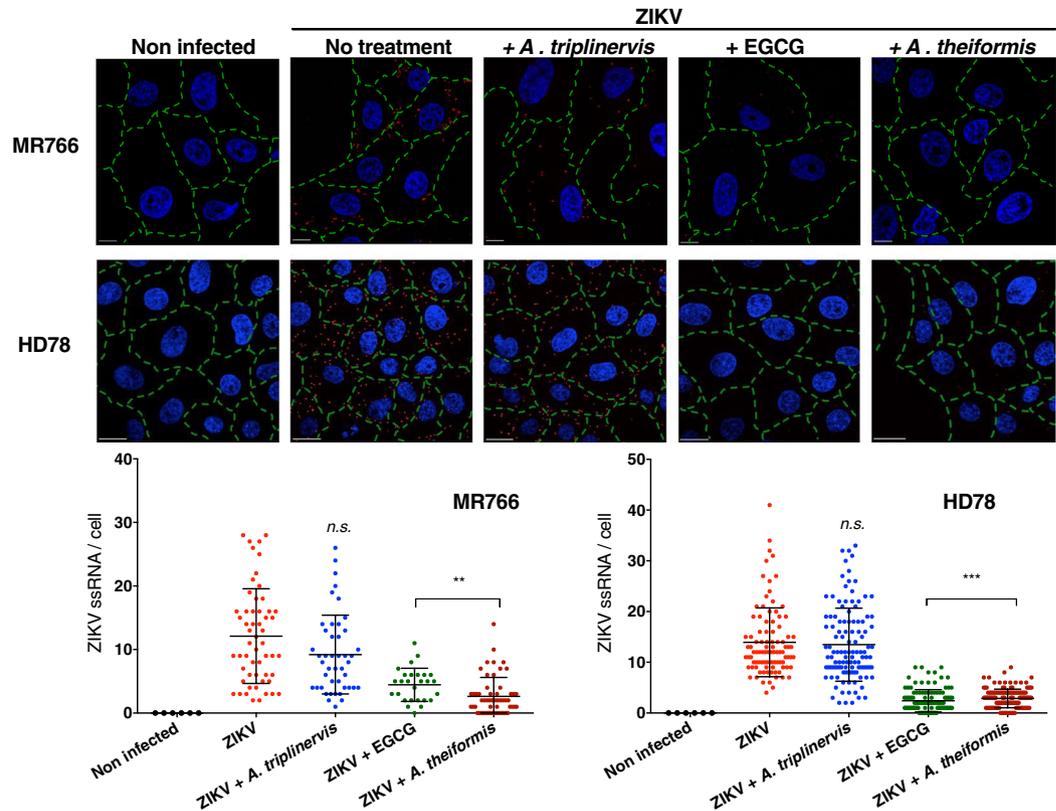


Figure 3. *A. theiformis* extract inhibits ZIKV entry to the cell surface. ZIKV-MR766 or ZIKV-HD78 were incubated with *A. theiformis* extract for 1 h at 37 °C. *A. triplinervis* and EGCG (100 μM) were used as negative and positive controls, respectively. Vero cells were incubated on ice with viruses at a MOI of 500. Cells were rinsed with cold PBS, shifted at 37 °C for 90 min and then fixed, permeabilised, processed for FISH using a probe specific for viral RNA (red) and finally stained with NucBlue to visualize nuclei (blue). Green lines outline the cell membranes stained with A488-conjugated wheat germ agglutinin. Scale bars are 20 μm. The images shown are representative of three independent experiments. Bottom panels: quantification of ZIKV ssRNA spots counted per cell ($n \geq 100$).

Immunofluorescence assays using antibodies that recognize the viral protein E were performed on Vero cells infected for 24 hours with the two viral strains. Epigallocatechin gallate (EGCG)¹³ and *A. triplinervis* were used as positive and negative controls, respectively. The analysis showed that viruses treated with 500 μg.mL⁻¹ of *A. theiformis* extract established infection in 5% of cells compared to the plant-extract-free virus, which infected 60% of cells (Fig. 2c,d). Treatment of virus with *A. theiformis* extract was more potent at inhibiting infection of both viral strains than EGCG (Fig. 2c,d). Furthermore, to detect single-stranded viral RNA (ZIKV ssRNA) produced during viral replication, fluorescence *in situ* hybridisation (FISH)-based assays coupled with immunofluorescence and confocal microscopy were performed on Vero cells infected with ZIKV-MR766 or ZIKV-PF13 for 24 hours. The FISH probe produced no signal in non-infected control cells and a bright signal in the cytoplasm of cells infected with both viral strains (Fig. 2e), validating its specificity. Incubation of ZIKV with *A. theiformis* extract resulted in a 10-fold reduction of the number of cells positive for ZIKV ssRNA, compared to mock-treated cells, regardless of the viral strain (Fig. 2f,g). Together, these results showed that *A. theiformis* exerts a potent antiviral effect against an African and an Asian ZIKV strains.

***A. theiformis* extract inhibits ZIKV binding to the cell surface.** Our data suggest that *A. theiformis* acts by interfering with at least one of the early steps of ZIKV infection. To determine which of these step(s) was/ were affected, cell-binding assays were performed. These assays were performed with the MR766 strain and with HD78, another African ZIKV strain that replicated very efficiently in insect cells. MR766 and HD78 ZIKV particles were incubated 1 hour with *A. theiformis* extract and then added on cell monolayer at 4 °C to prevent viral internalisation. The cells were washed with ice-cold PBS to remove the unbound virus then shifted to 37 °C for 90 minutes. FISH assays coupled with confocal microscopy approaches were used to detect the presence of viral ssRNA in the cytoplasm of infected cells. Epigallocatechin gallate (EGCG) and *A. triplinervis* extracts were used as positive and negative controls, respectively. Around 15 molecules of viral RNA were detected in non-treated control cells infected with both viral strains (Fig. 3). *A. triplinervis* extract did not significantly affect viral entry since the number of ssRNA molecules per infected cell was similar than in control cells (Fig. 3). As expected from previous studies²⁴, less ssRNA per cell was detected in the EGCG-treated preparations, as compared to control cells (Fig. 3). In the presence of *A. theiformis* extract, around 2 ssRNA molecules per infected cell were detected,

which is around 6–7 times less than in control cells (Fig. 3). These results suggest that *A. theiformis* inhibits ZIKV penetration into Vero cells.

To further dissect which viral entry step was affected by *A. theiformis* extract, cell-attachment assays were performed with the African strain ZIKV-MR766²². Vero cells were incubated 1 hour at 4 °C with ZIKV particles at MOI of 1 in presence or in absence of *A. theiformis* extract and amounts of attached viruses were evaluated by RT-qPCR (Fig. S2). EGCG and *A. triplinervis* were used as positive and negative controls, respectively. A reduction of at least 95% of ZIKV attachment to the cell surface was observed with *A. theiformis* extract compared to untreated cells (Fig. S2).

To investigate the physical effects of *A. theiformis* on ZIKV morphology, negative staining electron microscopic (EM) studies were performed with a highly concentrated preparation of the HD78 ZIKV strain. The virus was incubated with *A. theiformis*, EGCG, *A. triplinervis* or PBS at 37 °C for 1 hour prior to EM analysis coupled to immunogold labelling of the viral E (Fig. 4). The diameter of the E-positive particles detected in the non-treated control fractions was around 40 to 50 nm (Fig. 4), which is in good agreement with the diameter of ZIKV particles²⁵. The mock-treated virions were spherical. As expected from our previous results showing that *A. triplinervis* had no antiviral effect on ZIKV infection (Fig. 1c), virions treated with *A. triplinervis* had a similar shape and diameter than non-treated control virions (Fig. 4). Incubation of the virus with either EGCG or *A. theiformis* deformed the viral shape (Fig. 4). Interestingly, EGCG or *A. theiformis* virions were less aggregated than plant-extract free or *A. triplinervis*-treated ones (Fig. 4). Moreover, EGCG or *A. theiformis* virions appeared darker than control virions, likely due the enhanced permeation of the staining solution into the viral core. The darkening effect was more prominent in the presence of *A. theiformis* than EGCG. This suggests that the viral lipid membrane was highly damaged by *A. theiformis* treatment. Together, these results suggest that *A. theiformis* extracts interact with the viral membrane and that this interaction may deform the viral shape and thus affect viral binding to the cell membrane. These EM data are thus in good agreement with our RT-qPCR analysis (Fig. S2).

***A. theiformis* exhibited antiviral effect against 4 DENV clinical isolates and an epidemic Brazilian ZIKV strain in human cells.**

We next wondered if *A. theiformis* exert antiviral activity against DENV another medically relevant flavivirus. The potential anti-DENV activity of *A. theiformis* was evaluated using clinical isolates representing the 4 different serotypes. Recombinant interferon (IFN)- α 2A, which are known to block DENV replication²⁶ was used as positive control. To validate further the anti-ZIKV activities of *A. theiformis*, a clinical isolate of Zika virus (ZV BR 2015/15261) that was responsible for the 2016 epidemic in Brazil was also used in this experiment. *A. theiformis* (500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) was pre-incubated with DENV or ZIKV for 1 hour at 37 °C then the mixture was used to infect Huh7.5 cells. After 72 h, immunofluorescence assays using antibodies against the E protein were performed to identify infected cells. The number of E positive cells was evaluated using the Operetta High-Content Imaging System (PerkinElmer)²⁷. *A. theiformis* extract showed potent antiviral activity against the four DENV serotypes tested (Fig. 5a). DENV-1, 2 and 3 were the more sensitive to *A. theiformis* than DENV-4, with a 70 to 80% reduction of E-positive cells (Fig. 5a). *A. theiformis* also showed a robust antiviral effect against the ZIKV Brazilian epidemic strain (Fig. 5a).

To establish a causal relationship between the reduced percentages of E-positive cells in the samples treated with *A. theiformis* extract and a loss of DENV and ZIKV-BR infectivity, the presence of infectious viral particles in the inoculum was titrated by foci-forming immunodetection assay. DENV and ZIKV-BR virions treated with non-cytotoxic concentration of *A. theiformis* extracts lost up to 3-log infectivity (Fig. 5b). Together, our results show that *A. theiformis* exhibits antiviral effect against 4 DENV clinical isolates and an epidemic Brazilian ZIKV strain in human cells.

Discussion

In the absence of effective antivirals or vaccines against ZIKV, this arbovirus has emerged as a serious health burden that affected millions of people in the past 2–3 years. The development of antiviral agents from synthetic sources requires significant amounts of effort for drug design and validation. The use of plants as sources of antiviral drugs to treat viral infections represents instead a more economical, simple and environmental-friendly way^{28,29}. Chemical substances are classified as virucidal agents if they are able to inactivate the extracellular virions, either by damaging the protein coat or penetrating the virion or by destroying the viral genome; hence, resulting in decreased infectivity of the virus³⁰. We demonstrated here, using a panel of assays, that four strains of ZIKV exhibited decreased infectivity and thus viral replication ability when incubated with *A. theiformis* extract. Therefore, *A. theiformis* extract is a suitable candidate for the development of Zika fever treatment. *A. theiformis* was also active against four DENV clinical strains.

Our FISH and RT-qPCR data demonstrated that *A. theiformis* potently inhibited ZIKV attachment to the host cell. Moreover, EM observations clearly showed that *A. theiformis*-treated ZIKV-virions differed in shape from plant-extract-free particles. In the presence of *A. theiformis* extract, ZIKV were also less prone to aggregation than plant-extract-free ones. Finally, *A. theiformis* treatment seemed to render viral particles more permeable to the EM staining solution. These FISH and EM data showed that the active compounds present in *A. theiformis* acts on the virion itself, probably by binding viral E proteins and/or phosphatidylserine exposed at the surface of the virions. Since the anti-E antibodies 4G2 were able to bind *A. theiformis*-treated virions, the conformation of E was probably not affected by the treatment. We thus favour the hypothesis of a direct interaction between *A. theiformis* compounds and phosphatidylserine exposed at the surface of the virus. Such interactions might alter the conformation of phosphatidylserines, which in turn, could inhibit the docking of the virus to the host cell surface.

EGCG, which belongs to the flavonoid family, is a promising candidate for the development of a new class of broad-spectrum antiviral. It exerts its antiviral effects by inhibiting the entry into the host cell of a panel of unrelated RNA and DNA viruses, such as ZIKV, DENV, WNV, hepatitis C virus, influenza virus, herpes simplex

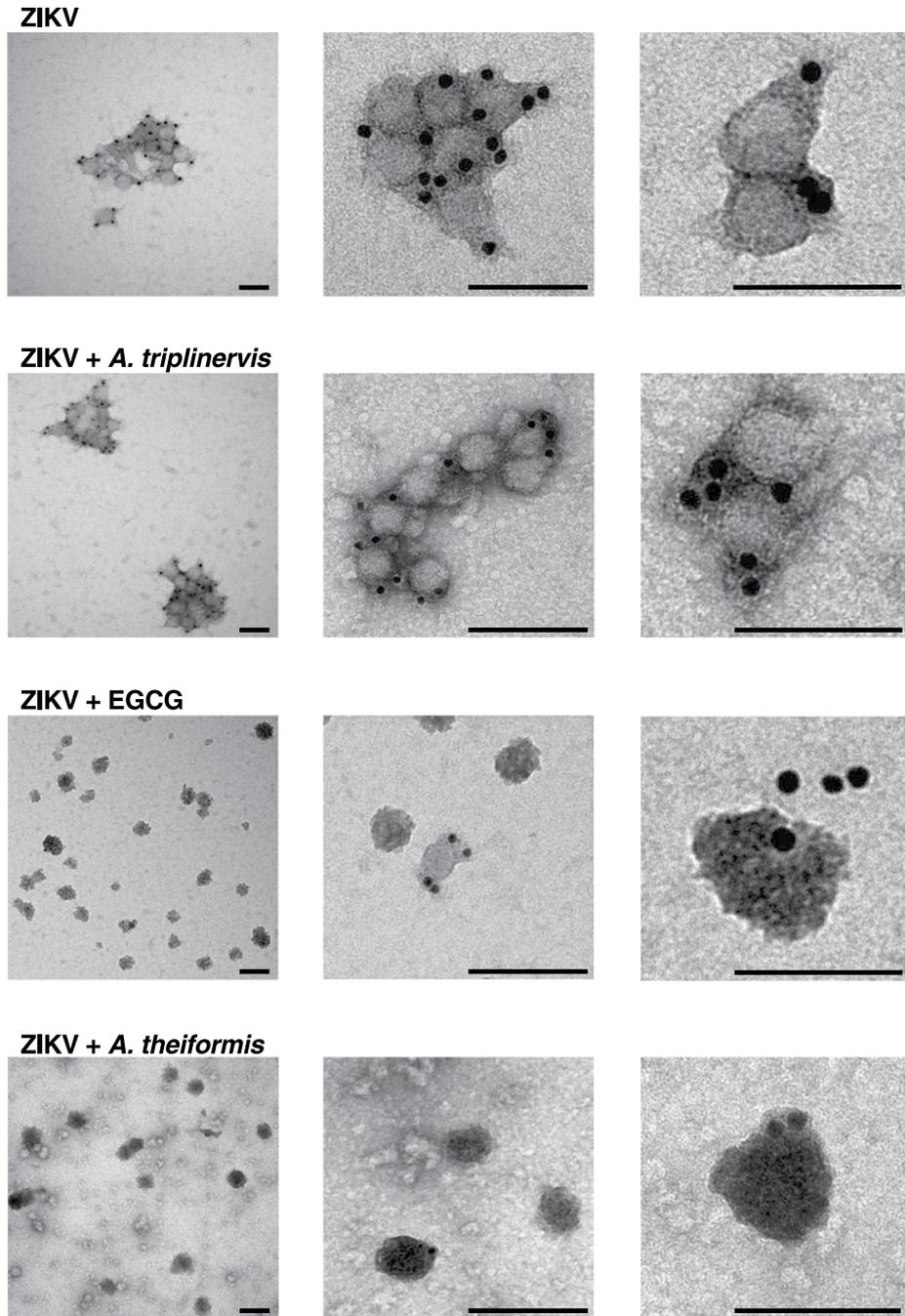


Figure 4. *A. theiformis* extract deforms ZIKV particles. ZIKV-HD78 was left untreated or was treated with *A. theiformis* extract for 15 min at 37 °C. *A. triplinervis* and EGCG (100 μ M) were used as negative and positive controls, respectively. Samples were processed for immunogold labeling using anti-Env antibodies, negatively stained, and analysed by transmission electron microscopy. Scale bars are 50 nm. The images shown are representative of two independent experiments.

virus (HSV) and hepatitis B virus^{24,31–34}. EGCG induces physical damage to influenza virus and HSV particles, which may result in the loss of their attachment capacity to the host-cell membrane^{33,34}. Using ligand-docking and molecular dynamic simulations, an *in silico* study has predicted the presence of an EGCG binding site within the ZIKV E protein¹⁵. We proposed that *A. theiformis* extract acts through a similar mechanism than EGCG, probably via binding to the surface of the virions. Our flow cytometry, FISH, RT-qPCR and titration experiments showed that *A. theiformis* extract was as potent as EGCG in inhibiting ZIKV infection.

A. theiformis, which is widely distributed across the Mascarene Islands, is currently the only known representative of the *Aphloiaceae* family³⁵. It is consumed as herb tea and is therefore safe for humans. It is believed to have a large number of medicinal properties^{16,36–38}, including anti-inflammatory activities. Our phytochemical analysis of *A. theiformis* extract using an ultra-high-performance liquid chromatography-diode array

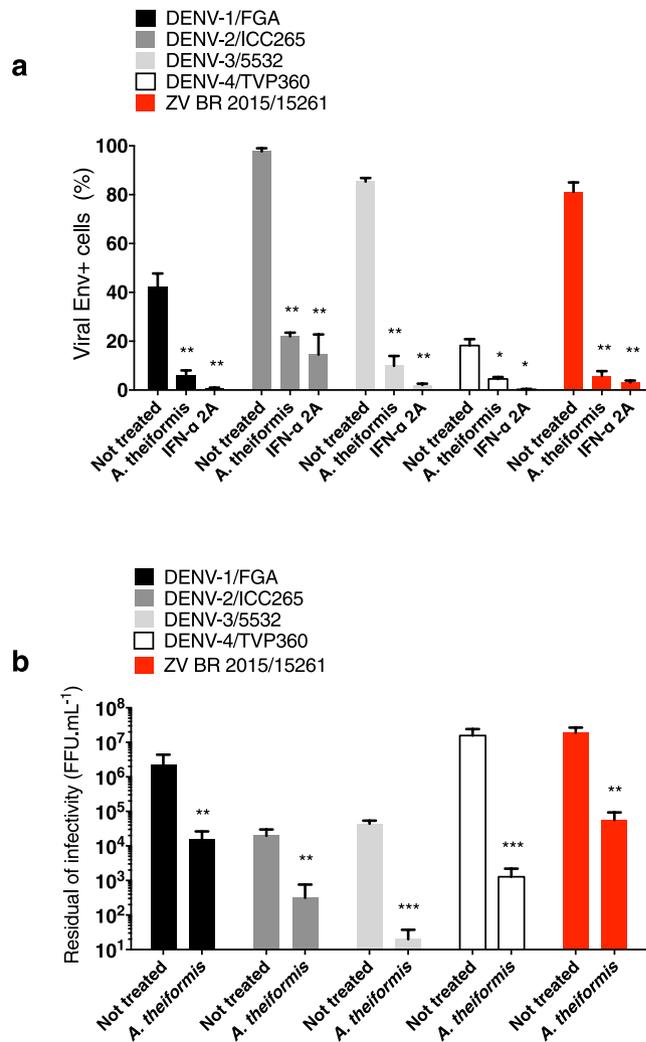


Figure 5. *A. theiformis* extract exerts antiviral effect against 4 DENV clinical isolates and an epidemic Brazilian ZIKV strain. Four DENV serotypes (DENV-1, 2, 3 and 4) and a Brazilian epidemic strain of ZIKV (ZV BR2015/15261) were incubated with *A. theiformis* extract for 1 h at 37 °C. (a) Huh7.5 cells were left uninfected or were infected with DENV at an MOI of 0.1 or with ZIKV at an MOI of 0.4 for 48 h. Recombinant IFN- α 2A (200 IU.mL⁻¹) was added 2 h post infection and used as positive control. The percentage of E positive cells was evaluated using the Operetta High-Content Imaging System (PerkinElmer). Results are means \pm SD of three independent experiments. (b) The residual infectivity of treated particles was titrated in C6/36 cells using a foci-forming immunodetection assay. Data represent the means \pm SD from three independent experiments. One-way ANOVA and Dunnett's test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

detector-tandem mass spectrometry UHPLC-DAD-MS³⁹ (Fig. S3) showed its richness in phenolic compounds, mainly C-glycosylated xanthenes, such as mangiferin and flavonoids (Table S1). Phenolic compounds from plant extracts possess many beneficial properties; including antiviral activities²⁴. Polyphenols such as delphinidin, baicalin and naringin are known to inhibit the early steps of WNV, ZIKV and DENV replication^{40–42}. Thus, it is likely that one or more of *A. theiformis* polyphenols are responsible for the anti-ZIKV and -DENV activities reported here. It would be of great interest to determine which components among the identified polyphenols are responsible for the antiviral activity of *A. theiformis* or whether there is a synergetic effect of several compounds leading to anti-ZIKV activity. Isolation, characterization and chromatography-based purification will be thus performed in order to identify the active components from the crude extract. It would also be interesting to compare the phytochemical composition of *A. theiformis* extract with those of *H. ambavilla* and *A. triplinervis* to develop structure–activity relationship (SAR) studies. Such SAR studies would broaden our understanding of family of compounds that contribute to the antiviral action against medically-important pathogens such as ZIKV and other related mosquito-borne viruses.

In summary, we showed that *A. theiformis* extract exerts antiviral effect against historical and contemporary strains of ZIKV and four DENV serotypes in mammalian cells by impairing the attachment of the virions to the host cell membrane. *A. theiformis*, an indigenous plant from Reunion island, may thus represent a potential prophylactic agent targeting the entry of two medically relevant flavivirus and could thus be used to treat patients.

Materials and Methods

Cell lines, virus strains and infection. Vero cells (ATCC, CCL-81) and human-derived Huh7.5 hepatoma cells (ATCC, PTA-8561TM; Manassas, Virginia, USA) were cultured in minimum essential medium (MEM: Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 5% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS), 2 mmol.L⁻¹ L-Glutamine, 1 mmol.L⁻¹ sodium pyruvate, 100 U.mL⁻¹ of penicillin, 0.1 mg.mL⁻¹ of streptomycin and 0.5 µg.mL⁻¹ of fungizone (PAN Biotech) under a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. C6/36 *Aedes albopictus* cells (ATCC CRL-1660, Manassas, Virginia, USA) were maintained at 27 °C in Leibovitz's L-15 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 1% P/S, 1% MEM Non-Essential Amino Acids Solution (Gibco) and 2% Tryptose Phosphate Broth (Gibco).

The clinical isolate PF-25013-18 of ZIKV (ZIKV-PF13) has been previously described²³ and was amplified on Vero cells. ZIKV-MR766 and GFP-expressing strain of ZIKV-MR766 (ZIKV_{GFP}) are molecular clones of the historical strain MR766 of ZIKV²². Zika strain HD78788 was obtained from the Biological Resource Centre of Pasteur Institute and was grown on C6/36 cells. The clinical isolate of Zika virus (ZK BR 2015/15261) was isolated from a patient with Zika fever from Northeast of Brazil in 2015 and was amplified on C6/36 cells. DENV-1/FGA/89 was isolated in 1989 from a South American patient suffering from DF (GenBank: AF226687). DENV-2/ICC-265 was isolated from a DF patient in Brazil in 2009. DENV3/5532 was isolated in 2007 from a fatal case of dengue with visceral manifestations in a patient in Paraguay (GenBank: HG235027). DENV-4/TVP360 is a laboratory strain that was kindly provided by Dr. Ricardo Galler (Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil; GenBank: KU513442). DENV stocks were grown in C6/36 cells and titrated by foci-forming immunodetection assay.

Cells were infected with the different viruses at a multiplicity of infection of 1, unless stated otherwise.

Antibody. Anti-pan flavivirus E monoclonal antibody 4G2 coupled with Alexa Fluor 594 was purchased from RD Biotech.

Plant material. Fresh aerial parts of *Aphloia theiformis*, *Hubertia ambavilla* and *Ayapana triplinervis* were collected in Reunion Island in January 2016. The voucher specimens were deposited in the Herbarium of the University of Reunion Island.

Extraction of plant material. Fresh aerial parts of *Aphloia theiformis*, *Hubertia ambavilla* and *Ayapana triplinervis* were submitted to solvent-free microwave extraction. The extracts were recovered by gravity after heating 500 g of plant material at 800 W for 20 min at atmospheric pressure using IDCO E200 extractor (IDCO SAS, Marseille, France). After filtration, aqueous phase was lyophilised using cryotec 20 K (Cryotec, Saint-Gély-du-Fesc, France) to produce a brown powder. The crude extracts were solubilised in sterile phosphate buffer saline (PBS) and stored at -80 °C until used for the antiviral assays.

MTT assay. Vero or Huh7.5 cells were cultured in 96-well culture plate at a density of 1×10^4 cells per well and treated with two fold dilutions of plant extracts ranging from 2000 µg.mL⁻¹ to 30 µg.mL⁻¹. After an incubation period of 72 h at 37 °C, cells were rinsed with PBS 1 × and 120 µL of culture medium mixed with 5 mg.mL⁻¹ MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) solution was added. Incubation was extended for 2 h, then MTT medium was removed and the formazan crystals were solubilised with 100 µL of Dimethyl sulfoxide (DMSO). Absorbance was measured at 570 nm with a background subtraction at 690 nm.

Flow cytometry assay. Cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde (PFA) for 20 min, washed twice with PBS and then submitted to a flow cytometric analysis using FACScan flow cytometer (Becton Dickinson). Results were analysed using the Flowjo software.

Cell cycle analysis. Vero cells were seeded at 2×10^5 cells/well in glass bottom 6-well plates. Cell cycle distribution was determined by flow cytometry⁴³. Cells were trypsinised and fixed in 70% ethanol at -20 °C for at least 2 h. Cells were re-suspended in PBS containing 40 µg.mL⁻¹ propidium iodide and 100 µg.mL⁻¹ RNase A. After incubation for 1 h at 37 °C cells were characterised. Data were acquired using the CytExpert software for CytoFLEX (Beckman Coulter). For each experiment, 10^4 cells were analysed.

Immunofluorescence assay. Cells grown on coverslips were fixed with 3.7% of PFA at room temperature (RT) for 10 min. Fixed cells were permeabilised with Triton X-100 (0.15%) in PBS for 4 min and stained using the mouse anti-pan flavivirus envelope E protein mAb 4G2 (1:1,000 dilution). Nucleus was stained with DAPI. The coverslips were mounted with Vectashield (Vector Labs), and fluorescence was observed using a Nikon Eclipse E2000-U microscope. Images were captured and processed using a Hamamatsu ORCA-ER camera and the imaging software NIS-Element AR (Nikon).

Plaque-forming assay. Virus infectious titre was quantified using plaque forming unit assay. Vero cells were seeded in 48-well culture plates at a density of 3×10^4 cells per well and incubated overnight at 37 °C to produce confluent monolayers. Ten-fold serial dilutions of supernatant were prepared in duplicate in culture medium and 0.1 mL of each dilution was added to the cells. Plates were incubated for 2 h at 37 °C, then 0.2 mL of culture medium supplemented with 5% foetal bovine serum (FBS) and 0.8% carboxymethylcellulose sodium salt (Sigma-Aldrich, France) were added, followed by a 4 days incubation at 37 °C. Then, media were removed and cells were fixed (PFA, 3.7%) and stained with 0.5% crystal violet (Sigma-Aldrich, France) diluted in 20% ethanol. Plaques were counted and expressed as plaque-forming unit per mL (PFU.mL⁻¹).

Foci-forming immunodetection assay. Foci-forming immunodetection assay in C6/36 cells was performed by seeding 1×10^5 cells in 24 well plates and incubated overnight at 37 °C. Ten-fold serial dilutions of supernatant were prepared in duplicate in culture medium and 0.4 mL of each dilution was added to cells. After 1 h 30 min, the inoculum was removed and a CMC overlay media (L-15 supplemented with 10% FBS, 0.52% tryptose, 50 mg.mL⁻¹ gentamicin, 1.6% carboxymethylcellulose) was added. The immunostaining was performed after seven days using the mouse monoclonal antibody 4G2 followed by goat-antimouse immunoglobulin conjugated to alkaline phosphatase (Promega, Madison, WI, USA), which was detected by adding a solution of NBT (nitroblue tetrazolium chloride) and BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate p-toluidine salt) (Promega, Madison, WI, USA) as a substrate. Foci were counted and expressed as FFU.mL⁻¹.

Virus inactivation assay. Plant extracts were mixed with ZIKV_{GFP} (5×10^6 PFU.mL⁻¹) and then incubated at 37 °C for 1 h. The mixture was then diluted 50-fold (final virus concentration, 10^5 PFU/well) with MEM, and the virus inocula subsequently added to monolayer of Vero cells seeded in 6-well plates. As control, ZIKV_{GFP} was mixed with plant extracts, immediately to 50-fold diluted (no incubation period), and added to Vero cells for infection. After 2 h of adsorption at 37 °C, the diluted inocula were discarded, and the cells were washed twice with PBS. The cells were further incubated with fresh medium at 37 °C for 24 h before being subjected to flow cytometry as above described.

Negative and immunogold staining of ZIKV particles. Clarified supernatants of HD78-infected C6/36 cells were incubated for 10 min with plant extracts at RT (*A. triplinervis* and *A. theiformis* at a final concentration of 500 µg.mL⁻¹, EGCG at a final concentration of 50 µM). The preparations were filtered through a 0.45 µm filter, absorbed into a formvar/carbon coated negatively discharged EM grids for 10 min at RT and then fixed for 20 min in PFA 4%. Samples were quenched with 50 mM NH₄Cl, blocked in PBS with 1% BSA and immunolabeled with anti-Env MAb for 20 min in PBS with 1% BSA followed by protein A-gold (10 nm) treatment for 15 min. Finally, samples were fixed with 2.5% Glutaraldehyde in 1X Sodium Cacodylate buffer, stained for 1 min with 2% aqueous uranyl acetate, washed for three times with ultrapure water and dried for 30 min. Images were recorded with TECNAI SPIRIT 120Kv equipped with a bottom-mounted EAGLE 4Kx4K camera.

Quantification of the number of infected cells by fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) and confocal analysis. Vero cells were seeded at 0.5×10^4 cells/well in glass bottom 96-well plates (Eppendorf) and infected with ZKV-PF13 or MR766 strains at MOI of 1 for 24 h. Alternatively, ZIKV strains were pre-incubated for 1 h at 37 °C with plant extracts in DMEM before infection (*A. triplinervis* and *A. theiformis* at a final concentration of 500 µg.mL⁻¹, EGCG at a final concentration of 50 µM). After fixation with 4% PFA for 30 min at RT, cells were stained with wheat germ agglutinin (WGA) 488 conjugate (Thermo Fisher) in PBS-BSA 0.5% over night at 4 °C. After immunostaining, ZIKV plus strand RNA from both strains was detected following the manufacturer's protocol (ViewRNA ISH Cells Assays) using probe sets designed by Affymetrix. Alexa-Fluor 546-conjugated ZIKV probe set recognizes a region between nt position 2 and 1144 of the ZIKV genome. Nuclei were stained with NucBlue (Thermo Fisher Scientific) for 15 min at RT. Images were acquired with a Zeiss LSM 700 laser scanning confocal microscope equipped with a X63 objective. Images were processed with Zen2 (blue edition) software and analysed with the ICY software (icy.bioimageanalysis.org) using the Spot Detector plugin.

Virus binding assay. Virus binding assay was performed as previously described²². Briefly, Vero cells were seeded at 2×10^5 cells/well in 6-well plates. Cell monolayers were washed in cold PBS and cooled at 4 °C at least 30 min in presence of cold MEM supplemented with 5% FBS. Pre-chilled cells were incubated at 4 °C with MR766-ZIKV at MOI of 1 with or without of *A. theiformis* extract. After 1 h of incubation, the virus input was removed and the cell monolayers were washed with cold MEM supplemented with 2% FBS. Samples were then subjected to RT-qPCR.

RT-qPCR. Total RNA including genomic viral RNA was extracted from cells with RNeasy kit (Qiagen) and reverse transcribed using E reverse primer and M-MLV reverse transcriptase (Life Technologies) at 42 °C for 50 min. Quantitative PCR was performed on a CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Briefly, cDNA were amplified using 0.2 µM of each primer and 1 × GoTaq Master Mix (Promega). For each single-well amplification reaction, a threshold cycle (Ct) was calculated using the CFX96 program (Bio-Rad) in the exponential phase of amplification. Relative changes in gene expression were determined using the $\Delta\Delta Ct$ method and reported relative to the control. The primers used in this study were previously reported in²². A synthetic gene coding for nucleotides 954 to 1306 of the MR766 strain (GenBank: LC002520) cloned in the pUC57 plasmid was used as template to generate a standard curve, which then served to make absolute quantitation of bound viruses.

Virus entry assay. Vero cells were seeded at 1.2×10^4 cells/well in glass bottom 96-well plates (Eppendorf) and infected with ZIKV HD78 or MR766 strains at MOI of 500 for 1 h at 4 °C. Alternatively, ZIKV strains were pre-incubated for 1 h at 37 °C with plant extracts in DMEM before infection (*A. triplinervis* and *A. theiformis* at a final concentration of 500 µg.mL⁻¹, EGCG at a final concentration of 50 µM). Cells were then shifted at 37 °C for 90 min and fixed with 4% PFA for 30 min at RT. FISH assays were performed as indicated above.

Statistical analysis. Comparison between different concentrations was done by a one-way ANOVA test. All values were expressed as mean ± SD of at least three independent experiments. All statistical tests were done using the software Graph-Pad Prism version 6.0. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant for a Dunnett's multiple comparisons test. Degrees of significance are indicated on the figure as follow: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns = not significant.

References

- Chen, J. *et al.* Outcomes of Congenital Zika Disease Depend on Timing of Infection and Maternal-Fetal Interferon Action. *Cell reports* **21**, 1588–1599 (2017).
- Moreira-Soto, A. *et al.* Evidence for Congenital Zika Virus Infection From Neutralizing Antibody Titers in Maternal Sera, Northeastern Brazil. *The Journal of infectious diseases* **216**, 1501–1504 (2017).
- Duggal, N. K. *et al.* Frequent Zika Virus Sexual Transmission and Prolonged Viral RNA Shedding in an Immunodeficient Mouse Model. *Cell reports* **18**, 1751–1760 (2017).
- Govero, J. *et al.* Zika virus infection damages the testes in mice. *Nature* **540**, 438–442 (2016).
- Ma, W. *et al.* Zika Virus Causes Testis Damage and Leads to Male Infertility in Mice. *Cell* **168**, 542 (2017).
- Fernandez-Garcia, M. D., Mazzon, M., Jacobs, M. & Amara, A. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell host & microbe* **5**, 318–328 (2009).
- Hasan, S. S., Sevvana, M., Kuhn, R. J. & Rossmann, M. G. Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. *Nature structural & molecular biology* **25**, 13–20 (2018).
- Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. Molecular biology of flaviviruses. *Advances in virus research* **59**, 23–61 (2003).
- Meertens, L. *et al.* Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell reports* **18**, 324–333 (2017).
- Wang, Q. Y. & Shi, P. Y. Flavivirus Entry Inhibitors. *ACS infectious diseases* **1**, 428–434 (2015).
- Byler, K. G., Ogungbe, I. V. & Setzer, W. N. *In-silico* screening for anti-Zika virus phytochemicals. *Journal of molecular graphics & modelling* **69**, 78–91 (2016).
- Powers, C. N. & Setzer, W. N. An *In-Silico* Investigation of Phytochemicals as Antiviral Agents Against Dengue Fever. *Combinatorial chemistry & high throughput screening* **19**, 516–536 (2016).
- Carneiro, B. M., Batista, M. N., Braga, A. C. S., Nogueira, M. L. & Rahal, P. The green tea molecule EGCG inhibits Zika virus entry. *Virology* **496**, 215–218 (2016).
- Mounce, B. C., Cesaro, T., Carrau, L., Vallet, T. & Vignuzzi, M. Curcumin inhibits Zika and chikungunya virus infection by inhibiting cell binding. *Antiviral research* **142**, 148–157 (2017).
- Sharma, N., Murali, A., Singh, S. K. & Giri, R. Epigallocatechin gallate, an active green tea compound inhibits the Zika virus entry into host cells via binding the envelope protein. *International journal of biological macromolecules* **104**, 1046–1054 (2017).
- Jonville, M. C. *et al.* Antiplasmodial, anti-inflammatory and cytotoxic activities of various plant extracts from the Mascarene Archipelago. *Journal of ethnopharmacology* **136**, 525–531 (2011).
- Jonville, M. C. *et al.* Screening of medicinal plants from Reunion Island for antimalarial and cytotoxic activity. *Journal of ethnopharmacology* **120**, 382–386 (2008).
- Marimoutou, M. *et al.* Antioxidant polyphenol-rich extracts from the medicinal plants *Antirhea borbonica*, *Doratoxylon apetalum* and *Gouania mauritiana* protect 3T3-L1 preadipocytes against H₂O₂, TNF α and LPS inflammatory mediators by regulating the expression of superoxide dismutase and NF- κ B genes. *Journal of inflammation (London, England)* **12**, 10 (2015).
- Poullain, C., Girard-Valenciennes, E. & Smadja, J. Plants from reunion island: evaluation of their free radical scavenging and antioxidant activities. *Journal of ethnopharmacology* **95**, 19–26 (2004).
- Hsoidrou, S. *et al.* Phytochemical screening, immunomodulatory and anti-inflammatory activities of the phenolic fraction of *Aphloia theiformis* (Vahl) Benn. plant used in comorian traditional medicine. *Phytothérapie* **12**, 354–359 (2014).
- Gadea, G. *et al.* A robust method for the rapid generation of recombinant Zika virus expressing the GFP reporter gene. *Virology* **497**, 157–162 (2016).
- Bos, S. *et al.* The structural proteins of epidemic and historical strains of Zika virus differ in their ability to initiate viral infection in human host cells. *Virology* **516**, 265–273 (2018).
- Frumence, E. *et al.* The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells leading to IFN- β production and apoptosis induction. *Virology* **493**, 217–226 (2016).
- Vazquez-Calvo, A., Jimenez de Oya, N., Martin-Acebes, M. A., Garcia-Moruno, E. & Saiz, J. C. Antiviral Properties of the Natural Polyphenols Delphinidin and Epigallocatechin Gallate against the Flaviviruses West Nile Virus, Zika Virus, and Dengue Virus. *Frontiers in microbiology* **8**, 1314 (2017).
- Barreto-Vieira, D. F. *et al.* Structural investigation of C6/36 and Vero cell cultures infected with a Brazilian Zika virus. *Plos one* **12**, e0184397 (2017).
- Frabasile, S. *et al.* The citrus flavanone naringenin impairs dengue virus replication in human cells. *Scientific reports* **7**, 41864 (2017).
- Cruz, D. J. *et al.* High content screening of a kinase-focused library reveals compounds broadly-active against dengue viruses. *Plos neglected tropical diseases* **7**, e2073 (2013).
- Estoppey, D. *et al.* The Natural Product Cavinafungin Selectively Interferes with Zika and Dengue Virus Replication by Inhibition of the Host Signal Peptidase. *Cell reports* **19**, 451–460 (2017).
- Lani, R. *et al.* Antiviral activity of selected flavonoids against Chikungunya virus. *Antiviral research* **133**, 50–61 (2016).
- Galabov, A. S. Virucidal agents in the eve of manorapid synergy. *GMS Krankenhaushygiene interdisziplinär* **2**, Doc18 (2007).
- Calland, N. *et al.* Polyphenols Inhibit Hepatitis C Virus Entry by a New Mechanism of Action. *Journal of virology* **89**, 10053–10063 (2015).
- Huang, H. C. *et al.* (–)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits entry of hepatitis B virus into hepatocytes. *Antiviral research* **111**, 100–111 (2014).
- Kim, M. *et al.* Inhibition of influenza virus internalization by (–)-epigallocatechin-3-gallate. *Antiviral research* **100**, 460–472 (2013).
- Isaacs, C. E. *et al.* Epigallocatechin gallate inactivates clinical isolates of herpes simplex virus. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **52**, 962–970 (2008).
- Picot, M. C. N. & Mahomoodally, M. F. Effects of *Aphloia theiformis* on key enzymes related to diabetes mellitus. *Pharmaceutical biology* **55**, 864–872 (2017).
- de Boer, H. J. *et al.* Anti-fungal and anti-bacterial activity of some herbal remedies from Tanzania. *Journal of ethnopharmacology* **96**, 461–469 (2005).
- Mootoosamy, A. & Fawzi Mahomoodally, M. Ethnomedicinal application of native remedies used against diabetes and related complications in Mauritius. *Journal of ethnopharmacology* **151**, 413–444 (2014).
- Neergheen-Bhujun, V. S., Munogee, N. & Coolen, V. Antioxidant and anti-inflammatory efficacies of polyherbal formulations and elixirs traditionally used in Mauritius for the treatment of rheumatoid arthritis. *Journal of Herbal Medicine* **4**, 1–9 (2014).
- Gabaston, J. *et al.* Stilbenes from grapevine root: a promising natural insecticide against *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Pest Science* (2018).
- Oo, A. *et al.* Deciphering the potential of baicalin as an antiviral agent for Chikungunya virus infection. *Antiviral research* **150**, 101–111 (2018).
- Zandi, K. *et al.* Extract of *Scutellaria baicalensis* inhibits dengue virus replication. *BMC complementary and alternative medicine* **13**, 91 (2013).
- Zandi, K. *et al.* Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. *Virology journal* **8**, 560 (2011).
- Boulay, K. *et al.* Cell cycle-dependent regulation of the RNA-binding protein Staufen1. *Nucleic acids research* **42**, 7867–7883 (2014).

Acknowledgements

We are grateful to Claude Marrodon for helpful discussion on ethnopharmacological uses of plants. We thank Ségolène Gracias for production of ZIKV-HD78 stocks as well as Marie Watson, Laurent Janci (Extraits De Bourbon) and Claire Desvignes for contribution in plant extracts preparation. This project was supported by Research Federation BioST, University of La Reunion, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut Pasteur, CAPES-COFECUB Me889/17 ZIKANET project and ZIKAlert project (European Union-Région Réunion programme under grant agreement n° SYNERGY: RE0001902). E.C. is supported by a grant DIREED from the Conseil Régional de La Réunion, France and L.S. is supported by the Pasteur Paris University (PPU) International PhD program through an 'Institut Carnot Pasteur Maladies Infectieuses' grant.

Author Contributions

N.J., C.N.D.S., P.D. and C.E. designed the experiments and the conception of the study. E.C., L.S., A.C.K., G.G., O.G. and C.E. carried out the experiments. E.C., L.S., A.C.K., W.V., G.G., P.K.T., P.D., P.G., C.N.D.S., P.M., N.J. and C.E. analysed the data. N.J. and C.E. wrote the manuscript. P.D. and C.E. acquired the funding. All authors have read and approved the final manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29183-2>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

LETTRÉ D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussigné(e) **Clain Marie Elodie** en ma qualité de doctorant(e) de l'Université de La Réunion, déclare être conscient(e) que le plagiat est un acte délictueux passible de sanctions disciplinaires. Aussi, dans le respect de la propriété intellectuelle et du droit d'auteur, je m'engage à systématiquement citer mes sources, quelle qu'en soit la forme (textes, images, audiovisuel, internet), dans le cadre de la rédaction de ma thèse et de toute autre production scientifique, sachant que l'établissement est susceptible de soumettre le texte de ma thèse à un logiciel anti-plagiat.

Fait à Saint-Denis le : 06/11/2018

Signature :



Extrait du Règlement intérieur de l'Université de La Réunion
(validé par le Conseil d'Administration en date du 11 décembre 2014)

Article 9. Protection de la propriété intellectuelle – Faux et usage de faux, contrefaçon, plagiat

L'utilisation des ressources informatiques de l'Université implique le respect de ses droits de propriété intellectuelle ainsi que ceux de ses partenaires et plus généralement, de tous tiers titulaires de ces droits.

En conséquence, chaque utilisateur doit :

- utiliser les logiciels dans les conditions de licences souscrites ;
- ne pas reproduire, copier, diffuser, modifier ou utiliser des logiciels, bases de données, pages Web, textes, images, photographies ou autres créations protégées par le droit d'auteur ou un droit privatif, sans avoir obtenu préalablement l'autorisation des titulaires de ces droits.

La contrefaçon et le faux

Conformément aux dispositions du code de la propriété intellectuelle, toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle d'une œuvre de l'esprit faite sans le consentement de son auteur est illicite et constitue un délit pénal.

L'article 444-1 du code pénal dispose : « Constitue un faux toute altération frauduleuse de la vérité, de nature à causer un préjudice et accomplie par quelque moyen que ce soit, dans un écrit ou tout autre support d'expression de la pensée qui a pour objet ou qui peut avoir pour effet d'établir la preuve d'un droit ou d'un fait ayant des conséquences juridiques ».

L'article L335_3 du code de la propriété intellectuelle précise que : « Est également un délit de contrefaçon toute reproduction, représentation ou diffusion, par quelque moyen que ce soit, d'une œuvre de l'esprit en violation des droits de l'auteur, tels qu'ils sont définis et réglementés par la loi. Est également un délit de contrefaçon la violation de l'un des droits de l'auteur d'un logiciel (...) ».

Le plagiat est constitué par la copie, totale ou partielle d'un travail réalisé par autrui, lorsque la source empruntée n'est pas citée, quel que soit le moyen utilisé. Le plagiat constitue une violation du droit d'auteur (au sens des articles L 335-2 et L 335-3 du code de la propriété intellectuelle). Il peut être assimilé à un délit de contrefaçon. C'est aussi une faute disciplinaire, susceptible d'entraîner une sanction.

Les sources et les références utilisées dans le cadre des travaux (préparations, devoirs, mémoires, thèses, rapports de stage...) doivent être clairement citées. Des citations intégrales peuvent figurer dans les documents rendus, si elles sont assorties de leur référence (nom d'auteur, publication, date, éditeur...) et identifiées comme telles par des guillemets ou des italiques.

Les délits de contrefaçon, de plagiat et d'usage de faux peuvent donner lieu à une sanction disciplinaire indépendante de la mise en œuvre de poursuites pénales.