



HAL
open science

Caractérisations chimique et biologique des substances naturelles issues de plantes médicinales malgaches dans le cadre de la lutte contre l'arbovirus dengue

Fenia Diane Ramiharimanana

► To cite this version:

Fenia Diane Ramiharimanana. Caractérisations chimique et biologique des substances naturelles issues de plantes médicinales malgaches dans le cadre de la lutte contre l'arbovirus dengue. Sciences agricoles. Université de la Réunion, 2022. Français. NNT : 2022LARE0045 . tel-04049930

HAL Id: tel-04049930

<https://theses.hal.science/tel-04049930>

Submitted on 29 Mar 2023

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
Ecole doctorale « Science Technologies et Santé » E.D.542

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de:

Docteur en Biologie Médicale et Santé

**Caractérisations chimique et biologique des substances naturelles
issues de plantes médicinales malgaches dans le cadre de la lutte
contre l'arbovirus dengue**

Présentée par

Fenia Diane RAMIHARIMANANA

Soutenance publique le 13 Décembre 2022

Composition du jury :

Dr Estelle Metay	Université de Lyon 1	Rapportrice
Dr Fanny Roussi	Université de Paris Saclay	Rapportrice
Dr Karin Séron	Université de Lille	Examinatrice
Pr Marc Lemaire	Université d'Antananarivo/Lyon 1	Examineur / Président de jury
Pr Voahangy Ramanandraibe	Univerité d'Antananarivo	Co-Directrice de thèse
Dr Chaker El Kalamouni	Université de La Réunion	Directeur de thèse

A ma petite maman
En mémoire de mon père

Avant-propos

Cette thèse a été financée par l'intermédiaire d'une Allocation Régionale de Recherche (ARR) de la Région Réunion et avec le soutien du projet de recherche PHYTODENGUE (FEDER-INTERREG, N° Synergie RE0028005).

Les travaux de recherche menés durant cette thèse ont été réalisés en collaboration entre deux laboratoires :

- UMR PIMIT (Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical) de l'Université de La Réunion ;
- LIA (Laboratoire International Associé) de l'Université d'Antananarivo – Université Claude Bernard Lyon 1.

Une partie des travaux de recherche ont été également menés avec trois autres partenaires :

- Instituto Carlos Chagas, Fiocruz, Curitiba, Brésil ;
- Institut de Chimie de Substances Naturelles, Gif-sur-Yvette ;
- UMR DéTROI (Diabète athérombose Thérapies Réunion Océan Indien).

Remerciements

En premier lieu, je remercie Dieu pour sa Force, son Courage, sa Bénédiction et surtout Son Amour qui m'ont accompagné pour réaliser ce modeste travail. Que Son Nom soit Loué, Glorifié et Sanctifié pour les siècles des siècles.

Mes vifs remerciements s'adressent au directeur de l'UMR PIMIT, Dr Patrick Mavingui, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

J'adresse également mes remerciements à mon directeur de thèse, le Dr Chaker El Kalamouni des conseils, de l'attention, de l'aide et du soutien que vous m'avez accordé tout au long de ces trois années.

Je tiens à remercier ma co-directrice de thèse, également la directrice du LIA, Pr Voahangy Vestalys Ramanandraibe pour son accueil, son intérêt et ses conseils durant mon parcours au sein de son laboratoire.

Sans vous deux, cette thèse n'aurait pas eu lieu. Je vous suis très reconnaissante de m'avoir accordé votre confiance.

Je tiens à exprimer mes remerciements à l'ensemble des membres de jury de thèse pour nous avoir fait l'honneur de participer à ce jury malgré vos multiples responsabilités. Vos remarques et suggestions seront appréciées afin d'améliorer mon travail :

- Dr. Estelle Metay et Dr Fanni Roussi, en tant que rapportrices
- Dr Karin Séron et Pr. Marc Lemaire en tant qu'examineurs

Mes remerciements vont également aux membres de mon comité de suivi de thèse, Dr Karin Séron, Dr Marc Litaudon et Pr Marc Lemaire pour les précieux conseils et suggestions ainsi que l'intérêt que vous avez témoigné pour ce travail.

Cette thèse a été le fruit d'une collaboration entre divers entités externes ou internes. Je vous présente mes vifs remerciements et ma profonde gratitude :

- Le CNRE de l'Université d'Antananarivo en particulier Dr Rahanira Ralambondrahety et Mr Maminiaina Andrianavalonirina
- Le CASYEN ICBMS de l'Université Claude Bernard Lyon 1 en particulier Mme Marie-Christine Duclos et Dr Vincent Denavit
- L'ICSN Gif-sur-Yvette de l'Université Paris Saclay en particulier Dr Cécile Appel

- L'institut Carlos Chagas, Fiocruz au Brésil
- L'UMR Détroit en particulier Dr Nicolas Diotel
- L'Ecole des Sciences Pharmaceutiques de l'Université de Genève en particulier Dr Muriel Cuendet

Je tiens à remercier le Dr Sébastien Bénard pour son accueil, ses conseils, son implication et sa bonne humeur durant mes journées de manipulation au laboratoire de chimie CYROI.

Mes vifs remerciements vont également à tous les membres de l'UMR Pimit, de l'équipe MOCA dirigé par Pr Philippe Desprès pour l'accueil, les connaissances et les savoirs que nous avons pu partager.

Je remercie chaleureusement tous les membres du LIA sous la responsabilité du Dr Andrianjafy Mbolatiana Tovo d'avoir partagé avec moi ce long parcours.

A tous les collègues qui sont devenus mes amis, que ce soit à la Réunion ou à Madagascar, je vous remercie de votre présence, vos conseils, vos encouragements, vos soutiens. Je suis contente d'avoir vécu ce voyage avec vous et heureuse d'avoir fait votre connaissance.

Merci à mes stagiaires M2 pour leur contribution à l'avancement de cette thèse.

Je remercie vivement le Dr Juliano Haddad de m'avoir formé et initié dans le monde de la virologie. Merci pour ta patience, ta disponibilité, ta bonne humeur et tes conseils. Je te suis reconnaissante pour tout ce que tu as fait dans la réalisation de cette thèse. Bonne continuation et bonne chance pour la suite.

Je ne saurai terminer cette page sans exprimer mes profondes reconnaissances à :

- Toute ma famille ainsi que ma belle famille
- Mes frères et sœurs pour leur soutien et leurs encouragements
- Mes nièces et mon neveu pour leur tendresse
- Ma mère pour ses prières et son amour. Tu es ma motivation.
- Mon mari d'avoir été toujours là dans les bons moments comme dans les mauvais. Je te remercie infiniment pour ton amour, ta patience, ta compréhension et ton éternel soutien.

Mes sincères remerciements s'adressent à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

Sommaire

AVANT-PROPOS.....	I
REMERCIEMENTS.....	III
SOMMAIRE.....	V
LISTE DES ABREVIATIONS.....	IX
LISTE DES FIGURES.....	XXI
LISTE DES SCHEMAS.....	XXV
LISTE DES TABLEAUX.....	XXVII
RESUME.....	XXIX
ABSTRACT.....	XXXI
INTRODUCTION GENERALE.....	1
PARTIE I- ELEMENTS BIBLIOGRAPHIQUES.....	5
A. LES ARBOVIROSES.....	7
I. ARBOVIRUS.....	7
I-1. Définition et classification.....	7
I-2. Arboviroses émergentes.....	10
II. FLAVIVIRUS.....	12
II-1. Définition et classification.....	12
II-2. Biologie des flavivirus.....	13
III. ZIKA.....	18
III-1. Historique.....	18
III-2. Mode de transmission.....	20
III-3. Épidémiologie.....	21
III-4. Physiopathologie.....	23
IV. DENGUE.....	25
IV-1. Historique.....	25
IV-2. Mode de transmission.....	26
IV-3. Épidémiologie mondiale de la dengue.....	27
IV-4. Épidémiologie de la dengue à La Réunion.....	29
IV-5. Physiopathologie.....	30
V. STRATEGIES ADOPTEES POUR LA LUTTE CONTRE LE ZIKA ET LA DENGUE.....	34
V-1. Moyens préventifs contre les arbovirus.....	34

V-1-1. La lutte antivectorielle	34
V-1-2. Les vaccins	35
V-2. Moyens curatifs contre les arbovirus : les antiviraux	37
B. LA BIODIVERSITE VEGETALE : SOURCE DE MOLECULES BIOACTIVES CONTRE LE ZIKA ET LA DENGUE	43
I. LES PLANTES COMME UNE SOURCE DES MOLECULES A ACTIVITE ANTIVIRALE	43
II. LES PRODUITS NATURELS D'ORIGINE VEGETALE ANTI-ZIKA ET ANTI-DENGUE	44
II-1. Action directe des substances naturelles au niveau de la particule virale	48
II-2. Action des substances naturelles au niveau de l'entrée virale	49
II-3. Action des substances naturelles au niveau des phases tardives du cycle viral	50
III. LA BIODIVERSITE VEGETALE DE MADAGASCAR COMME SOURCE POTENTIELLE DES SUBSTANCES NATURELLES ACTIVES CONTRE ZIKV ET DENV	51
III-1. Contexte de la biodiversité végétale de Madagascar	51
III-2. Objectifs de la valorisation de la biodiversité végétale malgache	53
III-3. Critères de sélection de plantes malgaches	53
C. LES FLAVONOÏDES : MOLECULES A LARGE SPECTRE ANTIVIRAL	67
I. CONTEXTE DE L'ÉTUDE DES FLAVONOÏDES	67
II. LES FLAVONOÏDES	68
II-1. Structure chimique et classification	68
II-2. Distribution et répartition	70
II-3. Biosynthèse	71
II-4. Rôles, propriétés physico-chimiques et biodisponibilité	73
III. LA QUERCETINE ET L'ISOQUERCITRINE	81
III-1. Résultats préliminaires sur l'activité antivirale de l'isoquercitrine	82
III-2. Objectif de l'étude sur les dérivés de la quercétine	83
III-3. Hypothèses et stratégies menées pour élucider la relation entre la structure et l'activité antivirale des dérivés de la quercétine	84
IV. SYNTHÈSE CHIMIQUE DES DÉRIVÉS DE FLAVONOÏDES	86
IV-1. O-Alkylation des flavones	86
IV-2. O-Acétylation	90
IV-3. Glycosylation	91
PARTIE II- RESULTATS ET DISCUSSION	95
A. CARACTERISATION ANTIVIRALE DES PLANTES MEDICINALES MALGACHES CONTRE LE VIRUS ZIKA ET LE VIRUS DE LA DENGUE	97
I. ÉCHANTILLONNAGE DES PLANTES MEDICINALES MALGACHES SELECTIONNEES	97
I-1. Criblage antivirale des plantes médicinales malgaches sélectionnées	98

I-2.	<i>Caractérisation de l'activité antivirale et de la cytotoxicité des plantes actives</i>	100
II.	EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIVIRALE DE <i>S. ERICOIDES</i> , <i>S. INULOIDES</i> ET <i>W. INDICA</i> CONTRE LA SOUCHE EPIDEMIQUE ZIKV ET DES ISOLATS CLINIQUES DE LA DENGUE	103
II-1.	<i>Activité antivirale des extraits de plantes actives contre la souche épidémique ZIKV</i>	103
II-2.	<i>Activité antivirale des extraits de plantes actives contre le virus de la dengue</i>	104
II-3.	<i>Mécanisme d'action antivirale de S. ericoides, S. inuloides et W. indica</i>	106
II-3-1.	Activité directe de <i>S. ericoides</i> et <i>W. indica</i> au niveau de la particule virale	108
II-3-2.	Inhibition de l'attachement viral par <i>S. ericoides</i> , <i>S. inuloides</i> et <i>W. indica</i>	109
III.	ÉVALUATION DE LA TOXICITE <i>IN VIVO</i> DE <i>S. ERICOIDES</i> ET <i>S. INULOIDES</i> DANS UN MODELE DE POISSON ZEBRE	111
IV.	ANALYSE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DE <i>S. ERICOIDES</i> ET <i>S. INULOIDES</i> PAR CLUHP-SM ² ET COMPARAISON DES PROFILS CHIMIQUES PAR UNE APPROCHE DE RESEAU MOLECULAIRE	114
V.	TENTATIVE D'IDENTIFICATION CHIMIQUE DES MOLECULES ACTIVES DE <i>W. INDICA</i>	118
V-1.	<i>Fractionnement bio-guidé de l'extrait de W. indica</i>	118
V-2.	<i>Analyse de la composition chimique de la fraction active de W. indica par CLUHP-SM²</i> .	121
V-3.	<i>Caractérisation de l'activité antivirale d'une série d'alcaloïdes quinoléiques isolés de W. indica</i>	122
 B. ÉTUDE DE LA RELATION ENTRE LA STRUCTURE CHIMIQUE DES FLAVONOLS ET LEURS ACTIVITES ANTIVIRALES		
		125
I.	SYNTHESE DES DERIVES PEU POLAIRES DE LA QUERCETINE : ALKYLES ET ACETYLES	126
I-1.	<i>O-Alkylation de la quercétine</i>	126
I-2.	<i>Dérivés O-acétylés de la quercétine</i>	130
I-3.	<i>Caractérisation de l'activité antivirale du composé (12)</i>	130
II.	SYNTHESE DES DERIVES POLAIRES DE LA QUERCETINE	133
II-1.	<i>Dérivé polyoxyéthyléné</i>	133
II-2.	<i>Dérivés glycosylés</i>	134
 CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES		143
I.	CARACTERISATION DES PLANTES MEDICINALES MALGACHES ACTIVES CONTRE ZIKV ET DENV	144
II.	ÉTUDE DE LA RELATION ENTRE LA STRUCTURE CHIMIQUE DES DERIVES DE FLAVONES/FLAVONOLS ET LEUR ACTIVITE ANTIVIRALE	146
 MATERIELS ET METHODES		154
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		165
 ANNEXES		220

Liste des abréviations

+ssARN : Acide ribonucléique simple brin positif

-ssARN : Acide ribonucléique simple brin négatif

α : Alpha

β : Bêta

° : Degré

°C : Degré Celsius

% : Pourcentage

7-DMA : 7-déaza-2'-C-méthyladénosine

80S ribosomes : Ribosomes eucaryotiques

A2780 : Cellules cancéreuses de l'ovaire humain

A549 : Cellules épithéliales humaines

AAK 1 : Adaptor-Associated protein Kinase 1

Ac : Acide

AcOEt : Acétate d'éthyle

ADDM : Azodicarbonyle dimorpholide

ADE : Antibody Dependent Enhancement

ADN : Acide désoxyribonucléique

Ae : *Aedes*

AE : Economie d'atome

AP-1 : Protéine activatrice

AP-61 : Cellules d' *A. pseudoscutellaris*

Aq : Aqueux

ARN : Acide ribonucléique

AS : Aurone synthase

ATCC : American Type Culture Collection

ATPase : Adénosine triphosphate enzyme

AXL : Récepteur tyrosine kinase codée par le gène AXL

BA : Biodisponibilité orale estimée

BCR-ABI : Tyrosine kinase inhibitor

BCRP : Breast Cancer Resistance Protein

BHK 21 : Baby Hamster Kidney (fibroblastes rénaux du bébé hamster)

BnBr : Bromure de benzyle

Br₂ : Dibrome

BTL : Bilitranslocase Transporter

C : Capside

¹³C : Carbone 13

C6/36 : Cellules larvaires de *Aedes albopictus*

CALB : *Candida antarctica* lipase B

CC₅₀ : Concentration cytotoxique à 50%

CH₂Cl₂ : Dichlorométhane

CHCl₃ : Chloroforme

CHI : Chalcone Isomérase

CHIKV : Virus du chikungunya

CHS : Chalcone Synthase

CLUHP-SM2 : Chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à un spectromètre de masse en tandem

C_{max} : Concentration plasmatique maximale

CO₂ : Dioxyde de carbone

CoA : Coenzyme A

CRM1 : Protéine responsable de transport

CS : Indice de Cosine Score

CTRL : Contrôle

DAA : Direct Acting Antiviral

DC : Decne

DCM : Dichlorométhane

DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non Integrin
(Récepteur de lectine de type C)

DDA : Data Dependent Aquisition

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

DEAD : Diéthylazodicarboxylate

DEET : N,N-diéthyl-3-méthylbenzamide

DENV : Virus de la dengue

DENV-1 : Virus de la dengue (sérotipe 1)

DENV-2 : Virus de la dengue (sérotipe 2)

DENV-3 : Virus de la dengue (sérotipe 3)

DENV-4 : Virus de la dengue (sérotipe 4)

DFR : Dihydroflavonol-4-réductase

DHF : Dengue Hemorrhagic Fever

DMF : Diméthylformamide

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DNP : Dictionary of Natural Product

DPPE : 1,2-bis-(diphénylphosphino)éthane

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine

dsARN : Acide ribonucléique double brin positif

DSS : Dengue Shock Syndrome

E : Enveloppe

E1-A226V : Mutant recombinant de CHIKV de sa protéine enveloppe E1

ECSA : East Central South Africa

EGCG : Epigallocatechine gallate

Equiv : Equivalent

Etc : Et cetera

EtOH : Ethanol

Et. al : Et collaborateurs

ex DC : Ex Decne

FCoV : Feline coronavirus

FHT : Flavanone-3-hydrolase

FLS : Flavonol Synthase

FNS I : Flavone synthase I

FNS II : Flavone synthase II

GAGs : Glycosaminoglycanes

GAK : Cyclin-G-Associated Kinase

GAL : Galactose

GBIF : Global Biodiversity Information Facility

GFP : Green Fluorescent Protein

GLC : Glucose

GLUT 2 : Transporteur de glucose 2

GTP : Guanosine triphosphate

h : Heure

¹H : Proton

H : Hydrogène

H1N1 : Virus de la grippe A

H₂ : Dihydrogène

H₂O₂ : Eau oxygénée

H₂SO₄ : Acide sulfurique

HBV : Virus de l'hépatite B

HCl : Acide chlorhydrique

HDA : Host-Directed Antiviral

HeLa : Cellules cancéreuses du col de l'utérus

HEK : Cellules rénales embryonnaire humain

HepG2 : Cellules cancéreuses de foie humain

HIV : Virus de l'immunodéficience humaine

HMG-CoA : Hydroxyméthylglutaryl Co-A reductase

HMDB : Human Metabolome Database

HsP 70/90 : Heat Shock Protein 70/90

HSS : Hollow Structural Section Column

HSV : Virus Herpès Simplex

HuH7 : Cellules hépatiques humaines

I₂ : Diode

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%

ICBMS : Institut de Chimie et de Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires

ICSN : Institut de Chimie des Substances Naturelles

IFN β : Interféron bêta

IFS : Isoflavone Synthase

IgM : Immunoglobine M

IgG : Immunoglobine G

JEG-3 : Cellules hypertriploïde humaines

JEV : Japanese Encephalitis Virus

K⁺ : Ion potassium

K_2CO_3 : Carbonate de potassium

kb : Kilobase

KB : Lignée cellulaire tumorale omniprésente KERATIN-forming HeLa

kDa : Kilodalton

kg : Kilogramme

km : Kilomètre

km^2 : Kilomètre au carré

KOH : Hydroxyde de potassium

LCR : Leucoanthocyanidine reductase

LD₅₀ : Dose létale médiane

LDOX : Leucoanthocyniadine dioxygénase

LIA : Laboratoire International Associé

LLC-MK2 : Cellules épithéliales du rein d'un singe adulte

Log : Logarithme

Log KD : Coefficient de partage sol/eau

Log KOC : Coefficient de partage carbone organique/eau

Log P : Coefficient de partage octanol/eau

μg : Microgramme

μM : Micromolaire

μS : Microseconde

m : Mètre

M : Membranaire

MCT 1 : Transporteur membranaire

MDA-5 : Melanoma Differentiation-Associated protein 5 (récepteur de reconnaissance)

MeOH : Méthanol

MeONa : Méthanolate de sodium

MEM : Modified Eagle's Medium

mg : Milligramme

min : Minute

mL : Millilitre

mM : Millimolaire

MNTC : Concentration maximale non cytotoxique

MOI : Multiplicity of infection

MRC-5 : Fibroblastes embryonnaires humains obtenues à partir d'un unique fœtus avorté en 1966

MRP 1/2 : Transporteurs membranaires

MS 222 : Ethyl-3-aminobenzoate méthane sulfonate

MTT : Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényltetrazolium

MV : Matériel végétal

N : Normal

Na⁺ : Ion sodium

NaOCl : Hypochlorite de sodium

nd : Non déterminé

ni : Non indiqué

NF-κB : Nuclear Factor-Kappa B

NIST : National Institute of Standards and Technology

nm : Nanomètre

nM : nanomolaire

o : Ortho

OAT 1 : Organic Anion Transporter 1

OATP : Organic Anion Transporting Polypeptides

OH : Hydroxyle

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OPPh₃ : Oxyde de phosphine

ORC : Origin Recognition Complex

p : Para

P : Pression

PBS : Tampon phosphate saline

Pd (OH)₂ : Palladium hydroxyde

P-gp : Transporteur membranaire glycoprotéine

pH : Potentiel hydrogène

Ph₂CCl₂ : Dichlorodiphénylméthane

Ph₂O : Diphényléther

PIMIT : Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical

PLA 2 : Phospholipase 2

PFA : Paraformaldéhyde

PFU : Plaque Forming Unit

PMD : *p*-menthane-3,8-diol

polyA : Polyadénosine A

PPh₃ : Triphénylphosphine

Ppm : Partie par million

Prot : Protéine

prM : Précurseur membranaire

PSV : Particules sub-virales

Q3G : Quercétin-3-*O*-glucoside (Isoquercitrine)

R-Br : Bromoalcane

Rdt : Rendement

RdRp : ARN polymérase ARN dépendante

RE : Réticulum endoplasmique

REF : Référence

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RSA : Relation Structure Activité

RTG 1 : Retinoic acid Inducible Gene (récepteur de reconnaissance)

SARS-CoV-2: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2

Sat: Saturé

SEM : Erreur standard de la moyenne

SGB : Syndrome Guillain-Barré

SGLT 1 : Co-transporteur sodium glucose 1

SH-SY5Y : Lignée cellulaire de neuroblastome humain

SI : Index de sélectivité

SM2 : Spectre de masse 2

SMHR : Spectrométrie de Masse à Haute Résolution

sp: Species

STAT: Signal Transduced and Activator of Transcription

SVCT 1 : Sodium-dependent Vitamin C Transporter 1

SVCT 2 : Sodium-dependent Vitamin C Transporter 2

SVF : Sérum de veau foetal

T : Température

TAM : Récepteur tyrosine kinase

TBAI: Tétrabutylammonium iodure

TBEV: Tick-Borne Encephalitis Virus

TDA: Tryptophane désaminase

TEG: Tétraéthylèneglycol

TEMPO : (2, 2, 6, 6-Tétraméthylpipéridin-1-yl) oxy

TGN : Trans-Golgi

THF : Tetrahydrofurane

THQ: Thymohydroquinone

TIM : T-cell immunoglobulin and mucin domain

TLR-3 : Récepteur de type ToII intervenant dans l'immunité

Tmax : Temps nécessaire pour atteindre la concentration plasmatique maximale

TYRO3 : Récepteur tyrosine kinase codée par le gène TYRO3

U937 : Cellules issues du lymphome histiocytaire

U937-DC-SIGN : Cellules développées en transduisant des cellules lymphocytaires U-937 avec le gène de la protéine DC SIGN humaine

UMR : Unité Mixte de Recherche

USA : Etats Unis

URAT 1: Anion-exchanging uptake transporter

UTR: Untranslated Transcribed Region

UV : Ultraviolet

V : Volt

v/v : Volume /Volume

Var. : Variety

VC₅₀ : Concentration virucidale à 50%

VP : Vésicule

VRS : Virus respiratoire syncytial

VSV : Stomatite vésiculeuse virus

WFO : World Flora Online

WHO : World Health Organization

WNV : West Nil Virus

YFV : Yellow Fever Virus

ZIKV : Zika Virus

Liste des figures

Figure 1- Cycles de transmission des arbovirus	10
Figure 2- Classification de quelques flavivirus selon leurs vecteurs.....	13
Figure 3- Structure et organisation d'une particule virale d'un flavivirus (Pierson and Diamond, 2020)	14
Figure 4- Cycle de réplication d'un <i>flavivirus</i> (adapté de (Heinz and Stiasny, 2017))	18
Figure 5- Arbre phylogénique de ZIKV selon l'alignement des nucléotides et d'acides aminés (Haddow et al., 2012)	20
Figure 6- Pays et territoires ayant une transmission actuelle ou antérieure du virus zika selon l'OMS (mis à jour Février 2022) (créé avec https://mapchart.net)	23
Figure 7- Distribution de <i>Ae. aegypti</i> et <i>Ae. albopictus</i> dans le monde en 2018 (Kamal et al., 2018). 27	
Figure 8- Photo de <i>Pentopetia sp</i>	56
Figure 9- Distribution des plantes <i>Pentopetia</i> à Madagascar (Secrétariat du GBIF, 2022)	56
Figure 10- Photo des <i>Stenocline</i> : (A) <i>S. ericoides</i> (B) <i>S. inuloides</i> par Andrianaivalonirina M.A.	58
Figure 11- Distribution des <i>Stenocline</i> à Madagascar (1839 à 2022) (A) <i>S. ericoides</i> (Secrétariat de GBIF, 2021a) (B) <i>S. inuloides</i> (Secrétariat de GBIF, 2021b)	59
Figure 12- Photo de <i>W. indica</i> (Secrétariat du GBIF, 2021)	60
Figure 13- Distribution de <i>W. indica</i> à Madagascar (1770-2022) (Secrétariat du GBIF, 2021)	61
Figure 14- Structure de base des flavonoïdes et numérotation adoptée (Cook and Samman, 1996) ...	68
Figure 15- Biosynthèse des flavonoïdes.....	72
Figure 16- Domaines d'absorption UV des flavonoïdes	75
Figure 17- Structures chimiques de la quercétine, l'isoquercitrine, l'hypéroside et le kaempférol	83
Figure 18- Structure chimique de la quercétine.....	86
Figure 19- Criblage antiviral des extraits polaires et apolaires des plantes médicinales malgaches sélectionnées.....	99
Figure 20- Evaluation de la cytotoxicité et de l'activité antivirale des extraits des plantes actives contre ZIKV	101
Figure 21- Activité antivirale des extraits de <i>S. ericoides</i> , <i>S. inuloides</i> et <i>W. indica</i> contre la souche épidémique ZIKV _{BR15}	103

Figure 22- Activité antivirale des extraits de <i>S. ericoides</i> et <i>S. inuloides</i> contre DENV-2.	104
Figure 23- Activité antivirale de l'extrait de <i>W. indica</i> contre les 4 sérotypes du virus de la dengue.	106
Figure 24- Mécanisme d'action antivirale des extraits de <i>S. ericoides</i> , <i>S. inuloides</i> et <i>W. indica</i>	107
Figure 25- Inactivation virale de ZIKV par les extraits de <i>S. ericoides</i> et <i>W. indica</i>	109
Figure 26- Inhibition de l'attachement de ZIKV par les extraits de <i>S. ericoides</i> , <i>S. inuloides</i> et <i>W. indica</i>	110
Figure 27- <i>S. ericoides</i> et <i>S. inuloides</i> n'impactent pas l'activité locomotrice syntonisée à un jour post injection.	113
Figure 28- <i>S. ericoides</i> (vert) et <i>S. inuloides</i> (bleu) sont des espèces riches en polyphénols.	115
Figure 29- Différentes étapes de fractionnement bioguidé de <i>W. indica</i>	118
Figure 30- Mécanisme d'action des fractions F5, F9 et F10 de la fraction F _{DCM} de <i>W. indica</i> lors du cycle viral de ZIKV	120
Figure 31- Représentation des clusters waltheriones présents dans la fraction F9 de <i>W. indica</i>	121
Figure 32- Liste des alcaloïdes quinoléiques isolés de <i>W. indica</i> (Niger) pour évaluation antivirale contre ZIKV et DENV	122
Figure 33- Criblage antiviral des alcaloïdes quinoléiques isolés de <i>W. indica</i> (Niger).....	123
Figure 34- Evaluation de la cytotoxicité et de l'activité antivirale de la waltherione C contre ZIKV ..	124
Figure 35- Structures chimiques de la quercétine, l'isoquercitrine et l'hypérine.....	125
Figure 36- Mécanisme d'action antiviral du composé (12) lors du cycle de ZIKV.	131
Figure 37- Evaluation de l'effet anti-prolifératif du composé (12)	132
Figure 38- Activité antivirale de l'isoquercitrine et du composé (12) contre le sérotype DENV-1 isolé lors de l'épidémie à La Réunion.....	133
Figure 39- Structures chimiques de l'isoquercitrine et de la quercétine	135
Figure 40- Liste des flavones C-glycosylés pour le criblage anti-ZIKV	136
Figure 41- Structures chimiques de l'isoquercitrine et de la baicaline.....	137
Figure 42- Comparaison des structures chimiques et de l'activité antivirale des composé 12 et 23 contre ZIKV	141
Figure 43- Structures chimiques de la quercétine, du composé 12 et de l'isoquercitrine	147

Figure 44- Comparaison des structures chimiques et de l'activité antivirale des composés 12, 23 et 25	149
Figure 45- Comparaison des stuctures chimiques et de l'activité antivirale de l'hypéroside et de l'isoquercitrine	149
Figure 46- Comparaison des structures chimiques et de l'activité antivirale de la quercimeritrine et de l'isoquercitrine	150
Figure 47- Comparaison des structures chimiques et de l'activité antivirale de la quercétine diglucoside et de l'isoquercitrine	151
Figure 48- Comparaison des structures chimiques et de l'activité antivirale de l'astragaline, du composé 20 et de l'isoquercitrine.....	151
Figure 49- Spectre RMN ¹ H (MeOD, 300MHz) de éthyloxyquercétine.....	239
Figure 50- Spectre RMN ¹ H (MeOD, 300MHz) de tétraéthylèneglycoxyquercétine	241

Liste des schémas

Schéma 1- Synthèse de l'isoquercitrine à partir de la rutine	82
Schéma 2- <i>O</i> -alkylation du 2-naphtol par l'acide sulfurique.....	87
Schéma 3- Ethérisation du 4-hydroxycoumarine	88
Schéma 4- Synthèse de l'allylbenzoate par réaction de Mitsunobu	89
Schéma 5- Synthèse de pavonin-4 par réaction de Mitsunobu	89
Schéma 6- Schéma représentatif de l'acétylation de la quercétine par voies chimique ou enzymatique	91
Schéma 7- Synthèse de quercétin-7- <i>O</i> -glucoside et quercétin-7- <i>O</i> -glucuronide.....	93
Schéma 8- Catalyse acide avec la quercétine	126
Schéma 9- Catalyse par transfert de phase avec la quercétine et le bromobutane.....	127
Schéma 10- <i>O</i> -Alkylation de la quercétine par l'éthanol selon la réaction de Mitsunobu	127
Schéma 11- Réaction de Mitsunobu avec la quercétine et le tétraéthylèneglycol	134

Liste des tableaux

Tableau 1- Classification des arbovirus (selon Go et.al, 2014).....	8
Tableau 2- Fonctions des protéines structurales et non structurales des flavivirus (Chong et al., 2019; Blahove and Carter, 2021; Dey et al., 2021)	15
Tableau 3- Isolement des 4 sérotypes de virus de la dengue et classification de leurs génotypes	26
Tableau 4- Surveillance du nombre de cas de dengue confirmés depuis l'épidémie de 2018 (Hafsia et al., 2022; SPF, 2022)	29
Tableau 5- Première infection par les 4 sérotypes de la dengue selon l'âge des patients (Halstead, 2019).....	32
Tableau 6- Les vaccins candidats contre la dengue en phase clinique (Guzman et al., 2017)	36
Tableau 7- Les vaccins candidats contre ZIKV en phase clinique (Lin et al., 2018; Poland et al., 2019)	37
Tableau 8- Liste non exhaustive des antiviraux DAA contre ZIKV et DENV(Troost and Smit, 2020)	39
Tableau 9- Liste non exhaustive des antiviraux HDA contre ZIKV et DENV (Pastorino et al., 2010; Troost and Smit, 2020).....	40
Tableau 10- Liste non exhaustive des extraits de plantes médicinales (ou leur composés actifs) inhibiteurs de l'infection <i>in vitro</i> de ZIKV et DENV	44
Tableau 11- Évaluation de l'activité antivirale <i>in vivo</i> de certaines plantes médicinales contre ZIKV et DENV	47
Tableau 12- Liste non exhaustive des plantes médicinales inhibant les phases tardives du cycle virale de ZIKV et DENV	50
Tableau 13- Liste des plantes médicinales sélectionnées pour l'étude	54
Tableau 14- Composition chimique de <i>W. indica</i>	62
Tableau 15- Activités biologiques de <i>W. indica</i>	63
Tableau 16- Evaluation de la toxicité aigüe de <i>W. indica</i>	65
Tableau 17- Classification des flavonoïdes (Hinderer and Seitz, 1988; Harborne and Williams, 2000)	69
Tableau 18- Exemples de distribution des flavonoïdes dans les fruits et légumes (Chebil, 2006)	70

Tableau 19- Absorption UV des flavonoïdes dans le méthanol	75
Tableau 20- Exemples des études pharmacocinétiques des flavonoïdes (Čvorović et al., 2018)	77
Tableau 21- Quelques flavonoïdes actifs contre ZIKV et DENV	79
Tableau 22- Activité antivirale de l'isoquercitrine contre ZIKV sur différentes lignées cellulaires (Gaudry et al., 2018).....	82
Tableau 23- Liste de plantes sélectionnées pour l'étude (lieu de collecte et rendement d'extraction) 97	
Tableau 24- Paramètres et rendement des extractions pour les 5 plantes anti-ZIKV.....	100
Tableau 25- Evaluation de la cytotoxicité et de l'activité antivirale des extraits des plantes actives contre ZIKV	101
Tableau 26- Activité antivirale de <i>W. indica</i> contre les 4 sérotypes du virus de la dengue	106
Tableau 27- Survie et comportement des poissons injectés des extraits de <i>S. ericoides</i> et <i>S. inuloides</i> pendant les 5 à 7 jours après injection.....	111
Tableau 28- Récapitulatif des métabolites secondaires constitutifs des extraits et à spectres de masse similaires à ceux des bases de données lors de l'analyse HRMS de <i>S. ericoides</i> et <i>S. inuloides</i>	116
Tableau 29- Evaluation de la cytotoxicité et de l'activité antivirale de la waltherione C contre ZIKV	124
Tableau 30- <i>O</i> -Alkylation de la quercétine par l'éthanol selon la réaction de Mitsunobu.....	127
Tableau 31- Evaluation de l'activité antivirale des dérivés éthers de quercétine.....	128
Tableau 32- Evaluation antivirale de dérivés <i>O</i> -acétylés de quercétine contre ZIKV	130
Tableau 33- Réaction de Mitsunobu avec la quercétine et le tétraéthylèneglycol	134
Tableau 34- Liste des flavonols <i>O</i> -glycosylés avec des OH libres pour le test anti-ZIKV	137
Tableau 35- Evaluation de l'activité antivirale des flavonols <i>O</i> -glycosides avec des OH substitués contre ZIKV	139

Résumé

La propagation de la dengue depuis ces dernières décennies en lien avec son hyper-endémicité dans les régions tropicales, mais aussi de plus en plus dans les zones tempérées du globe, souligne l'importance grandissante des maladies infectieuses liées aux virus zoonotiques transmis par les moustiques en ce début du XXI^{ème} siècle. Depuis 2017, La Réunion subit une épidémie de dengue avec une circulation de plusieurs sérotypes et des décès liés à la forme grave de la maladie. À ce jour, il n'existe pas encore de traitements spécifiques contre la dengue. Les îles de l'Océan Indien comme Madagascar, sont classées comme un haut lieu de la biodiversité en raison de leur flore exceptionnelle caractérisée par un taux d'endémicité élevé et une composition chimique diversifiée. Les plantes médicinales malgaches représentent une ressource inestimable de molécules pouvant être exploitées pour contribuer à la recherche des substances naturelles actives contre le virus de la dengue.

Mes travaux de recherches sont subdivisés en deux parties. La première partie s'attache à l'identification des substances naturelles antivirales issues des plantes médicinales malgaches. Le criblage antiviral de 17 plantes médicinales a mis en évidence la capacité de trois espèces, *Stenocline ericoides*, *Stenocline inuloides* et *Waltheria indica*, à prévenir l'infection par le virus de la dengue. Les essais virologiques ont montré que les extraits de ces plantes inhibent l'entrée virale *in vitro* à des concentrations non-cytotoxiques. Les analyses par spectrométrie de masse à haute résolution (SMHR), et l'approche chimoinformatique en utilisant les réseaux moléculaires, appliquées sur les deux espèces de *Stenocline* ont mis en évidence leur richesse en polyphénols et en flavonoïdes ainsi que l'existence des clusters de molécules par espèce impliqués dans les mécanismes d'action antivirale distincts observés. L'évaluation de la toxicité *in vivo* des espèces *S. ericoides* et *S. inuloides* a souligné l'absence de toxicité aiguë et d'impact sur l'activité locomotrice dans un modèle de poisson-zèbre.

La deuxième partie de mes travaux de recherche concerne le développement des substances antivirales à partir des dérivés de la quercétine, substances les plus abondantes dans les sous-produits de transformation des plantes malgaches. Une étude de modification structurale bio-guidée a été menée sur la quercétine et ses dérivés. Pour cela, des dérivés polaires et apolaires de la quercétine ont été synthétisés. L'évaluation de l'activité antivirale d'une cinquantaine de flavones et flavonols *O*-alkylés, *O*-acétylés, *C*-glycosylés et *O*-glycosylés nouvellement synthétisés a mis en exergue l'importance de la partie glucosidique de l'isoquercitrine et l'implication des groupements hydroxyles de la partie aglycone dans son activité antivirale.

Ces résultats ont montré l'importance des plantes malgaches comme source de molécules bioactives dans le cadre de la lutte contre l'arbovirus émergent dengue.

Abstract

The spread of dengue fever in recent decades in connection with its hyper-endemicity in tropical regions, but also increasingly in temperate areas of the globe, underlines the growing importance of infectious diseases linked to zoonotic viruses transmitted by mosquitoes at the beginning of the 21st century. Since 2017, the Reunion Island has been experiencing a dengue epidemic with the circulation of several serotypes and deaths related to the severe form of the disease. To date, there are no specific treatments for dengue fever. The islands of the Indian Ocean, like Madagascar, are classified as a biodiversity hotspot because of their exceptional flora characterized by high endemicity and a diversified chemical composition. Malagasy medicinal plants represent an inexhaustible resource of molecules that can be exploited to contribute to the research of natural substances active against the dengue virus.

My research is divided into two parts. The first part focuses on the identification of natural antiviral substances from Malagasy medicinal plants. Antiviral screening of 17 medicinal plants demonstrated the ability of three species, *Stenocline ericoides*, *Stenocline inuloides* and *Waltheria indica*, to prevent infection with the dengue virus. Virological assays have shown that extracts from these plants inhibit viral entry into human cells at non-cytotoxic concentrations. High resolution mass spectrometry (HRMS) analyses, and chemoinformatics approach, using molecular networks, applied to the two species of *Stenocline*, have been showed the richness of the two species in polyphenols and flavonoids and the existence of clusters of molecules specific per species potentially involved in the distinct mechanism of action observed. The *in vivo* toxicity assessment of *S. ericoides* and *S. inuloides* species highlighted the absence of acute toxicity and impact on locomotor activity in a zebrafish model.

The second part of my research concerns the development of antiviral substances from the derivatives of quercetin, substances most abundant in the transformation by-products of Malagasy plants. A bio-guided structural modification study was conducted on quercetin and its derivatives. For this, polar and apolar derivatives of quercetin have been synthesized. Evaluation of the antiviral activity of about thirty flavones and flavonols O-alkylated, O-acetylated, C-Glycosylated, O-glycosylated highlighted the importance of the glucosidic part of isoquercitrine and the involvement of the hydroxyl groups of the aglycone part in its antiviral activity.

These results showed the importance of Malagasy plants as a source of bioactive molecules in the fight against the emerging dengue arbovirus.

Introduction générale

Les virus de la dengue (DENV) et du zika (ZIKV) sont transmis par le moustique femelle du genre *Aedes* appartenant à la famille *Flaviviridae* et au genre *Flavivirus*. Ils sont endémiques dans les pays situant aux zones tropicales et subtropicales tels que l'Asie, l'Amérique et l'Afrique (Messina et al., 2019).

Comme ces deux pathologies représentent des symptômes cliniques similaires rendant un diagnostic différentiel difficile à obtenir, les données épidémiologiques rapportés sont souvent sous-estimées (Cabral-Castro et al., 2016). Ainsi, la dengue reste l'infection virale la plus répandue parmi les arboviroses transmises par les moustiques (Bos et al., 2018). Chaque année, environ 50 millions d'infections par la dengue sont enregistrées dans le monde et 2,5 milliards de personnes sont situées dans les zones à risque (Bos et al., 2018). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que 500.000 personnes dont une grande proportion d'enfants, sont atteintes annuellement de dengue sévère avec un taux de mortalité de 2,5% (Messina et al., 2019).

A cause de la propagation rapide et étendue de ces arboviroses, l'OMS a déclaré ces virus comme dangereux pour la santé publique (WHO, 2022).

La situation géographique en zone intertropicale de La Réunion et de Madagascar les rend particulièrement vulnérables à l'émergence de ces pathologies. Depuis 2018, une épidémie de dengue a fait son apparition à l'île de La Réunion dont 71 705 cas et 75 décès ont été rapportés (Hafsia et al., 2022). Malgré qu'aucune épidémie de zika n'a été décrite pour La Réunion et Madagascar, les deux îles se trouvent dans une zone à risque élevé par la présence du potentiel vecteur de la maladie (*Ae. albopictus*) et l'existence du virus dans les zones à leur proximité : en Afrique (Cap-vert, Côte d'Ivoire) (Bouree, 2016) et en Inde (Mourya et al., 2016; Gupta et al., 2019).

Actuellement, les traitements de ces maladies reposent uniquement sur le soutien et le suivi des symptômes. Dans ce cadre, il est urgent de concevoir et de développer des vaccins efficaces et des agents antiviraux pour contrôler la charge de morbidité de ces infections. Pour cette raison, des études contribuent au challenge proposé par l'OMS pour la recherche d'antiviraux au moyen des médicaments de seconde utilisation, de la médecine traditionnelle et des dérivés de produits naturels (Farrar et al., 2007).

Depuis l'antiquité, la médecine traditionnelle s'avère être une solution alternative pour le traitement de diverses maladies surtout dans les pays en voie de développement comme Madagascar (Debray, 1975). La Grande Ile se trouve parmi les 35 points chauds du monde dans le domaine de la biodiversité végétale comprenant une richesse floristique prometteuse, source de substances naturelles anti-infectieuses (Myers et al., 2000; Norman, 2003; Mittermeier et al., 2005). Un point chaud est également défini à cause de la destruction de son environnement comme le cas de Madagascar qui a perdu la majorité de sa biodiversité végétale et animale (Jaziri, 2010). En outre, il est important de signaler que l'utilisation de ces plantes médicinales manque un appui scientifique et mérite des investigations pharmacologiques plus approfondies.

Dans le cadre de la lutte contre le zika et la dengue, quelques plantes médicinales traditionnelles ont été démontré comme un potentiel source de composés antiviraux (Abd Kadir et al., 2013; Batista et al., 2019; Ali et al., 2021; Haddad et al., 2021; Chavda et al., 2022). Les résultats récents obtenus au sein de l'UMR PIMIT ont souligné le pouvoir antiviral des plantes médicinales issues des îles de l'Océan Indien contre le zika et la dengue. En effet, il a été montré que les extraits bruts de trois plantes médicinales des Mascareignes (*A. theiformis*, *P. mauritanum* et *D. apetalum*) sont capables d'inhiber l'infection des cellules humaines par le ZIKV ainsi que par les 4 sérotypes DENV. Ces études ont également souligné la richesse de ces extraits de plantes en composés phénoliques avec des squelettes flavonoïdiques et en composés terpéniques (Clain et al., 2018, 2019; Haddad et al., 2019a, 2019b, 2020). Ces résultats prometteurs obtenus offrent la possibilité d'orienter la recherche vers les plantes médicinales malgré que les structures des molécules responsables des activités enregistrées n'aient pas été élucidées.

Une étude récente au sein de l'UMR PIMIT a mis en exergue le potentiel antiviral de l'isoquercitrine *in vitro*. Son mécanisme d'action a été identifié au niveau de l'entrée du ZIKV durant l'étape internalisation (Gaudry et al., 2018). Pour comprendre et identifier les pharmacophores contribuant à son effet antiviral, il est nécessaire d'élaborer des études de relation structure-activité (RSA) sur ce flavonoïde.

Ainsi, mes travaux de recherche s'attachent à valoriser la biodiversité régionale à travers les caractérisations chimique et biologique des molécules bioactives issues des plantes médicinales de Madagascar tout en se focalisant sur les familles des molécules identifiées afin de faire émerger une relation entre la structure chimique et l'activité antivirale.

Mon sujet de thèse prend part à la continuité des études réalisées au sein de l'UMR PIMIT et se divise en deux axes.

- Le premier axe est consacré aux caractérisations phytochimiques et antivirales des plantes médicinales malgaches. Un criblage antiviral sur une liste de plantes malgaches sélectionnées sur la base de critères ethnobotaniques a permis d'identifier trois espèces actives : *Stenocline ericoides*, *Stenocline inuloides* et *Waltheria indica*. Ces trois plantes retenues à l'issue de ce criblage ont fait l'objet d'études chimique et virologique afin de caractériser la composition phytochimique et le mécanisme d'action antivirale.

- Le deuxième axe concerne le développement des substances antivirales à partir des dérivés de la quercétine qui s'avèrent être les substances les plus abondantes dans les sous-produits de transformation des plantes malgaches. Une étude de modification structurale bio-guidée a été menée sur la quercétine et ses dérivés.

Ce manuscrit est constitué de deux grandes parties :

- La première partie (Partie I) regroupe les éléments bibliographiques au sujet des deux flavivirus émergents ZIKV et DENV ; des stratégies de lutte antivirale ; des plantes médicinales malgaches sélectionnées pour l'étude ; un état de l'art des flavonoïdes actifs contre ZIKV et DENV.

- La deuxième partie (Partie II) décrit les résultats et discussion sur les plantes médicinales malgaches actives ainsi que sur l'étude de relation structure-activité menée sur la quercétine et ses dérivés.

L'ouvrage se termine par la présentation d'une conclusion et des perspectives, la description des matériels et méthodes adoptés ainsi que la liste des références bibliographiques consultées.

Partie I- Eléments bibliographiques

B. Les arboviroses

I. Arbovirus

I-1. Définition et classification

Vers la fin du XIX^{ème} siècle, des études ont mis en évidence les rôles essentiels des moustiques dans certaines maladies infectieuses comme la filariose, le paludisme, etc. C'est seulement en 1900 que les recherches menées par Walter Reed et ses collaborateurs, ont démontré le rôle du moustique (*Aedes aegypti*) comme organe vecteur dans l'infection de la fièvre jaune. Et le premier arbovirus a été isolé par Adrian Stokes et ses collaborateurs en 1927 (Reed et al., 1900; Bean, 1983).

Les arbovirus (signifiant en anglais *Arthropode borne virus*) regroupent les virus maintenus dans la nature par la transmission entre les hôtes sensibles, avec l'intermédiaire des arthropodes hématophages comme les moustiques, les tiques, les culicidés, les phlébotomes ainsi que les moucheron piqueurs. (Chippaux, 2003; Barrett and Weaver, 2012; Young et al., 2014; Lefeuvre and Apaire-Marchais, 2021). Ces derniers engendrent des arboviroses qui sont généralement des zoonoses, c'est-à-dire des pathogènes infectieuses des animaux vertébrés pouvant infecter les humains. De nombreux arbovirus sont hautement pathogènes et avaient déjà provoqué un taux élevé de morbidité et de mortalité humaine. (Barrett and Weaver, 2012; Weaver, 2018).

Le catalogue international des arbovirus enregistre plus de 500 arbovirus distribués dans cinq grandes familles. Les deux tiers appartiennent aux familles des *Bunyaviridae*, *Togaviridae* et *Flaviviridae* et le reste se répartit dans les familles de *Rhabdoviridae* et de *Reoviridae*. Suivant la structure de leur génome, les arbovirus peuvent être classés en 3 catégories : les virus à ARN simple brin positif, les virus à ARN simple brin négatif et les virus à ARN double brin (Tableau 1) (Young et al., 2014; Lefeuvre and Apaire-Marchais, 2021).

Tableau 1- Classification des arbovirus (selon (Go et al., 2013))

	Famille	Genre	Vecteur(s)	Propriétés virologiques
+ssARN	Togaviridae 29 virus membres	<i>Alphavirus</i> <i>Rubivirus</i>	Moustiques	Symétrie cubique Diamètre = 70 nm
	Flaviviridae 68 virus membres	<i>Flavivirus</i> <i>Hepacivirus</i> <i>Pestivirus</i> <i>Pegivirus</i>	Moustiques Tiques	Symétrie cubique Diamètre = 40 - 60 nm
-ssARN	Bunyaviridae 318 virus membres	<i>Hantavirus</i> <i>Nairovirus</i> <i>Phlebovirus</i> <i>Tospovirus</i> <i>Orthobunyavirus</i>	Moustiques Tiques Moucheron Phlébotomes	Symétrie hélicoïdale Diamètre = 80 - 120 nm
	Rhabdoviridae 63 virus membres	<i>Vesiculovirus</i> <i>Lyssavirus</i> <i>Ephemerovirus</i> <i>Cytorhabdovirus</i> <i>Nucleorhabdovirus</i> <i>Novirhabdovirus</i>	Moustiques Moucheron Phlébotomes	Symétrie en forme de balle Diamètre = 180×85 nm
dsARN	Reoviridae 77 virus membres	<i>Rotavirus</i> <i>Orthoreovirus</i> <i>Orbivirus</i> <i>Coltivirus</i> <i>Aquareovirus</i> <i>Cypovirus</i> <i>Fijivirus</i> <i>Phytoreovirus</i> <i>Oryzavirus</i> <i>Idnoreovirus</i> <i>Mycoreovirus</i>	Tiques	Symétrie cubique Diamètre = 60-80 nm

+ssARN : ARN simple brin positif, -ssARN : ARN simple brin négatif, dsARN : ARN double brin

Le nom individuel de chaque arbovirus dépend de son histoire sans qu'une approche taxonomique formelle ait été établie. Certains virus sont nommés suivant les maladies qu'ils provoquent (chikungunya, o'nyong-nyong, dengue), d'autres selon l'endroit où ils ont été découverts (West Nile, Bwamba, Ross River, Zika) et quelques-uns selon les symptômes cliniques induits (encéphalite équine occidentale, fièvre jaune) (Young, 2018). La grande famille des arbovirus renferme également d'autres types de virus sans liaison apparente avec un vecteur arthropode. Ils sont classés généralement dans le groupe en raison de leur relation génétique étroite. Nous pouvons citer le cas des virus appartenant au genre *Hantavirus* qui sont maintenus dans la nature dans des rongeurs capables de transmettre directement l'infection à l'homme (Lefeuvre and Apaire-Marchais, 2021).

Le cycle de transmission naturel des arbovirus implique trois composants, le virus, le vecteur et l'hôte(s) vertébré(s) (Chippaux, 2003).

Les infections dues aux arbovirus appartiennent à la famille des zoonoses c'est-à-dire que ces agents pathogènes se transmettent naturellement des animaux aux humains, et vice-versa (Young et al., 2014).

En premier lieu, la transmission des arbovirus est relative entre les vecteurs et les animaux sauvages comme les mammifères (les rongeurs, les primates, les chauves-souris, les chevaux, etc...) et les oiseaux (Young et al., 2014). Il s'agit d'un cycle sylvatique ou cycle sauvage naturel (Figure 1). En effet, les animaux domestiques et les humains restent souvent des hôtes accidentels par débordement du virus du milieu sauvage. Les arthropodes sont infectés par engorgement d'un repas sanguin provenant d'un vertébré. Les virus se développent dans l'épithélium de l'intestin moyen et se propagent dans les autres tissus et organes jusqu'aux glandes salivaires. Il s'agit de la période d'incubation extrinsèque entraînant un titre élevé de charge virale dans la salive du vecteur. La transmission s'effectue ainsi aux mammifères et/ou aux humains par les morsures d'insectes (Barrett and Weaver, 2012). Dans ce deuxième cas, les humains et les animaux domestiques deviennent des hôtes amplificateurs une fois qu'ils développent une virémie suffisante pour infecter les vecteurs. Ce processus d'amplification peut rester un cycle épizootique rural avec la transmission du virus à des animaux domestiques (Figure 1). Il peut être également à l'origine des épidémies dans les zones à forte densité de population humaine avec des conditions environnementales favorables (Figure 1) (Young et al., 2014).

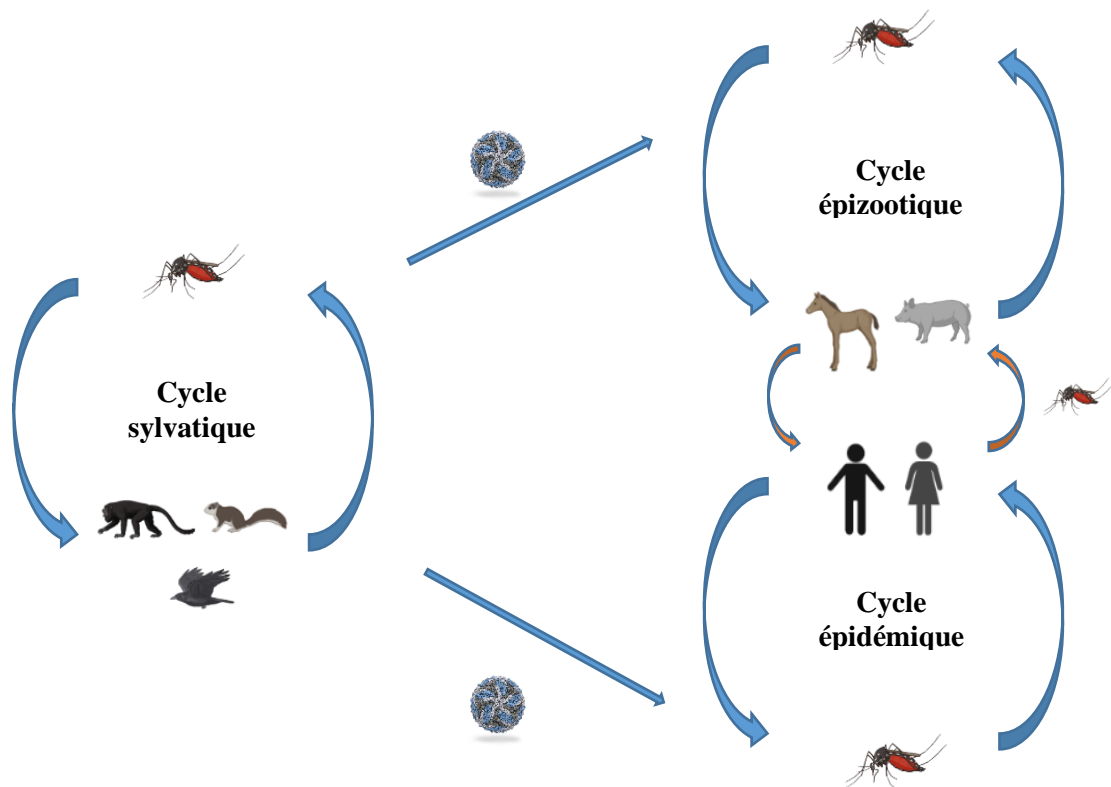


Figure 1- Cycles de transmission des arbovirus

I-2. Arboviroses émergentes

Selon l’OMS, une maladie est dite émergente/réémergente lorsqu’elle fait apparition soudain dans une population pour la première fois, ou qu’elle existait sans doute auparavant et connaît une augmentation soudaine en termes d’incidence ou de distribution géographique (WHO et al., 2004).

La propagation des arbovirus repose sur plusieurs facteurs :

- La biodiversité dans les régions tropicales et sub-tropicales d’Afrique, d’Asie du Sud-Est et d’Amérique latine apporte aux arbovirus leur source de survie en termes de réservoirs potentiels, de conditions climatiques favorables et de contact étroit avec les humains. Depuis des décennies, des virus circulent dans ces régions en prenant l’exemple du virus de la fièvre jaune (YFV) en Afrique subsaharienne et en Amérique latine (Huang et al., 2019).
- Les activités humaines impliquant la croissance démographique, la déforestation, l’urbanisation et l’évolution des transports internationaux sont à l’origine de diverses épidémies. Nous pouvons citer le cas du virus de Nil

occidental qui s'est propagé dans tout l'Amérique du Nord pendant une décennie depuis son émergence à New York en 1999 (Couillard, 2002; Young, 2018). En 2005, le virus du chikungunya a fait son apparition à l'Île de la Réunion et a réussi à se propager dans tous les pays de l'Océan Indien jusqu'en Asie du Sud-Est (Josseran et al., 2006; Renault et al., 2012; Paty, 2013). Les meilleurs exemples restent l'expansion continue et rapide des virus de la dengue dans les zones tropicales et subtropicales depuis des décennies accompagnant l'émergence récente du virus de Zika et l'épidémie causée dans l'Amérique latine depuis 2016 (Bhatt et al., 2013; Messina et al., 2014; Mittal et al., 2017; Ferraris et al., 2019).

- Les changements climatiques et écologiques engendrent les distributions des vecteurs de ces arbovirus dans de nouvelles zones géographiques (Lambrechts et al., 2010; Ding et al., 2018; Ducheyne et al., 2018; Chandra et al., 2021). En outre, ces virus sont connus pour leur capacité à s'adapter facilement aux nouveaux vecteurs et hôtes vertébrés via des mutations. Ainsi, la prolifération du chikungunya (CHIKV) dans l'Océan Indien a été également facilitée par son adaptation au cycle de transmission vectorisé par *Ae. albopictus* (Delatte et al., 2008b; Waldock et al., 2013). Ce changement de vecteur était dû à la mutation E1-A226V unique au génotype ECSA accélérant ainsi la dispersion du CHIKV dans les zones où le premier vecteur (*Ae. aegypti*) ont été presque éradiqués (Musso et al., 2018). Il s'agit également du cas de l'épidémie de la dengue en Chine en 2014. La transmission du DENV-1 par *Ae. albopictus* a provoqué plus de 37 000 cas confirmés en laboratoire à Guangzhou (Musso et al., 2018; Chen et al., 2019, 2021). Ces situations ont démontré la capacité de *Ae. albopictus* à transmettre et à maintenir les épidémies des arbovirus en milieu urbain (Musso et al., 2018).

Les entités publiques et sanitaires se retrouvent souvent en difficulté devant les épidémies provoquées par ces virus émergents à cause de l'ignorance complète (pour les virus émergents) ou de la méconnaissance (pour les virus ré-émergents) des aspects biologiques, physico-chimiques et environnementaux, de la pathologie de la maladie, des mesures préventives et thérapeutiques à prendre. En outre, la circulation et la propagation de ces virus sont favorisées par l'absence d'immunité naturelle, de vaccins et de traitements médicaux spécifiques.

Actuellement, les arbovirus recensés représentent moins de 1% de l'ensemble existant selon les estimations. Seuls quelques-uns parmi eux, environ 150, sont connus pour causer des maladies humaines. Ils appartiennent à trois familles : *Togaviridae* (genre *Alphavirus*), *Flaviviridae* (genre *Flavivirus*) et *Bunyaviridae* (genres *Bunyavirus*, *Orthobunyavirus*, *Nairovirus* et *Phlebovirus*) (Young, 2018). Par la suite, seuls les *Flavivirus* seront détaillés dans ce manuscrit.

II. Flavivirus

II-1. Définition et classification

L'appellation « Flavivirus » provient du terme latin « flavus » ou jaune se référant au premier arbovirus identifié, le virus de la fièvre jaune. Cette maladie a semé la terreur en Amérique, en Europe et en Afrique durant les trois siècles qui ont suivi l'arrivée des conquistadors espagnols dans le Nouveau Monde. Diverses études et investigations ont été menées pour connaître la cause de la maladie. Au cours d'une enquête à La Havane en 1900, Walter Reed, James Carroll, Carlos Finlay et leurs collègues ont montré que l'agent pathogène était un « virus filtrable » transmis par le moustique *Ae. aegypti*. (Chambers et al., 1990; Burrell et al., 2017)

Appartenant à la grande famille des *Flaviviridae*, les *flavivirus* regroupent plus de 70 espèces dont les virus de la fièvre jaune (YFV), de la dengue (DENV), du zika (ZIKV), du Nil occidental (WNV) ou encore de l'encéphalite japonaise (JEV).

Si d'une part, les *flavivirus* peuvent être classifiés en 15 groupes selon la ressemblance au niveau de leur séquence nucléotidique (Burrell et al., 2017), d'autre part, ils peuvent être subdivisés en deux grands groupes selon leur phylogénie : les virus à vecteurs inconnus et les virus à vecteurs connus (ceux transmis par les moustiques et les tiques). En se focalisant sur les flavivirus transmis par les moustiques, deux groupes peuvent être considérées : les virus neurotropes provoquant des encéphalites et les virus non neurotropes mais hémorragiques. (Kuno et al., 1998; Gaunt et al., 2001)(Figure 2).

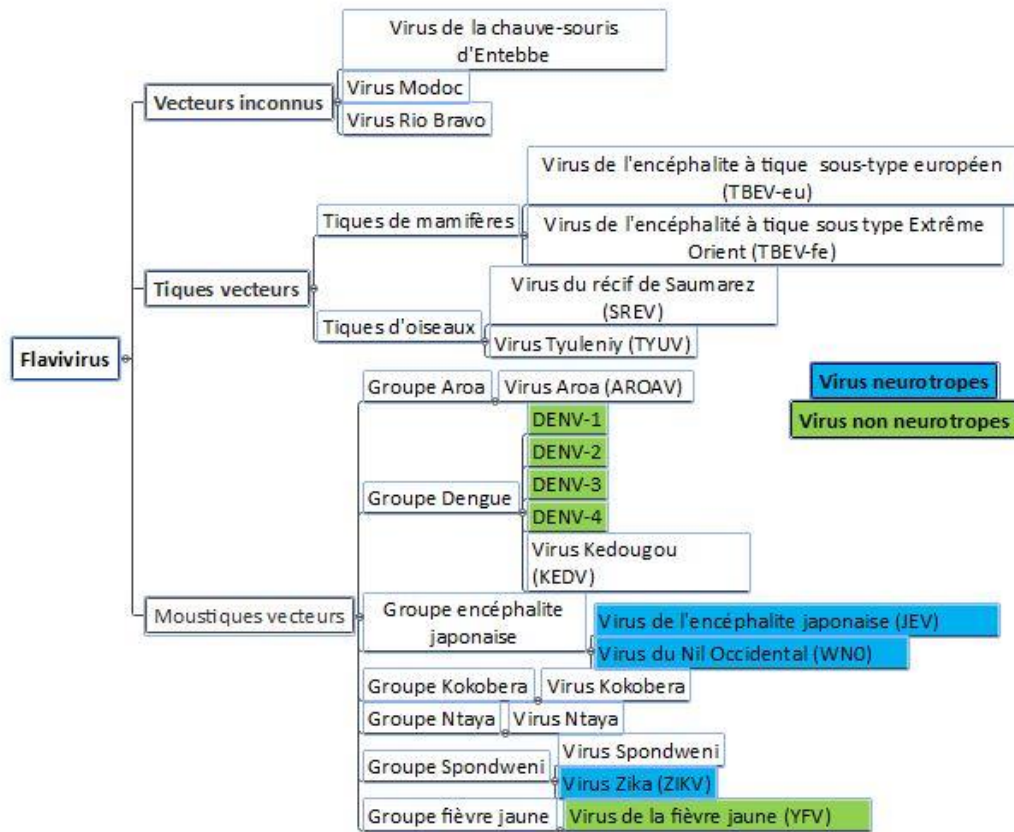


Figure 2- Classification de quelques flavivirus selon leurs vecteurs

II-2. Biologie des flavivirus

Les *flavivirus* sont des petits virus sphériques avec un diamètre d'environ 50 nm. Leur noyau est constitué d'une capsid C et d'ARN viral, enveloppé par une bicouche lipidique formée de glycoprotéines E et de protéines M (Smit et al., 2011).

La capsid C est une protéine hélicoïdale constituée de 120 acides aminés. Elle est associée directement au génome viral en liant les acides nucléiques viraux ou les lipides hôtes. Elle est aussi impliquée dans l'orientation et l'incorporation du génome viral dans le virion. (Mukhopadhyay et al., 2005; Pierson and Diamond, 2020) (Figure 3A). La protéine E se présente sous forme d'une structure à trois domaines (appelés domaines E-DI, E-DII et E-DIII) qui sont reliés par des régions de charnières flexibles (Figure 3B). Le domaine ED-II ressemble à un doigt allongé facilitant la dimérisation des protéines E. A son extrémité, il possède une boucle de fusion conservée très hydrophobe. Cette partie est impliquée dans la fusion endosomale-membranaire (Smit et al., 2011). La protéine M constitue une petite partie

de sa forme précurseur prM (21 kDa) et est ancrée dans la membrane virale par deux hélices transmembranaires. Le précurseur membranaire se présente sous forme glycosylé et est incorporé dans l'enveloppe virale sous forme de pics hétérotrimériques prM-E avec une symétrie icosaédrique empêchant les changements conformationnels de la protéine E. En d'autres termes, le peptide prM protège les virions immatures contre la fusion prématurée avec la membrane hôte. Le clivage de prM en M par la furine ainsi que le réarrangement des ponts trimériques prM-E en hétérodimères M-E, à travers le réseau trans-Golgi, sont nécessaires pour la formation de virions matures infectieuses (Figure 3C) (Hu and Sun, 2019; Pierson and Diamond, 2020).

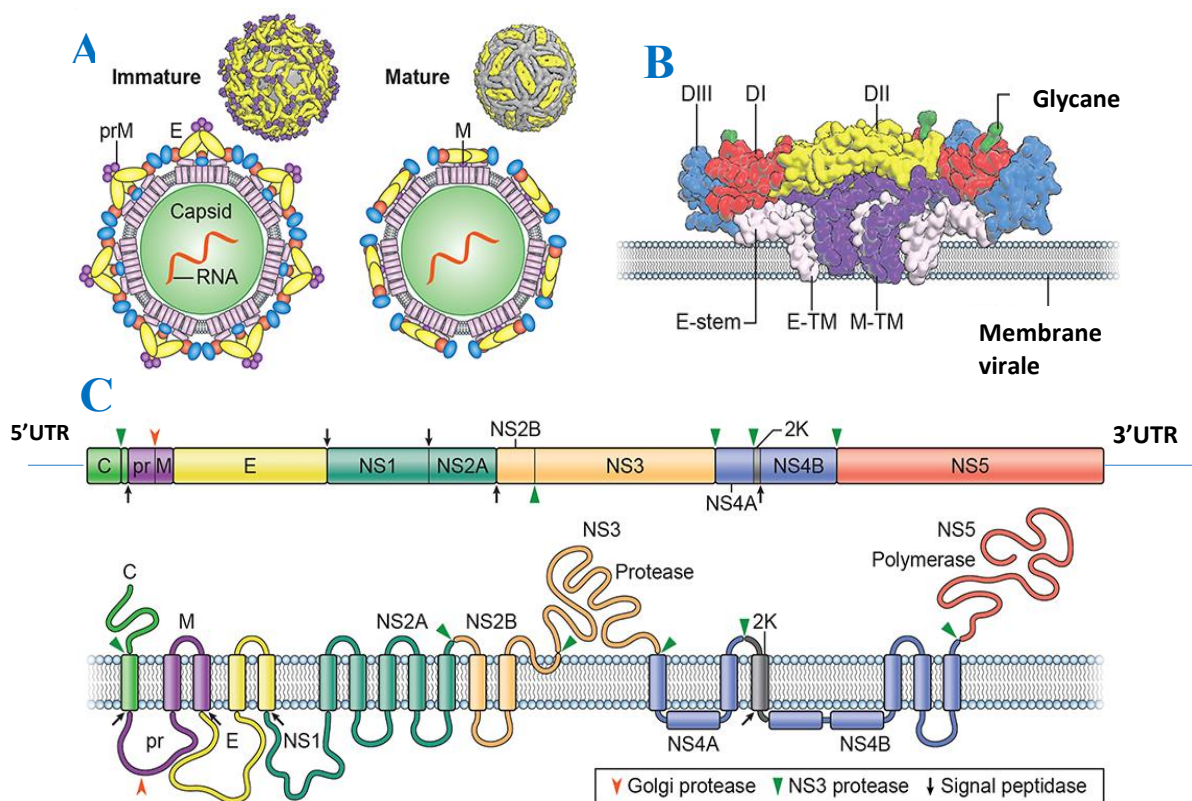


Figure 3- Structure et organisation d'une particule virale d'un flavivirus (Pierson and Diamond, 2020)

(A) Représentation du virion immature (gauche) et mature (droite) des flavivirus, pr-M : précurseur membranaire, E : protéine enveloppe, M : protéine membrane. (B) Structure de la protéine enveloppe E liée à la membrane virale avec ses 3 domaines (domaine I en rouge, domaine II en jaune et domaine III en bleu) ; la protéine M en violet attachée à la membrane virale par deux domaines transmembranaires. (C) Organisation du génome d'un flavivirus

Le génome viral des flavivirus est constitué d'un ARN simple brin positif d'une longueur d'environ 11-12 kb. Il est composé d'un seul et long cadre de lecture ouvert limité par deux régions non traduites. L'ARN possède une coiffe de type I à son extrémité 5' (m7GpppAmp) suivie de la séquence de dinucléotide conservée. A la différence d'autres

virus, l'extrémité 3' du génome est composée de 100 à 700 nucléotides et se termine par une boucle 5'-CU_{OH}-3' au lieu d'une voie poly(A) (Figure 3C) (Brecher et al., 2013; Burrell et al., 2017). Durant la réplication virale, l'ARN est traduit en une seule polyprotéine d'environ 3430 d'acides aminés. La polyprotéine est ensuite clivée par différentes protéases en trois protéines structurales (la capsid C, le précurseur membranaire / la membrane prM/M et l'enveloppe E) et en sept protéines non structurales désignées comme NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5. Ces protéines structurales et non structurales ont des responsabilités dans l'assemblage du virion, la liaison et l'entrée au niveau de la membrane cellulaire, le traitement de la polyprotéine et la réplication virale (Tableau 2).

Tableau 2- Fonctions des protéines structurales et non structurales des flavivirus (Chong et al., 2019; Blahove and Carter, 2021; Dey et al., 2021)

	Protéine	Description	Fonction
Protéines structurales	Capsid C	Protéine (12 kDa)	Emballage et protection du génome viral
	Précurseur membranaire prM / Membrane M	Glycoprotéine (21 kDa)	Repliement de l'enveloppe E Protection contre une exocytose précoce des virions immatures
	Enveloppe E	Glycoprotéine (53 kDa)	Entrée de la particule virale dans les cellules (attachement, internalisation et fusion)
Protéines non structurales	NS1	Glycoprotéine (48 kDa)	Synthèse de l'ARN à brin positif Réplication et assemblage du virus Evasion du système immunitaire Marqueur d'infection à flavivirus
	NS2A	Protéine membranaire intégrale (22 kDa)	Libération des particules virales infectieuses Réplication et assemblage du virus Evasion du système immunitaire
	NS2B	Protéine hydrophobe transmembranaire (14 kDa)	Cofacteur de NS3 protéase (complexe sérine protéase) Détection de l'ADN mitochondrial des cellules hôtes Antagoniste de l'interféron de type I
	NS3	Protéine (70 kDa)	NS3 protéase avec NS2B NS3 trisphosphatase 5'-ARN NS3 nucléoside triphosphatase (NTPase) NS3 hélicase
	NS4A	Protéine membranaire intégrale (16 kDa)	Réarrangement membranaire
	NS4B	Protéine membranaire intégrale (27 kDa)	Modulation de la synthèse de l'ARN viral Evasion du système immunitaire
	NS5	Protéine (103 kDa)	Membre principal du Complexe Replication ARN dépendant polymérase C-Terminal (RdRPase) Méthyl transférase N-Terminal (MTase) Antagoniste de l'interféron type I

In vitro, les flavivirus se répliquent facilement dans les cellules dérivées de leurs hôtes vertébrés (mammifères, oiseaux) comme les cellules Vero (rein d'un singe vert africain), les cellules BHK-21 (rein de bébé hamster) et les fibroblastes primaires de poussins et d'embryons de canards. Ils se reproduisent dans les cellules de moustiques C6-36 d'*Ae.*

albopictus, AP-61 d'*A. pseudoscutellaris*, sans provoquer de changements cytopathiques. Ils peuvent également infecter les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (Brecher et al., 2013; Burrell et al., 2017).

Les particules virales s'attachent à la surface des cellules hôtes par le biais des ligands sur la protéine E (Figure 4). Les *flavivirus* ne possèdent pas de récepteurs uniques. Généralement, ils ont la facilité de se lier aux glycosaminoglycanes (GAGs). Il s'agit de polysaccharides sulfatés à chaîne longue non ramifiée et souvent liés aux protéines de base attachées aux surfaces cellulaires comme les héparanes sulfates (Perera-Lecoin et al., 2014). D'autres récepteurs cellulaires pour l'entrée des flavivirus sont possibles. Nous pouvons citer les intégrines $\alpha V\beta 3$ qui jouent un rôle dans l'entrée virale des WNV et JEV (Chu and Ng, 2004). Les récepteurs de lectine de type calcium C ont été mis en évidence comme responsables de l'entrée virale des virus tels que le DENV et le JEV dans les cellules humaines (Navarro-Sanchez et al., 2003; Dejnirattisai et al., 2011; Wang et al., 2016; Liu et al., 2020) et le WNV dans les cellules des moustiques (Davis et al., 2006). Il existe également les récepteurs de phosphatidylsérine TIM/TAM comprenant les AXL et les TYRO3 qui interviennent avec les virus DENV et ZIKV (Perera-Lecoin et al., 2014; Liu et al., 2016). On retrouve les protéines de choc thermique (Hsp70/90) interagissant avec DENV et JEV dans des cellules humaines et des cellules de moustiques (Cabrera-Hernandez et al., 2007; Zhu et al., 2012).

Les *flavivirus* entrent dans les cellules par endocytose clathrine-dépendante induite par les récepteurs (Figure 4). Le pH acide de l'endosome déclenche un changement conformationnel de la protéine virale E, éventuellement important pour la fusion de la particule virale et des membranes plasmiques ou liposomales de la cellule hôte comme le cas du WNO, DENV et JEV (Chambers et al., 1990) . La fusion va entraîner la libération du génome d'ARN nucléocapside et viral dans le cytoplasme (Figure 4). Ensuite, l'ARN viral se traduit en une seule polyprotéine dans le réticulum endoplasmique (RE) et subit un clivage pour donner naissance à 3 protéines structurales et 7 protéines non structurales. Les protéines virales non structurales interviennent dans la réplication des ARN, dans les invaginations RE ou vésicules (VP). L'ARN nouvellement synthétisé est exporté dans l'espace intermembranaire du VP et sort ensuite dans le cytoplasme. Ensuite, le génome est emballé par une protéine de capsid virale C entourée du précurseur membranaire prM et d'une protéine enveloppe E. Pendant l'assemblage du virion, les complexes protéiques E avec les protéines prM dans le RE forment des complexes hétérotrimériques prM-E (Figure 4). Ces complexes sont intégrés par

la suite dans la bicouche lipidique pour former un virion immature. Les virions immatures sont hérissés et mesurent 60 nm de diamètre. Ils sont transportés au réseau trans-Golgi (TGN) pour un processus de maturation. Le pH acide dans le TGN induit des changements conformationnels des particules immatures, conduisant à la réorganisation de la protéine d'enveloppe et le clivage de prM en « pr » et « M » par la furine (une protéase cellulaire). Dans des conditions acides, le fragment de clivage reste associé aux virions dans le TGN mais se dissocie au pH neutre de l'environnement extracellulaire, générant une particule virale mature et infectieuse. À ce stade, la protéine E a adopté une conformation métastable avant d'être libérée par exocytose. Les particules sub-virales (PSV) sont produites comme sous-produits pendant le processus d'assemblage du virion. Elles sont dépourvues du génome viral et de la capsid et composées uniquement de la membrane lipidique avec des complexes prM-E liés. Ces PSV sont transportés, traités et libérés du RE dans leur ensemble, non infectieux (Figure 4) (Chong et al., 2019).

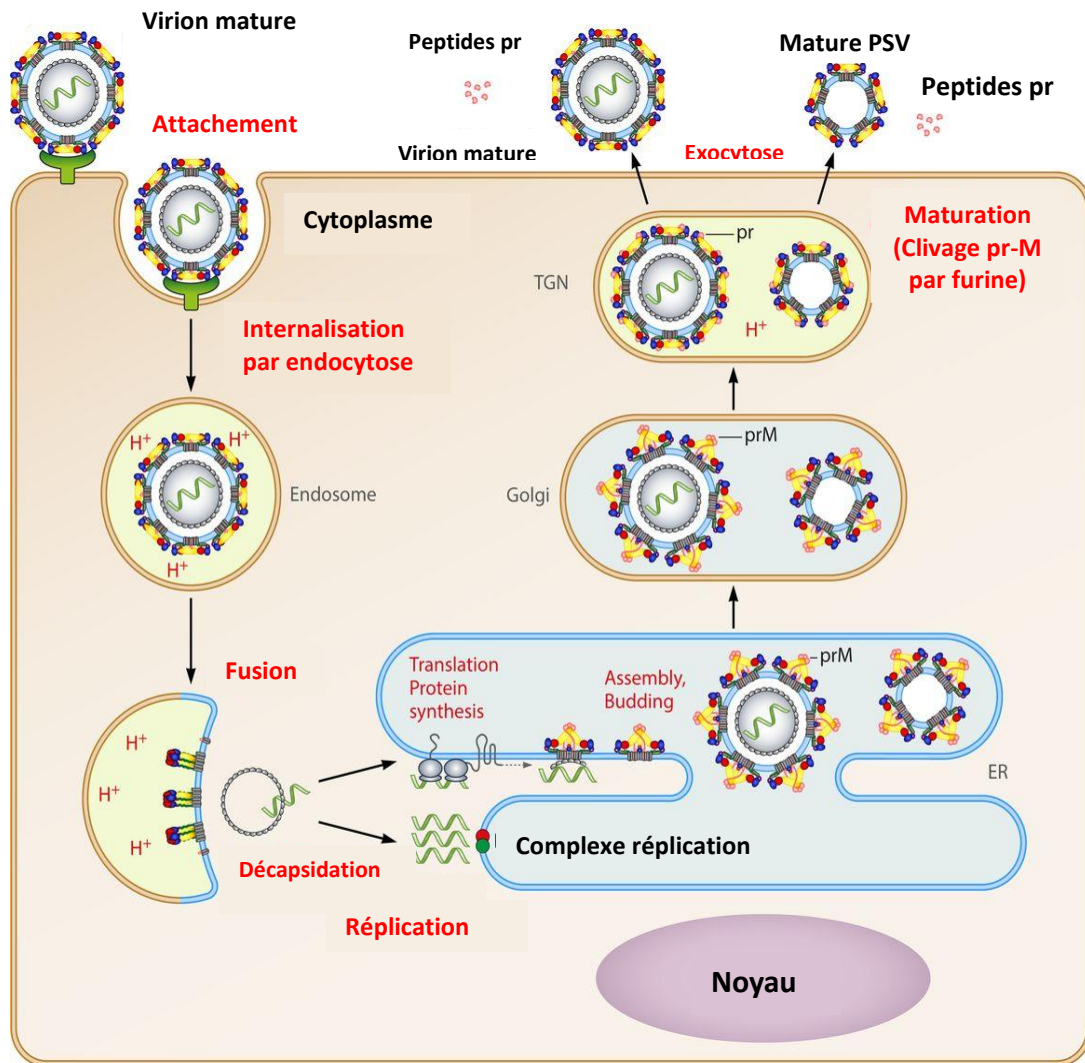


Figure 4- Cycle de répliation d'un *flavivirus* (adapté de (Heinz and Stiasny, 2017))

III. Zika

III-1. Historique

La découverte de nombreux arbovirus comme le virus zika a eu lieu suite au programme de recherche sur la fièvre jaune qui a été mené par la Fondation Rockefeller durant la période de 1914 à 1970 (Musso and Gubler, 2016). Le virus zika (ZIKV) a été isolé pour la première fois en Avril 1947, à partir du sang d'un rhesus sentinelle (*Macaca mulatta*) infecté dans la forêt tropicale Zika, située à environ 4 km d'une ville centrale de l'Ouganda, à Entebbe. Le second isolement a été effectué à partir du moustique *Ae. africanus* prélevé en janvier 1948 au même endroit. Le virus fût nommé « virus zika » suivant le nom du lieu où

les premières découvertes ont été effectuées. Les tests de neutralisation croisés indiquent qu'il s'agit d'un nouveau virus, autre que ceux de la fièvre jaune et de la dengue (Dick et al., 1952). Le premier cas humain d'infection a été détecté en Tanzanie et en Ouganda par la présence des anticorps neutralisants contre ce virus dans le sérum provenant des patients en 1954 (Bernatchez et al., 2020). La première épidémie majeure de zika a fait son apparition en 2007 sur l'île de Yap en Micronésie. Les patients ont présenté pour la première fois des symptômes bénins signalés comme de la fièvre, l'arthralgie et de la conjonctivite. Par la suite, une épidémie a été identifiée en Polynésie française en 2013 (Cao-Lormeau et al., 2014) . Des caractéristiques de symptômes avec des malformations congénitales chez les nourrissons nés de mères infectées et des hypothèses de liaison entre l'infection virale et le développement du syndrome neuro-inflammatoire de Guillain-Barré (SGB) ont été rapportées pour la première fois durant cette épidémie (Cao-Lormeau et al., 2014, 2016). En 2015, le ZIKV a contaminé le Brésil et s'est propagé rapidement dans les autres états d'Amérique. Des cas de microcéphalie, des éruptions cutanées, des arthralgies et des malformations oculaires ont été signalés (do Rosário et al., 2016; Rodrigues, 2016; Jaenisch et al., 2017). Suite à ces manifestations cliniques associées, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a déclaré le zika en Février 2016 comme étant une urgence mondiale de santé publique (Bernatchez et al., 2020).

Appartenant à la famille des *Flavivirus*, le ZIKV est placé dans le clade X transmis par les moustiques avec le serocomplex Spondweni (Musso and Gubler, 2016). Des études phylogénétiques effectuées sur les séquences génomiques des ORC ont mis en évidence deux souches de ZIKV : la souche africaine (les prototypes de l'Ouganda, Nigéria et du Sénégal) et la souche asiatique à l'origine de la première épidémie dans les Iles de Yap en 2007 (Haddow et al., 2012)(Figure 5). La lignée asiatique provient d'un ancêtre commun avec la souche africaine se déplaçant en Asie du Sud-Est et dans le Pacifique.

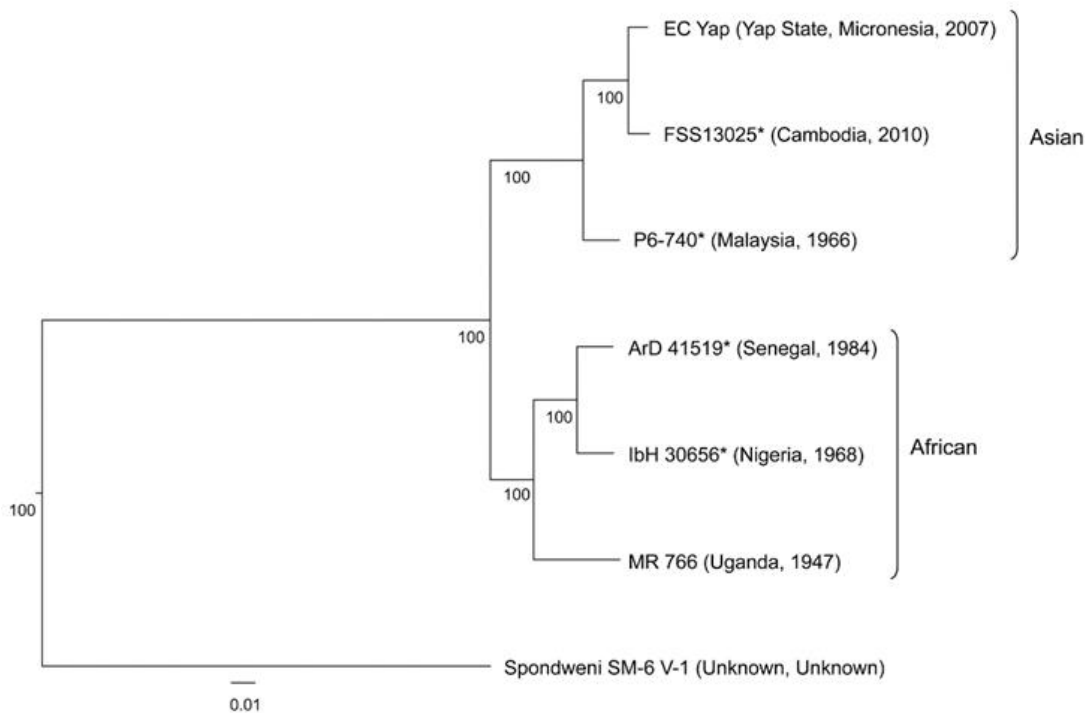


Figure 5- Arbre phylogénique de ZIKV selon l’alignement des nucléotides et d’acides aminés (Haddow et al., 2012)

III-2. Mode de transmission

Comme la plupart des arbovirus, le ZIKV est transmis par les piqûres de moustiques, plus précisément du genre *Aedes* en citant *Ae. africanus*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. furcifer*, *Ae. apicoargenteus*, *Ae. vitattus*, *Ae. albopictus* et *Ae. Aegypti* (Nhan et al., 2014; Barbi et al., 2018). Son mode de transmission se maintient généralement en cycle sylvatique sauvage entre les vecteurs et les primates pourtant des anticorps ont été détectés dans d’autres mammifères à savoir les éléphants, les chèvres, les hippopotames, les impalas, les kongoni, les lions, les moutons, les gnous, les zèbres, les rongeurs et les chauves-souris (Haddow et al., 2012; Nhan et al., 2014; Musso and Gubler, 2016).

Mis à part la transmission vectorielle, une mère enceinte infectée pourra également transmettre le virus à son fœtus. Des cas ont été signalés durant l’épidémie en Polynésie Française avec la présence du génome viral dans le lait maternel rendant également possible la transmission par allaitement (Besnard et al., 2014). Par la suite, plusieurs études ont montré cette possibilité de transmission verticale avec des expériences sur les souris (Li et al., 2016; Chen et al., 2017). Le ZIKV peut également se transmettre sexuellement, un chercheur américain a contracté la maladie au Sénégal en 2008 et a transmis le virus à son épouse lors de son retour (Foy et al., 2011; Musso et al., 2015). La voie de transmission de ZIKV par

transfusion sanguine a déjà été démontrée durant l'épidémie en Polynésie française. Le génome a été détecté chez des donneurs de sang alors qu'ils étaient totalement asymptomatiques (Nhan et al., 2014). Il est à noter que des études ont mis en évidence la présence de ZIKV infectieux dans la salive (Barzon et al., 2016) et les urines (Bonaldo et al., 2016).

III-3. Épidémiologie

Au cours des décennies, seuls quelques dizaines de cas sporadiques ont été signalées en Afrique et en Asie du Sud lors des études de surveillance sur le ZIKV (Ferraris et al., 2019). Néanmoins, le suivi pourrait être faussé à cause de la similarité des symptômes et de la réactivité croisée des anticorps des infections par le ZIKV et le DENV. (Lanciotti et al., 2016; Suwanmanee and Luplertlop, 2017; Alshammari et al., 2018; Hu and Sun, 2019)

Epidémiologie de zika dans le Pacifique

La première épidémie a vu le jour en 2007 à l'île de Yap, en Micronésie (Duffy et al., 2009; Thomas et al., 2015). Après 2007, des cas importés et autochtones de ZIKV ont commencé à augmenter et se propager dans plusieurs territoires. En octobre 2013, une deuxième épidémie a été déclarée en Polynésie française avec une estimation de 32000 personnes infectées (11,5% de la population) (Mallet et al., 2016; Musso and Gubler, 2016). Il a été démontré suite à des études phylogénétiques que la souche virale circulée en Polynésie française est largement similaire à celle de Cambodge (2010) et des Iles de Yap (2007) confirmant la propagation de la souche asiatique de ZIKV (Musso and Gubler, 2016). A la même époque, des cas de SGB ont été signalés avec un taux d'incidence d'environ 20 fois plus élevé que prévu, selon la densité de la population polynésienne. Des études rétrospectives sur des « cas-témoins » ont confirmé le lien entre ces deux maladies avec la détection des anticorps anti-ZIKV dans les 98% des 42 cas de SGB survenus 4 mois après l'épidémie (Musso et al., 2014; Cao-Lormeau et al., 2016; Mallet et al., 2016). D'autres complications neurotropes ont été également annotées après l'épidémie à savoir des encéphalites, des myélites, des purpuras thrombopéniques immunologiques, des névrites optiques et des papillites (Mallet et al., 2016). En outre, les hôpitaux ont remarqué un nombre assez élevé de nourrissons présentant des malformations et des dysfonctionnements au niveau des cerveaux l'année suivante de l'épidémie. Des études rétrospectives avec 19 cas identifiés

ont démontré une possible liaison entre l'infection par le zika et les malformations cérébrales des fœtus comme la microcéphalie (4 sur 19 cas) (Besnard et al., 2016).

Par la suite, des épidémies de zika ont été survenues dans le pacifique, en Nouvelle-Calédonie, à l'île de Pâques et aux Îles Cook en 2014. En 2015, le virus a été arrivé au Vanuatu, aux îles Salomon, aux Samoa et aux Iles Fidji (Musso et al., 2014; Musso and Gubler, 2016; Ferraris et al., 2019).

Epidémiologie de zika en Amérique

Au milieu de 2015, le ZIKV a atteint le continent américain en touchant principalement le Brésil. Durant la période du mois de mai au mois de décembre 2015, 18 villes brésiliennes ont signalés des transmissions autochtones du virus avec une estimation de 440 000 à 1 300 000 de personnes infectées (Musso and Gubler, 2016). Durant cette épidémie, une augmentation anormale du taux de cas de SGB chez l'adulte (do Rosário et al., 2016; Barbi et al., 2018; Ferraris et al., 2019) et du nombre de cas de microcéphalie chez les nourrissons a été observée confirmant les cas survenus en Polynésie française (Besnard et al., 2016; Rodrigues, 2016; Jaenisch et al., 2017). Le ZIKV s'est propagé dans 33 pays de l'Amérique latine au total, avec des cas de transmission autochtone surtout en Colombie et aux Caraïbes (Musso and Gubler, 2016).

Suite à l'évolution de l'épidémie de zika en Brésil, l'OMS a commencé à publier des rapports de situation et de surveillance de l'épidémie en février 2016. Un rapport de l'OMS émis en 2017 informe que sur les 61 territoires de transmission de virus en cours : une transmission du virus entre les humains a été prouvée dans 13 pays, 31 pays ont signalé des troubles neurologiques (microcéphalie, malformation congénitale) liés à l'infection par le ZIKV et un taux élevé de SGB chez les patients infectés par le ZIKV a été rapporté dans 23 pays (Ferraris et al., 2019)

Epidémiologie de zika en Europe

En ce qui concerne l'Europe, le premier cas d'infection de zika a été détecté en Allemagne avec un voyageur qui est revenu de Thaïlande en Novembre 2013 (Tappe et al., 2014). Ensuite, plusieurs cas ont été signalés partout dans les pays de l'Europe comme la France, l'Italie, les Pays-Bas, la Norvège, la Finlande, l'Espagne et l'Angleterre (Musso and Gubler, 2016).

Depuis 2017, le nombre de cas d'infection a beaucoup diminué. Toutefois, une vigilance s'impose parce que le virus circule toujours dans de nombreux pays. Par exemple, trois cas d'infection au ZIKV confirmés en laboratoire ont été signalés en Inde (région de Bapunagar) (OMS, 2021). Des émergences du virus commencent même à apparaître hors des zones tropicales (Figure 6).

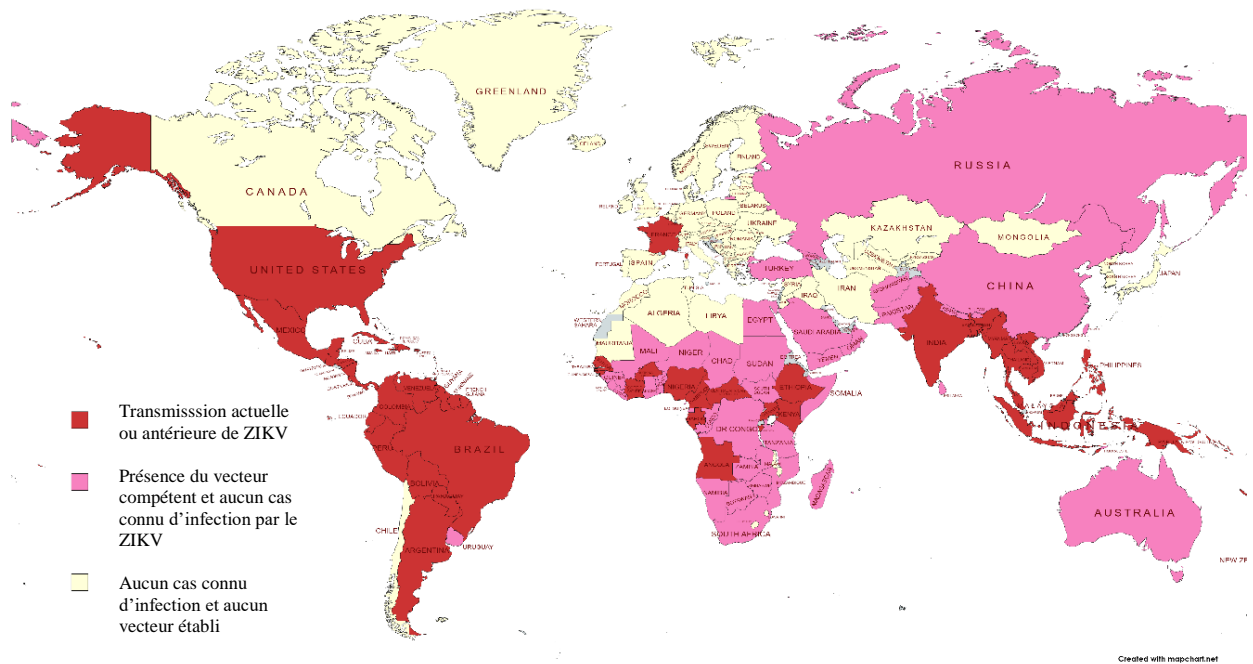


Figure 6- Pays et territoires ayant une transmission actuelle ou antérieure du virus zika selon l'OMS (mis à jour Février 2022) (créé avec <https://mapchart.net>)

III-4. Physiopathologie

L'infection par le virus zika est dans les 80% des cas est asymptomatique. Dans le cas contraire, les symptômes apparaissent au bout de 5 à 10 jours après l'exposition au virus et peuvent durer une à deux semaines environ. Ils se manifestent généralement (90% des cas) par de la fièvre, des maux de têtes et des éruptions cutanées. Les patients peuvent avoir également des douleurs articulaires et musculaires, fatigue accompagnée des légères malaises, vomissement, diarrhée, œdèmes, rougeur oculaire et de la conjonctivite (Musso and Gubler, 2016; Mittal et al., 2017). Dans la majorité des cas, la maladie évolue vers une guérison sans complication majeure et décès. Néanmoins, la maladie pourra être à l'origine de complications neurologiques comme le SGB chez l'adulte. En effet, il s'agit d'un syndrome auto-immune rare où le système immunitaire attaque les nerfs périphériques. Cette attaque

pourra engendrer une paralysie progressive avec un taux de mortalité d'environ 5%. Approximativement 20% des malades se trouvent dans une incapacité importante (perte de sensation des membres supérieurs et inférieurs). Une incidence élevée de cas de SGB a fait son apparition avec les majeures épidémies de zika dans les territoires affectés. Les mécanismes expliquant la liaison des deux maladies restent encore flous et sans réponse concrète. Des études mettent en hypothèse que le virus pourrait exacerber la réponse immunitaire déclenchant un processus immunopathogène engendrant à son tour l'apparition de SGB. En 2015, 1708 cas de SGB ont été signalés au Brésil, ce qui représentent une augmentation de 19% par rapport à l'année précédente. (Barbi et al., 2018)

Dans le cas des femmes enceintes infectées par le ZIKV, des cas de microcéphalie chez les nourrissons ont circulé avec les épidémies enclenchant l'urgence sanitaire internationale pour cette maladie. La microcéphalie correspond à une insuffisance de croissance cérébrale atteignant les nouveau-nés. Leur cerveau a une taille plus petite par rapport à la normale aux normes de leur âge et de leur sexe. Cette maladie peut être liée à divers problèmes comme les crises d'épilepsie, moindre espérance de vie, retard de développement, handicap intellectuel et auditif ainsi que les troubles de mouvement, d'alimentation et d'équilibre (CDC, 2016). Des études sur deux femmes enceintes avec des fœtus victimes de microcéphalie de Paraíba au Brésil, ont mis en évidence la présence de l'ARN de ZIKV dans le liquide amniotique. Ces résultats confirment le lien entre le zika et la microcéphalie et informent la capacité du virus à traverser la barrière placentaire (Calvet et al., 2016). D'autres études *in vitro* et *in vivo* rejoignent et renforcent le tropisme de ZIKV au niveau cérébral (Mittal et al., 2017).

IV. Dengue

IV-1. Historique

Parmi les arbovirus émergents, la dengue représente une grande menace pour la santé humaine avec un risque pour le tiers de la population mondiale. Il s'agit également d'une des maladies virales les plus anciennes dans l'histoire de l'humanité. Cependant son lieu d'origine reste incertain tout comme l'apparition des premières épidémies. La première mention des symptômes de la dengue se trouve dans une encyclopédie chinoise, publiée vers les années 992. La maladie fut nommée « poison de l'eau » à cause de sa liaison avec les insectes volants de l'eau (Gubler, 1998b). Avant le 18^{ème} siècle, une maladie ressemblant à la dengue circulait et se propageait dans plusieurs pays d'Asie et d'Amérique (Gubler, 1998a; Saeed and Asif, 2020). La reconnaissance de la maladie a été très lente avec la similarité des symptômes à ceux de la fièvre jaune et du chikungunya, qui ont fait l'objet d'épidémie à cette époque. Une fois que la relation entre la fièvre jaune et *Ae. aegypti* a été mise en évidence, des études sur des volontaires humains ont été réalisées pour savoir si la dengue pourrait être également une infection virale transmise par les moustiques. Une documentation sur la transmission de la dengue par les moustiques a été faite par Graham en 1903, Bancroft en 1906, puis par Cleland en 1918 (Saeed and Asif, 2020). Les travaux de Ashburn et Graig en 1907 ont déterminé l'identité étiologique de l'agent pathogène de la dengue comme un virus (Gubler, 2004). Néanmoins, ce n'est que vers les années 1940, durant la deuxième guerre mondiale, que le premier virus de la dengue a été isolé (Tableau 3). A cette époque, des soldats japonais souffraient d'une maladie avec une forte fièvre et de douleurs articulaires (Gubler, 1998a; Saeed and Asif, 2020). Il existe 4 sérotypes de la dengue, différents en termes de phylogénie et d'antigènes (Tableau 3). Le pourcentage de similarité de l'homologie de séquence d'acides aminés entre ces 4 sérotypes est approximativement 60 à 70 % (Akhtar, 2020). Des études sur les empreintes digitales du génome ont montré que chaque sérotype possède également des variants appelés génotypes (Tableau3) (Repik et al., 1983). Les DENV-1, DENV-2 et DENV-3 possèdent cinq génotypes, tandis que le DENV-4 n'est pourvu que de quatre génotypes (Rico-Hesse, 2003). Cette variation génétique pourrait être due à la recombinaison des sérotypes DENV dans les hôtes du virus. La co-circulation de différents sérotypes et génotypes de DENV dans une zone géographique particulière a été documentée, rendant possible ce phénomène de recombinaison (Holmes et al., 1999; Holmes and Burch, 2000).

Tableau 3- Isolement des 4 sérotypes de virus de la dengue et classification de leurs génotypes

Sérototype	Isolement du virus	Génotypes ^a	Références
Sérototype DENV-1	Du cerveau d'un souris infecté par le sang des patients durant l'épidémie au Japon en 1943 et à Hawaï en 1945	5 génotypes : Malaisie, Amérique/Afrique, Pacifique Sud, Asie et Thaïlande	(Hotta, 1952; Sabin, 1952)
Sérototype DENV-2	Durant l'épidémie à la Nouvelle Guinée et en Indonésie en 1944 puis plus tard aux Philippines, Malaisie et Thaïlande	5 génotypes : Amérique ; Amérique/Asie, Asie 1, Asie 2, Cosmopolitain et sylvatique	(Rico-Hesse et al., 1997; Cologna et al., 2005)
Sérototype DENV-3	Durant l'épidémie aux Philippines et en Thaïlande en 1953	5 génotypes : Asie de Sud-Est/Pacifique Sud, Thaïlande, Sous-continent Indien, Amérique	(Messer et al., 2003)
Sérototype DENV-4	Durant l'épidémie aux Philippines et en Thaïlande en 1953	4 génotypes : Sylvatique/Malaisie, Malaisie, Asie de Sud-Est et Indonésie	(Messer et al., 2003; Guzman et al., 2017; Saeed and Asif, 2020)

^aClassification des génotypes en se basant sur les nucléotides de toute la région génétique de l'enveloppe E (Rico-Hesse, 2003)

IV-2. Mode de transmission

Le principal mode de transmission du virus de la dengue s'effectue par la piqûre du moustique vecteur du genre *Aedes* essentiellement *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* distribués dans les zones tropicales et subtropicales (Figure 7).

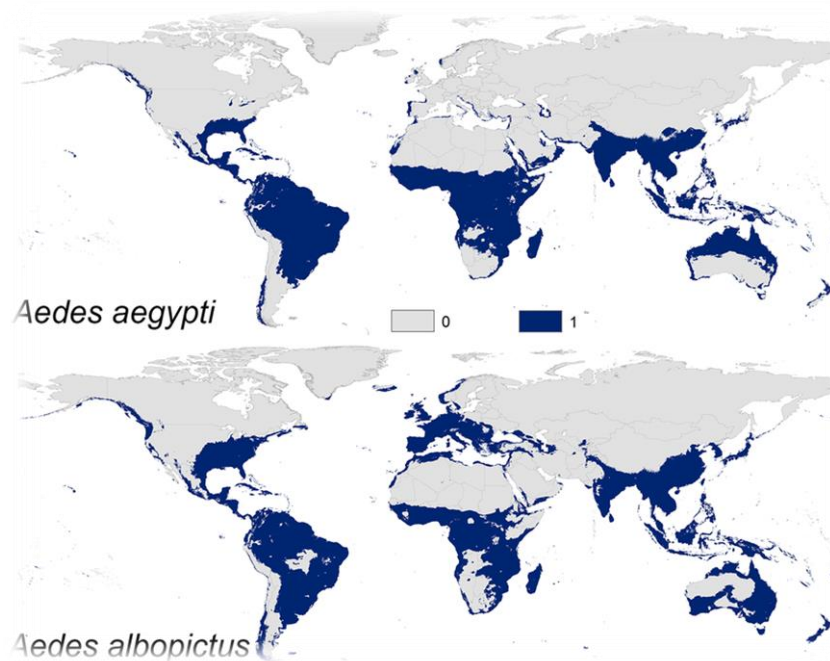


Figure 7- Distribution de *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* dans le monde en 2018 (Kamal et al., 2018)

Ces moustiques du genre *Aedes* sont très anthropophiles principalement *Ae. aegypti*. Ils préfèrent pondre leurs œufs autour des habitats des humains : dans des vieux pneus de voiture et des pots de fleurs, etc. Ce sont des espèces diurnes et en conséquence se nourrissent plutôt le jour que la nuit. Les femelles d'*Ae. aegypti* ont la capacité de piquer plusieurs personnes au cours d'un seul repas sanguin. Si le moustique est porteur du virus de la dengue, le moustique peut transmettre le DENV à plusieurs personnes en peu de temps. Le développement du virus chez le moustique dure en moyenne 10 jours. Ce développement comporte une multiplication virale dans l'abdomen du vecteur puis le virus gagne les glandes salivaires. On considère qu'un moustique reste infectant toute sa vie (Gubler, 2004; Khetarpal and Khanna, 2016; Guzman et al., 2017). La transfusion sanguine ou la greffe d'organes pourra transmettre également le virus de la dengue même si les cas sont très rares (Tambyah et al., 2008).

IV-3. Épidémiologie mondiale de la dengue

La propagation de la dengue évolue exponentiellement ces dernières décennies avec une charge de morbidité humaine de 20 000 décès environ par année (Stanaway et al., 2016). Des études de modélisation en utilisant des techniques cartographique et statistique ont rapporté que 390 millions d'infections par le virus de la dengue se produisent chaque année,

dont environ 96 millions nécessitent des interventions cliniques (Bhatt et al., 2013). Récemment, une autre étude sur la prévalence de la dengue a montré que 60% de la population mondiale équivalent à 6,1 (4,7-6,9) milliards de personnes seront exposés au risque de la dengue en 2080 (Messina et al., 2014). En revenant au passé, les premières suspicions d'épidémie de dengue ont été signalées en Martinique (en 1635) et au Panama (en 1699) (Saeed and Asif, 2020). Ensuite, plusieurs maladies présentant des symptômes similaires ont été mentionnées dans plusieurs pays tels que Jakarta, Indonésie, Égypte et Philadelphie en 1780. La description de ces symptômes accompagnés des formes hémorragiques et de syndromes de choc, a été publiée par Benjamin Rush en 1789 (Rush, 1951). Ces formes sévères et graves de la dengue ont causé des décès durant l'épidémie en Australie (en 1897), en Grèce (en 1928) et à Taiwan (en 1931). Mais c'est seulement en 1950 que la dengue hémorragique (DHF) envahissant les Philippines jusqu'au Bangkok, a été définie comme étant un syndrome compliqué de la dengue classique (Gubler, 1998a; Guzman et al., 2017; Qureshi, 2020; Saeed and Asif, 2020). Les perturbations majeures au niveau de l'écosystème et les changements démographiques pendant et après la deuxième guerre mondiale ont favorisé l'émergence de la DHF dans l'Asie de Sud-Est. Par conséquent, une pandémie a commencé à se propager avec une co-circulation des différents sérotypes de la dengue dans les pays d'Asie et du Pacifique occidental en 1970 (Guzman et al., 2017). Aux alentours des années 1950-1970, une éradication massive de *Ae aegypti* a été réalisée en Amérique retardant ainsi l'arrivée de la dengue dans ce continent (Gubler, 1989). Une fois le traitement suspendu, le moustique-vecteur a de nouveau envahi les territoires américains entraînant une large épidémie de dengue avec une apparition de formes sévères de la maladie. Prenons l'exemple de la première épidémie de DHF/DSS survenue au Cuba en 1981, faisant 344 000 victimes avec 10 000 cas très critiques et 158 décès dont 101 sont des enfants. De 1981 à 2015, des laboratoires se trouvant dans 24 pays américains ont rapporté des résultats positifs de DHF (Gubler, 1998b). En Afrique, seulement quelques cas sporadiques de dengue ont été signalés malgré la suspicion que le virus de la dengue peut être d'origine africaine comme la plupart des arbovirus. Ces 20 dernières années, l'incidence de la dengue et de la DHF continue de croître en positionnant ainsi cette infection parmi les principales arboviroses émergentes. En 2013, l'Amérique a atteint le pic en nombre de cas enregistrés dans l'histoire de la dengue avec un total de 2 millions de personnes infectées. En outre, la dengue a émergé à Hawaï (2015), au Japon (2014), en Floride (2013) jusqu'en France (2010) et au Portugal (Guzman et al., 2017).

IV-4. Épidémiologie de la dengue à La Réunion

Situées dans la zone tropicale, l'écosystème et le climat des Iles de Sud-Ouest de l'Océan Indien sont favorables aux moustiques du genre *Aedes* (Delatte et al., 2008a). Dans cette région se trouvent Comores, Maurice, Seychelles, La Réunion et Madagascar. La première épidémie de dengue a été signalée aux Comores en 1943 (Mccarthy and Brent, 1943) puis à La Réunion (30% de la population infectée) (Kles et al., 1994) et aux Seychelles en 1977 (80% de la population infectée) (Metselaar et al., 1980). Puis plusieurs cas sporadiques de dengue ont été survenus dans les Iles de l'Océan Indien aux alentours des années 2000. Le sérotype DENV-1 a provoqué des centaines de cas à La Réunion en 2004 puis à Madagascar (Toamasina) en 2006 (Ratsitorahina et al., 2008). Le sérotype DENV-3 a émergé aux Comores puis à La Réunion et Mayotte en 2010. La co-circulation des 4 sérotypes dans les Iles Comores a été par la suite démontrée par des enquêtes séro-épidémiologiques en 2011 (Hafsia et al., 2022). En 2014, après des années d'absence, une épidémie de dengue (DENV-1) a frappé l'île de La Réunion. Parmi les 228 cas recensés, 52% ont été cliniquement confirmés. A cette période, les principaux foyers de dengue se sont trouvés à La Possession, au Port et à Saint-Paul. Depuis 2018, une nouvelle épidémie a fait son apparition notamment celle engendrée par le sérotype DENV-2 ; cependant 19 personnes ont été infectées par DENV-1 à petite île (Pascalis et al., 2019). Le nombre de cas annuels recensé ne cesse d'augmenter (Tableau 4) avec une co-circulation des 3 sérotypes en 2019 - 2020 (Hafsia et al., 2022).

Tableau 4-Surveillance du nombre de cas de dengue confirmés depuis l'épidémie de 2018 (Hafsia et al., 2022; SPF, 2022)

Année	Nombre de cas recensés	Hospitalisations	Décès	Sérotypes DENV
2018	6770	14	6	DENV-2
2019	18217	154	14	DENV-1, 2, 3
2020	16414	620	22	DENV-1, 2, 3
2021	29124	1144	33	DENV-1
2022	1180	58	--	DENV-1

L'épidémie de DENV qui a débuté en 2018 est toujours présente sur l'île jusqu'à ce jour indiquant l'endémicité de la dengue à La Réunion. Compte tenu de l'évolution de l'incidence de la dengue dans les îles de Sud-Ouest de l'Océan Indien, il est impératif de classer cette pathologie comme une priorité majeure de santé publique dans cette région et de faire appel à des mesures de contrôle et d'intervention rapide et efficace.

IV-5. Physiopathologie

Le nom « virus de la dengue » provient des symptômes que la maladie a causés. L'appellation est née dans les Caraïbes dans les années 1820 ; elle pourrait provenir du mot swahili « Ka-dinga-pepo » ou du mot espagnol « dengüero ». Ces termes font référence à des crampes et des crises des patients durant et après l'infection (Barnett, 2017). Néanmoins, il se peut que toutes ces épidémies précoces aient été causées par un autre virus que la dengue comme le virus du chikungunya qui s'est fait appelé « fièvre des os cassés ». Le terme « denga » ou « dyenga » a été à nouveau mentionné pour décrire les symptômes d'une maladie envahissant la côte Est de l'Afrique en 1823. « Dengue » s'est propagé de l'Afrique de l'Est aux îles Caraïbes jusqu'au Cuba pendant l'épidémie de 1828 avec la traite négrière. Dengue signifie « affectation » (Guzman et al., 2017).

La période d'incubation du virus de la dengue varie de 3 à 14 jours. La maladie ne présente pas de symptômes dans la plupart des cas notamment chez les adultes. Dans le cas contraire, les infections symptomatiques ne développent qu'une maladie fébrile qui dure 2 à 7 jours. Cette phase fébrile commence avec une forte fièvre, une migraine, des douleurs dans le dos et de la myalgie grave. Ensuite les patients peuvent avoir des nausées (même des vomissements), des crises d'anorexie, d'asthénie prolongée, de la leucopénie et de la thrombopénie. Des éruptions cutanées apparaissent généralement (50 à 82% des patients) accompagnées spontanément des pétéchies (Magill et al., 2013; Guzman et al., 2017). Les patients symptomatiques (enfants moins de 15 ans) progressent rarement vers des formes plus graves de dengue : DHF et DSS. D'autres formes graves mais peu communes de la dengue ont également été diagnostiquées telles que la nécrose hépatique, l'encéphalopathie ou l'encéphalite et la chorioretinite (Magill et al., 2013).

Fièvre hémorragique de la dengue (DHF)

La DHF est le syndrome clinique de la dengue caractérisé par tous les symptômes classiques, la thrombopénie, les manifestations hémorragiques et la fuite soudaine du plasma de l'intravasculaire dans l'espace extravasculaire. Les manifestations courantes comprennent les hémorragies cutanées comme les pétéchies, les lésions purpuriques et les ecchymoses (Gubler, 1998a; Malavige et al., 2004; Kalayanarooj, 2011). La fuite de plasma détermine la gravité de la maladie en entraînant une hypotension et un choc (syndrome de choc de la dengue) chez les 30% des patients. Ce phénomène est responsable de la majorité de la mortalité due aux infections par le DENV (Gubler, 1998a). Selon l'OMS, la DHF intègre trois critères cliniques supplémentaires au-delà de ceux de la dengue classique. Une échelle de classement de I à IV selon la gravité et la sévérité de la maladie a été établie (Malavige et al., 2004). Une hémorragie cliniquement significative peut parfois survenir en l'absence de fuite vasculaire, en particulier chez les adultes (Gubler, 1998a; Malavige et al., 2004).

Syndrome de choc de la dengue (DSS)

Le DSS se produit après l'extravasation soudaine du plasma dans les sites extravasculaires incluant les cavités pleurales et abdominales. Ce syndrome se manifeste par un pouls très rapide ou très faible (< 20 mm de Hg), une peau froide et tachetée ; une cyanose circumorale avec agitation des malades. Les signes d'un choc grave se présentent avec des douleurs abdominales aiguës, des vomissements persistants et une hypotension soudaine (Guzmán et al., 1999; Malavige et al., 2004). Un choc prolongé est souvent accompagné d'une acidose métabolique accélérant et améliorant la coagulation intravasculaire disséminée (Guzmán et al., 1999 ; Malavige et al., 2004). Cette coagulation, à son tour, pourrait amener à une hémorragie massive. Le DSS peut également s'accompagner d'une encéphalopathie due à des troubles métaboliques ou électrolytiques (Malavige et al., 2004). Les patients peuvent mourir dans les 8 à 24 heures suivant un choc. Le rétablissement des malades dépend d'une intervention clinique rapide. Une fois le choc passé, les patients se rétabliront habituellement dans les 2 à 3 jours (Gubler, 1998a)

Première et seconde infection de la dengue

Les réponses cliniques à la dengue dépendent du virus lui-même, de l'épidémiologie, du statut immunitaire et de la génétique de l'humain. L'âge des patients est également un facteur important dans la gravité de la première infection par le virus dengue (Tableau 5).

Tableau 5- Première infection par les 4 sérotypes de la dengue selon l'âge des patients (Halstead, 2019)

	Jeunes enfants (0 à 6 ans)	Enfants (6 à 15 ans)	Adultes
DENV-1	Asymptomatique	Forme grave (hospitalisation)	Forme classique
DENV-2	Asymptomatique	Asymptomatique	Asymptomatique
DENV-3	Asymptomatique	(non défini)	Forme classique
DENV-4	Asymptomatique	Asymptomatique	Asymptomatique

La première infection par le virus de la dengue engendre des titres élevés des anticorps immunoglobulines M (IgM) et G (IgG) après 3-5 et 6-10 jours. La présence d'IgM est éphémère et disparaît en 2 à 3 mois après le début de la maladie au contraire de l'IgG qui persiste à vie. Par conséquent, l'infection par un sérotype du virus de la dengue engendre une protection à vie contre ce même sérotype et une protection à court terme contre les autres sérotypes (Halstead, 2019). L'infection secondaire par le virus de la dengue provoque essentiellement la forme classique. Cependant, 2-3 % des cas évoluent en DHF/DSS pouvant causer la mort du patient (Khetarpal and Khanna, 2016; Halstead, 2019). Ce risque de forme grave s'explique par le phénomène « amélioration immunitaire » ou ADE (Antibody Dependent Enhancement). Les anticorps hétérologues préexistants de dengue reconnaissent la particule et forment un complexe antigène-anticorps. Parce que les anticorps sont hétérologues non hétérotypiques, cela favorise l'accès du virus aux monocytes par le biais des récepteurs Fc. Ainsi, la charge virale se trouve à un titre élevé améliorant l'infection et la réplication du virus de la dengue dans la lignée cellulaire mononucléaire. Ces cellules produisent et sécrètent des médiateurs vasoactifs en réponse à l'infection et provoquent une perméabilité vasculaire accrue menant à l'hypotension et au choc (Gubler, 1998a; Khetarpal and Khanna, 2016). Par contre, tous les cas graves ne sont pas associés à une infection secondaire et tous les cas d'infection secondaire ne progressent pas vers le DHF/DSS. En plus de l'immunité humorale, les lymphocytes T à mémoire réactive pourraient aussi jouer un rôle en fournissant une immunité protectrice ou en provoquant une immunopathologie (Gubler, 1998a; Khetarpal and Khanna, 2016).

La prise en charge des infections par la dengue est principalement symptomatique à cause de l'absence de traitement antiviral spécifique contre ce virus. L'identification précoce de la phase de fuite avec une réanimation rapide permet de réduire et d'éviter les complications. Le risque de mortalité est faible chez les patients admis tôt à l'hôpital avant le début du choc.

V. Stratégies adoptées pour la lutte contre le zika et la dengue

Actuellement, il n'existe aucun traitement spécifique contre la dengue et le zika. Les personnels de santé prescrivent aux patients des jours de repos et une bonne hydratation. Selon la gravité des cas, les patients peuvent se soigner chez eux ou à l'hôpital. En cas de forte fièvre et de douleurs musculaires, une posologie d'antipyrétiques et d'analgésiques peut être attribuée (Dellamonica, 2009). Par contre, il est conseillé d'éviter de prendre des anti-inflammatoires non stéroïdiens tels que l'ibuprofène et l'aspirine. Ces derniers ont la capacité de fluidifier le sang et pourront aggraver la maladie vers la forme hémorragique (Chesneau et al., 1998). Par conséquent, la prévention primaire moyennant la lutte antivectorielle reste la stratégie la plus efficace pour limiter le risque d'infection.

V-1. Moyens préventifs contre les arbovirus

V-1-1. La lutte antivectorielle

La lutte antivectorielle a pour objectif de réduire ou d'arrêter le développement des populations de moustiques. L'OMS promeut une combinaison de méthodes comprenant :

- **Les protections individuelles et domestiques** : le port de vêtement long, la climatisation, l'emploi des répulsifs naturels (huiles essentielles de citronnelle, de lavande, de vetiver, etc ...) ou des répulsifs synthétiques (DEET, icaridine, PMD, etc., moustiquaires). Mais l'utilisation de ces substances doit être modérée à cause de leur toxicité (Carnevale et al., 2012; Hutt and Lavaud, 2022).
- **La gestion environnementale** : drainage des milieux humides, traitement des eaux usées, gestion des déchets solides, etc... Cette approche peut être difficilement applicable dans les régions rurales humides d'importance économique. Elle est également non sélective lorsqu'il s'agit de conserver intacts des milieux humides naturels à valeur écologique (Bawin et al., 2015).
- **Le contrôle chimique** : les larvicides, les insecticides comme le DDT, les organophosphorés et les pyréthrinoïdes. Malgré leur grande efficacité au début, ils engendrent en parallèle des pollutions environnementales conséquentes. En outre, les insectes deviennent résistants et compromettent l'efficacité de ces produits à long terme (Bawin et al., 2015).

- **Le contrôle biologique** : utilisation des prédateurs pour éliminer ou réduire les moustiques comme les poissons prédateurs (*Gambusia affinis*) (Subramaniam et al., 2015), les bactéries pathogènes (*Bacillus Cohn*) (Revathi et al., 2013), les parasites nématodes (Lieutier, 1985). L'usage de ces organismes prédateurs de moustiques est limitée par une production massive difficile et coûteuse, une activité prédatrice peu spécifique ainsi qu'un déséquilibre potentiel des écosystèmes (Bawin et al., 2015).
- **Le contrôle génétique** (altération ou substitution du matériel héréditaire) : introduction des individus stériles (stérilisation des moustiques mâles) (Oliva, 2012), contrôle symbiotique en perturbant la capacité des moustiques à transmettre un pathogène donné (genre *Wolbachia*) (Serbus et al., 2008). La technique semble être prometteuse mais il reste les problèmes sur l'impact de ces moustiques transgéniques sur l'évolution de l'environnement. (Bawin et al., 2015)

V-1-2. *Les vaccins*

Malgré sa pertinence et son évolution, la lutte antivectorielle présente des difficultés d'efficacité et de spécificité surtout dans les zones sauvages. Par conséquent, la vaccination reste nécessaire pour contrôler les infections causées par les flavivirus. Le développement de vaccins rencontre plusieurs obstacles comme le risque d'une maladie secondaire grave, la conception favorisée du vaccin à large spectre, l'obligation d'un coût faible pour la population cible. Au début des années 1920, les chercheurs ont commencé à mettre au point des vaccins et ont adopté plusieurs méthodes utilisant le virus inactivé, le virus vivant atténué, les sous-unités, l'ADN et les vecteurs viraux (Collins and Metz, 2017). Ainsi, des vaccins sont disponibles pour quatre flavivirus transmis par les arthropodes : YFV, JEV, TBEV et DENV.

Le vaccin 17D contre le YFV est un vaccin vivant atténué dérivé de la souche sauvage Asibi. Ce dernier est très efficace et est utilisé depuis les années 1930. Une seule dose offre une protection pendant au moins 30 ans sans provoquer d'effets secondaires majeurs. Il est important de noter que Max Theiler a reçu le prix Nobel de médecine à cause de ce vaccin. (Theiler and Smith, 1937a, 1937b; Collins and Barrett, 2017; Chong et al., 2019). Pour la prévention contre le JEV, il existe les vaccins vivants atténués issus de culture cellulaire, les vaccins inactivés issus de culture cellulaire ou de cerveau de souris et les vaccins vivants chimériques (Batchelor and Petersen, 2015). Pour le TBEV, des vaccins inactivés produits

avec différentes souches du virus ont été fabriqués en Europe occidentale (Collins and Metz, 2017).

Développer un vaccin contre les infections par le DENV est l'un des défis les plus complexes de la santé humaine vu l'importance de son incidence épidémiologique ainsi que sa complexité. En premier lieu, le DENV se présente sous forme de quatre sérotypes distincts avec plusieurs génotypes dans chaque sérotype. Deuxièmement, les manifestations graves de la dengue sont le plus souvent observées lors d'une infection secondaire. Le Dengvaxia est le seul vaccin homologué contre le DENV fabriqué par Sanofi Pasteur. Il s'agit d'un vaccin chimérique vivant atténué et constitué de souches de 17D avec les gènes d'enveloppe (pr-M et E) de DENV-1 à DENV-4 (Thomas and Yoon, 2019; Sanofi, 2017). En plus précis, les quatre virus chimériques, correspondant aux quatre sérotypes de la dengue, ont été combinés pour obtenir le vaccin tétravalent (Guy et al., 2011). Selon l'OMS, Dengvaxia est efficace et sûr chez les personnes âgées de 9 ans et plus, ayant été infectées par le virus auparavant et vivant dans une zone endémique de la dengue (World Health Organization, 2018). L'utilisation du Dengvaxia est approuvée au Mexique, aux Philippines, au Brésil en décembre 2015, au Salvador, au Costa Rica, au Paraguay, au Guatemala, au Pérou, en Indonésie, en Thaïlande, à Singapour en 2016 (Sanofi, 2017) et aux Etats-Unis en 2019 (FDA, 2020; CDC, 2022).

D'autres vaccins contre l'infection par les 4 sérotypes de la dengue sont en essai clinique et rapportés dans le Tableau 6.

Tableau 6- Les vaccins candidats contre la dengue en phase clinique (Guzman et al., 2017)

Stratégie	Vaccin	Description	Institut	Phase de développement
Vaccin chimérique vivant atténué	CYD-TDV	pr-M/E, DENV-1 à DENV-4 , insérés dans 17D YFV	SANOFI PASTEUR	Phase III
	TAK-003	pr-M/E, DENV-1 à DENV-3 ; insérés dans DENV-2 atténué	Inviragen (DENVax) et Takeda	Phase II
	TV-003/ 005	prM et E , DENV-1 à DENV-3 , insérés dans la colonne vertébrale DENV-4 (atténué par la suppression de 30 nucléotides dans le 3'UTR)	NIAID	Phase II
Vaccins à sous-unités recombinantes	V180	Sous-unité de protéine E/NS1 exprimée en drosophile	MERCK	Phase I
Vaccin inactivé	TDENV PIV	Virus inactivé purifié entier	GSK/WRAIR/Bio manguinhos	Phase I
Vaccin ADN	D1ME	Gènes des protéines pr-M et E	US Naval Medical Research Center	Phase I

Dans le cas de ZIKV, aucun vaccin n'a été mis en circulation. Par contre, les complications neurologiques congénitales de la maladie chez la femme enceinte ont poussé à la recherche et au développement de vaccins. Plusieurs candidats sont en phases non cliniques avec différentes plateformes de vaccin (Lin et al., 2018; Poland et al., 2019). Certains candidats se trouvent en phase clinique et sont illustrés dans le Tableau 7.

Tableau 7- Les vaccins candidats contre ZIKV en phase clinique (Lin et al., 2018; Poland et al., 2019)

Stratégie	Vaccin	Description	Institut	Phase de développement
Vaccin chimérique vivant atténué	rZIKV/D4Δ30-713	pr-M/E, ZIKV ; insérés dans DENV-4	NIAID	Phase I
Vaccins à sous-unités recombinantes	Ni	Vecteur viral recombinant de la rougeole (pr-M/E)	Thémis Bioscience	Phase I
Vaccin inactivé	Ni	Virus inactivé purifié entier	WRAIR/BIDMC/Harvard/NIAID/Sanofi	Phase I
Vaccin ADN	Ni	pr-M/E	GeneOne/InOvio	Phase I
	Ni	pr-M et E	VRC/NIAID	Phase I/ II
Peptide	Ni	Protéines salivaires de moustique	NIH	Phase I
ARNm	Ni	pr-M/E	Thérapeutique moderne	Phase II

ni : non indiqué

V-2. Moyens curatifs contre les arbovirus : les antiviraux

Les antiviraux sont des molécules qui ont la capacité d'inhiber la multiplication des virus permettant ainsi à l'organisme de les éliminer facilement. On peut classer les antiviraux selon leur mode d'action, leur cible, leur nature et leur origine (Lim, 2019). Dans ce chapitre, les antiviraux seront classés suivant leur cible. Ainsi, il existe deux types d'antiviraux (Lim, 2019) :

- Les antiviraux DAA (Direct-Acting Antiviral) ciblant la particule infectieuse et son cycle viral
- Les antiviraux HDA (Host-Directed Antiviral) ciblant la machinerie de la cellule hôte

V-2-1. Les antiviraux ciblant la particule infectieuse et son cycle viral (DAA)

Généralement, les DAA interagissent spécifiquement avec une protéine virale qui leur donne l'avantage d'être moins toxique mais l'inconvénient est le risque relatif à la résistance du pathogène. Les DAA peuvent agir directement avec la particule virale, en tant que virucide ou virostatique, en neutralisant ainsi son infectivité. Les DAA peuvent inhiber l'entrée du virus dans la cellule hôte en se mettant en interaction avec les protéines structurales essentiellement la protéine E (Tableau 8) (Lim, 2019). Certaines molécules interagissent avec les protéines non structurales responsables de la réplication du virus. Les protéines non structurales les plus importantes sont NS3 et NS5. Pour NS3, la plupart des études se sont concentrées sur l'inhibition de la fonction de sérine protéase NS3/NS2B (Tableau 8). Les études visant la protéine NS5 se concentrent sur sa fonction en tant que protéine RdRP polymérase (Tableau 8).

D'autres études ont mis en évidence un inhibiteur du DENV, SDM25N, qui inhibe la réplication virale en agissant directement ou indirectement avec la protéine virale NS4B (van Cleef et al., 2013). Une étude récente a également décrit pour la première fois un inhibiteur de l'interaction NS3-NS4B : JNJ-A07. Avec des modèles d'infection chez les souris, JNJ-A07 (avec une concentration d'ordre de pM – nM) a montré un profil pharmacocinétique favorable qui se traduit par une efficacité exceptionnelle contre l'infection. Un analogue est actuellement en cours de développement clinique (Kaptein et al., 2021). Par ailleurs, Good et ses collaborateurs ont montré que le traitement avec AT-752 a significativement réduit la virémie et a augmenté le taux de survie chez les souris infectés par le DENV. AT-752 est un double promédicament, un analogue de nucléotide de la guanosine qui est disponible par voie orale (Good et al., 2021).

Pour le ZIKV, des expériences *in vivo* ont démontré l'activité d'un peptide synthétique Z2 (inhibiteur de l'entrée virale) chez des souris et ses fœtus (Yu et al., 2017b). Une autre étude a également montré le potentiel antiviral du 7-déaza-2'-C-méthyladénosine (7DMA) pour prévenir la transmission sexuelle. L'expérience a été effectuée avec des souris mâles AG129 infectées par un isolat de ZIKV du Suriname (Jacobs et al., 2019). D'autres exemples de composés anti-ZIKV et anti-DENV sont mentionnés dans le tableau 8 et leur structure est illustré dans l'Annexe 2.

Tableau 8- Liste non exhaustive des antiviraux DAA contre ZIKV et DENV (Troost and Smit, 2020)

Cible antivirale	Virus	Molécule	Système de validation	Référence
Action virucide	DENV, ZIKV	EGCG, curcumine	<i>In vitro</i>	(Carnevale et al., 2012; Padilla-S et al., 2014; Sharma et al., 2017; Jennings and Parks, 2020)
Protéine E	DENV	1662G07 et analogues	Optimisation informatique	(Schmidt et al., 2012)
	DENV	Sulfate de Curdlan	<i>In vitro</i>	(Ichiyama et al., 2013)
	DENV-2	10AN1 ; DN57Opt ; DN59	Optimisation informatique	(Costin et al., 2010)
	DENV-2	Rolitétracycline, Doxycycline	Approches combinatoires	(Yang et al., 2007)
	DENV-1 à 4	Pradmicine-S	<i>In vitro</i>	(Alen et al., 2011)
Protéine C	DENV-2	VGTI-A3/VGTI-A3-03	<i>In vitro</i>	(Smith et al., 2018)
	DENV	Pep14-23	<i>In vitro</i>	(Faustino et al., 2015)
RdRP NS5	DENV-2	Balafiravir	<i>In vitro/ in vivo</i>	(Chen et al., 2014)
	DENV	2'-C-méthylcytidine	<i>In vitro/ in vivo</i>	(Lee et al., 2015)
	DENV	Purine	<i>In silico/ in vitro</i>	(Venkatesham et al., 2017)
	DENV, ZIKV	Dérivé 9d de la 2,6-diaminopurine	<i>In vitro</i>	(Vincetti et al., 2019)
	DENV, ZIKV	Sofosbuvir	<i>In silico/in vitro/ in vivo</i>	(Bullard-Feibelman et al., 2017; Gan et al., 2018)
	DENV, ZIKV	Sofosbuvir	<i>In silico/in vitro/ in vivo</i>	(Bullard-Feibelman et al., 2017; Gan et al., 2018)
NS2B-NS3	ZIKV	Novobiocine, lopinavire, ritonavire	<i>In silico/in vitro</i>	(Yuan et al., 2017)
	ZIKV	Bromocriptine	<i>In silico/in vitro</i>	(Chan et al., 2017)
	DENV-2	Nelfinavire	<i>In vitro</i>	(Bhakat et al., 2015)
	DENV, ZIKV	Carnosine	<i>In vitro</i>	(Rothan et al., 2019)
	DENV, ZIKV	Hybrides thiazolidinone-peptide	<i>In vitro</i>	(da Silva-Júnior and de Araújo-Júnior, 2019)
	DENV	Rétrocycline 1	<i>In vitro</i>	(Rothan et al., 2012)
	DENV-2	Policresulène	<i>In vitro</i>	(Wu et al., 2015)
	DENV, ZIKV	Ivermectine	<i>In vitro</i>	(Tay et al., 2013; Ketkar et al., 2019)
NS3	DENV	Suramine	<i>In vitro</i>	(Basavannacharya and Vasudevan, 2014)
NS4 B	DENV	Dasatinib	<i>In silico/ inv vitro</i>	(de Wispelaere et al., 2013)
	DENV-2	SDM25N	<i>In vitro</i>	(van Cleef et al., 2013)
NS3-NS4B	DENV	JNJA07	<i>In vitro/in vivo</i>	(Kaptein et al., 2021)

V-2-2. Les antiviraux ciblant la cellule hôte (HDA)

Les virus utilisent les voies et enzymes cellulaires pour leur réplication virale facilitant la propagation des virions infectieux. Ainsi, l'identification de composés inhibiteurs de ces processus cellulaires (HDA) peut être une stratégie antivirale efficace et prometteuse. En plus, les arbovirus sont des virus à ARN, ainsi ils présentent des taux de mutation beaucoup plus élevés que ceux enregistrés pour les virus à ADN. En effet, les polymérase (RdRp) des virus à ARN, possèdent un taux d'erreur très élevé par rapport aux ADN polymerases qui semblent très fidèles durant le cycle cellulaire classique (Marmier et al., 2010). La résistance aux

inhibiteurs viraux peut s'avérer un problème particulièrement grave pour ces infections. Dans ce cadre, les HDA présentent un risque moindre de développement de résistance augmentant ainsi leur efficacité. Néanmoins, les HDA sont généralement plus toxiques que les DAA à cause de leur interférence avec l'homéostasie cellulaire. Pour minimiser la toxicité, l'inhibition doit être extrêmement précise. En ciblant les voies cellulaires communes qui sont nécessaires au cycle de vie des différents virus, les HDA pourraient potentiellement être développés pour traiter plusieurs maladies virales (Pastorino et al., 2010). Divers antiviraux HDA inhibent les différentes étapes du cycle de réplication virale (Tableau 9). L' α -glucosidase est la cible cellulaire la plus étudiée. Il a le rôle de faciliter le repliement et la maturation des protéines. Il y a également l'inosine monophosphate déshydrogénase cellulaire qui a une fonction essentielle dans la biosynthèse des nucléotides (Tableau 9) (Troost and Smit, 2020). Comme les DAA, peu de HDA ont été testées dans des essais cliniques contre ZIKV et DENV. Nous pouvons prendre comme exemple le cas d'UV-4B. Il s'agit d'un inhibiteur de l' α -glucosidase avec un bon profil de sécurité jusqu'à une concentration de 1000 mg. Cependant, une étude de suivi portant sur la pharmacocinétique des UV-4B chez des volontaires sains a été arrêtée (Low et al., 2018).

D'autres études ont confirmé l'inhibition de l'absorption du ZIKV du 25-hydroxycholestérol. Cela engendre une protection contre les symptômes du ZIKV et la microcéphalie (Li et al., 2017). Ces molécules doivent passer aux essais cliniques.

Les structures chimiques des antiviraux HDA cités dans le tableau 9 sont illustrés dans l'Annexe 3.

Tableau 9- Liste non exhaustive des antiviraux HDA contre ZIKV et DENV (Pastorino et al., 2010; Troost and Smit, 2020)

Molécule	Cible cellulaire	Mécanisme
R428/MYD1	Récepteur AXL	Inhibition de l'entrée
Duramycine	Récepteur TIM 1	
Prochlorperazine	Antagoniste des récepteurs dopaminergiques D2	Inhibition médiée par la clathrine
Chloroquine	Étapes d'entrée dépendantes d'un pH bas et maturation virale dépendante de la furine	Inhibition de la fusion et de la maturation
Cerulenin, Orlistat	Synthase d'acide gras	Inhibition de la réplication virale
Méthyl-β-cyclodextrine	Biosynthèse du cholestérol	
Fluvastatine, atorvastatine, pravastatine, simvastatine, Hyméglusine, lovastatine	HMG-CoA réductase	
Acide zaragozique	Squalène synthétase	
Lactacystine,	Voie du protéasome	
N-allyl-acridone	Inosine monophosphate déshydrogénase	
Sunitinib	Kinases AAK1 et GAK	
2-désoxy- D -glucose (2DG)	Hexokinase	
Imatinib	BCR-Abl kinase	

Schisandrine A	Réponses à l'interféron antiviral médiées par STAT1/2	
Hydroxychloroquine	Induction des voies IFN- β , AP-1 et NFkB et production d'espèces réactives de l'oxygène	
Asunaprevir	Voies mitochondriales des protéines de signalisation antivirales	
Minocycline	ERK 1/2 et IFN- α	
Oxamate	Lactate déshydrogénase	
Leptomycine B	Protéine CRM1	
Lactimidomycine	Elongation de la traduction	
Bortezomib	Voie du protéasome	Inhibition de la sortie
β-lactone	Voie ubiquitine-protéasome	Inhibition de la sortie
Lutéoline	Furine	Production de particules DENV matures
Acide nordihydroguaiarétique	Formation de gouttelettes lipidiques dans les cellules/biosynthèse des acides gras	Inhibition de l'assemblage et de la réplication
Bréquinar	Dihydroorotate déshydrogénase	Assemblage/libération virale
Ribavirine, Acide mycophénolique	Inosine monophosphate déshydrogénase	Appauvrissement en guanosine
Ciclosporine	Interaction de la cyclophiline A et NS5	Repliement/réplication des protéines
Dasatinib	Fyn kinase	Inhibition des kinases SRC FYN
Castanospermine	α -glucosidase	Interférence de pliage prM et E
Celgosivir		Accumulation de E et NS1 dans ER
Deoxynojirimycine		Inhibition du bourgeonnement du RE
UV-4, UV-4B, Kotalanol		Interférence avec le repliement de la glycoprotéine virale
Dexaméthasone	Activité anti-inflammatoire et immunosuppressive	Prévention de la thrombocytopénie
Salidroside	Rig-I	Inhibition de la synthèse des protéines virales
Lanatoside C	Pompe Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	Inhibition de la synthèse d'ARN
Généticine	80S ribosome	Inhibition de la traduction des protéines
Kétotifène , Cromolyne, Montelukast	Modulateur de mastocytes	Réduction des fuites vasculaires

A ce jour, il n'existe aucun traitement antiviral approuvé pour guérir et soigner le zika et la dengue. La prise en charge des patients est principalement axée sur le traitement des symptômes. Alors que d'une part, les tentatives récentes de contrôle des vecteurs des arboviroses se sont avérées difficiles et possèdent beaucoup de limites jusqu'à un impact néfaste probable à l'écosystème. D'autre part, la fabrication des vaccins anti-flavivirus reste en minorité, en raison de la complexité de ces virus avec leur différents sérotypes et génotypes, la co-circulation et co-infection de plusieurs virus sur un même territoire dans une même période, la vulnérabilité des patients (souvent des enfants). En outre, les vaccins idéaux devraient avoir un faible coût et être stables à température ambiante pour faciliter la distribution dans les zones tropicales et sub-tropicales. Ainsi, une combinaison équilibrée de la lutte antivectorielle avec l'utilisation d'antiviraux et de vaccins fournira la meilleure solution pour limiter les épidémies de flavivirus.

Plusieurs pistes de recherche peuvent mener vers la mise au point d'antiviraux efficaces contre les flavivirus. D'une part, il y a le repositionnement des médicaments déjà utilisés contre d'autres maladies infectieuses. D'autre part, on retrouve les recherches d'agents antiviraux auprès des produits naturels. (Abd Kadir et al., 2013; Batista et al., 2019; Maryam et al., 2020; Chavda et al., 2022). Dans ce cas, la procédure commune est de partir de l'extrait de plantes médicinales pour arriver à l'isolement des molécules bioactives. D'autres études sont également lancées à partir d'un dépistage massif des produits naturels issus des différentes bibliothèques chimiques contre les flavivirus cibles (Goh et al., 2020).

C. La biodiversité végétale : source de molécules bioactives contre le zika et la dengue

Depuis l'Antiquité, la population humaine a recherché dans la nature, les nourritures, les outils de construction et surtout les remèdes pour traiter diverses maladies infectieuses (Petrovska, 2012). Les plantes médicinales possèdent des propriétés médicamenteuses pouvant être exploitées pour améliorer les santés humaine et animale. Elles peuvent également avoir des usages alimentaires et/ou cosmétiques (Ranarijaona et al., 2012; Ndjele et al., 2022). On les nomme « usines vivantes » parce qu'elles sont impliquées dans la synthèse d'une vaste gamme de substances médicinales importantes telles que les métabolites primaires (régulateurs de croissance) et secondaires (système de défense des plantes) (Massiot, 1994). Les plantes médicinales regroupent une part importante de la biodiversité naturelle. Ces dernières années, leur rôle et leur importance ont été de plus en plus reconnus et mis en valeur, entraînant une nouvelle approche thérapeutique dans le domaine médical. On utilise soit la plante entière, soit certaines parties de la plante comme les différents organes (fruits, graines, feuilles, fleurs), les racines, les tiges et les écorces, etc...

I. Les plantes comme une source des molécules à activité antivirale

Les plantes médicinales sont des sources potentielles d'agents antiviraux. Plusieurs études ont rapporté qu'une grande variété de substances naturelles telles que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les terpénoïdes, les polyphénols, les coumarines et les lignanes inhibent l'entrée ou la réplication virale (Chattopadhyay and Naik, 2007; Chattopadhyay et al., 2015). En 1952, la première recherche sur les plantes antivirales a consisté à cribler 288 espèces dont 12 se sont révélées efficaces contre la grippe (Chattopadhyay and Naik, 2007; Chattopadhyay et al., 2015). Par la suite, de nombreux essais *in vitro* et *in vivo* sur plusieurs virus responsables des épidémies comme le virus respiratoire syncytial (VRS), le para-influenza (Chattopadhyay et al., 2015), le HSV (Chattopadhyay and Khan, 2008), les HIV-1/HIV-2, le YFV, le CHIKV, le ZIKV et les sérotypes DENV (Abd Kadir et al., 2013) ont été réalisés avec des extraits de plantes dans le but d'isoler et d'identifier des molécules antivirales potentielles.

II. Les produits naturels d'origine végétale anti-zika et anti-dengue

La recherche de nouveaux agents antiviraux à base de plantes a pris une place importante dans les stratégies de contrôle des infections par le zika et la dengue (Abd Kadir et al., 2013). En effet, les substances naturelles sont généralement considérées comme moins toxiques et nocives que les drogues synthétiques (Naithani et al., 2008). Elles apparaissent également comme une alternative plus économique, plus écologique et plus accessible par rapport aux molécules antivirales synthétiques dont les processus de fabrication sont souvent longs et lourds. (Goh et al., 2020). La plupart de ces plantes ont été largement utilisées par la médecine traditionnelle pour traiter les infections virales (Naithani et al., 2008). Certains d'entre elles ont montré une activité *in vitro* et *in vivo* contre la dengue (Tableau 10 et 11). Malheureusement, leurs mécanismes d'action ne sont pas encore validés ou moins développés constituant une limite à leur utilisation et à leur valorisation (Haddad et al., 2021).

Tableau 10- Liste non exhaustive des extraits de plantes médicinales (ou leur composés actifs) inhibiteurs de l'infection *in vitro* de ZIKV et DENV

Plante	Type d'extrait / Molécule active	Virus (Modèle cellulaire)	IC ₅₀	Référence
<i>Acacia catechu</i>	Peptides isolés	DENV-2 (Vero)	IC ₅₀ = 0,18 µg. mL ⁻¹	(Panya et al., 2019)
<i>Acorus calamus L.</i>	Extrait EtOH (racine) Tatanan A	DENV-2 (BHK-21)	IC ₅₀ = 3,9 µM	(Yao et al., 2018)
<i>Alternanthera philoxeroides</i>	Extrait éther Extrait éthyléther Extrait AcOEt Extrait de coumarines (partie entière)	DENV-2 (C636)	IC ₅₀ = 47,43 µg. mL ⁻¹ IC ₅₀ = 86,67 µg. mL ⁻¹ IC ₅₀ = 97,63 µg. mL ⁻¹ IC ₅₀ = 106,06 µg. mL ⁻¹	(Jiang et al., 2005)
<i>Anacolosa pervilleana</i>	Extrait AcOEt (feuilles) Acides polyacétyléniques	DENV NS5 polymérase	IC ₅₀ ≈ 3 µM	(Bourjot et al., 2012a)
<i>Andrographis paniculata</i>	Andrographolide	DENV-2 (HepG2 → HeLa →)	IC ₅₀ = 21,3 µM IC ₅₀ = 22,7 µM	(Panraksa et al., 2017)
<i>Aphloia theiformis</i>	Extrait aqueux (partie aérienne)	ZIKV DENV-1 à 4 (Vero, HuH7)	IC ₅₀ = 27,6 µg. mL ⁻¹ ni	(Clain et al., 2018)
<i>Arrabidaea pulchra</i>	Extrait EtOH (feuilles)	DENV-2 (Vero)	IC ₅₀ = 46,8 µg. mL ⁻¹	(Brandão et al., 2013)
<i>Artemisia douglasiana</i>	Huile essentielle	DENV-2 (Vero)	VC ₅₀ = 60 ppm	(García et al., 2003)
<i>Ayapana triplinervis</i>	Huile essentielle (Partie aérienne) THQ	ZIKV DENV-1 à 4 (A549, Vero)	IC ₅₀ = 38 et 45 µg. mL ⁻¹ ni	(Haddad et al., 2019)
<i>Azadirachta indica</i>	Extrait aqueux (feuilles)	DENV-2 (C636)	ni	(Parida et al., 2002)
<i>Basilicum polystachyon</i>	Acide stachyonique	DENV (Vero)	IC ₅₀ = 1,4 µM	(Tan et al., 2019)
<i>Berberis vulgaris</i>	Berbélerine Emodine	ZIKV (Vero)	IC ₅₀ = 39,06 µM IC ₅₀ = 3,2 µM	(Batista et al., 2019)
<i>Boesenbergia rotunda</i>	Extrait MeOH (rhizome)	DENV-2 NS2B/NS3 prot	ni	(Kiat et al., 2006)
<i>Bryothamnion triquetrum</i>	Extrait dichlorométhane (algues)	ZIKV MR766 (Vero)	IC ₅₀ = 1,38 µg. mL ⁻¹	(Cirne-Santos et al., 2021)

<i>Camellia sinensis</i>	EGCG	ZIKV DENV-2 (Vero)	ni	(Haddad et al., 2021)
<i>Castanospermum australe</i>	Castanospermine	DENV-2 (Huh7 → BHK-21 →	IC ₅₀ = 85,7 µM IC ₅₀ = 1 µM	(Whitby et al., 2005)
<i>Chondrus crispus</i>	Iota Carragenane	DENV-2 Vero	IC ₅₀ = 7 µg.mL ⁻¹	(Talarico et al., 2011)
<i>Cissampelos pareira</i>	Extrait EtOH (partie aérienne)	DENV-1 DENV-2 DENV-3 DENV-4 (LLC-MK2)	IC ₅₀ = 11,11 µg. mL ⁻¹ IC ₅₀ = 1,97 µg. mL ⁻¹ IC ₅₀ = 3,17 µg. mL ⁻¹ IC ₅₀ = 1,23 µg. mL ⁻¹	(Sood et al., 2015)
<i>Cladogynos orientalis</i>	Extrait EtOH 70% (partie entière)	DENV-2 (Vero)	IC ₅₀ ≈ 100 µg. mL ⁻¹	(Klawikkan et al., 2011)
<i>Cladosiphon okamuranus</i>	Fucoidane	DENV-1 DENV-2 DENV-3 DENV-4 (BHK-21)	IC ₅₀ > 1000 µg. mL ⁻¹ IC ₅₀ = 4,7 µg. mL ⁻¹ IC ₅₀ = 500 µg. mL ⁻¹ IC ₅₀ = 365 µg. mL ⁻¹	(Hidari et al., 2008)
<i>Coptis chinensis</i>	Palmatine	DENV-2 (Vero)	IC ₅₀ = 26,4 µM IC ₅₀ = 1030 µM	(Jia et al., 2010)
<i>Cryptocarya chartacea</i>	Chartaceone C Chartaceone D Chartaceone E Chartaceone F Ecorce de tronc	DENV NS5 RdRp	IC ₅₀ = 4,2 µM IC ₅₀ = 1,8 µM IC ₅₀ = 2,9 µM IC ₅₀ = 2,4 µM	(Allard et al., 2011)
<i>Cryptonemia crenulata</i>	Extrait polysaccharidique	DENV-1 DENV-2 DENV-3 DENV-4 (Vero)	IC ₅₀ > 50 µg. mL ⁻¹ IC ₅₀ = 1 µg. mL ⁻¹ IC ₅₀ = 14,2 µg. mL ⁻¹ IC ₅₀ = 29,3 µg. mL ⁻¹	(Talarico et al., 2005)
<i>Curcuma longa</i>	Extrait EtOH 95%	DENV-2 Huh7	IC ₅₀ = 17,91 µg. mL ⁻¹	(Ichsyani et al., 2017)
<i>Curcuma longa</i>	Curcumine	ZIKV (HeLa Vero BHK-21)	IC ₅₀ = 1,90 µM ni ni	(Mounce et al., 2017)
<i>Cymbopogon citratus</i>	Extrait MeOH(racine)	DENV-2 (HuH7)	IC ₅₀ = 29,37 µg. mL ⁻¹	(Rosmalena et al., 2019)
<i>Delphinium consolida</i>	Delphinidine	ZIKV DENV-2 (Vero)	ni	(Haddad et al., 2021)
<i>Distictella elongata</i>	Extrait EtOH (feuilles) Pectolinarine Pectolinarine + acacétin-7-O-rutinoside	DENV-2 (LLC-MK2)	IC ₅₀ = 9,8 µg. mL ⁻¹ IC ₅₀ = 86,4 µg. mL ⁻¹ IC ₅₀ = 11,1 µg. mL ⁻¹	(Simões et al., 2011)
<i>D.purpurea</i>	Digitonin	ZIKV (Vero)	IC ₅₀ = 3,77 µM	(Gao et al., 2019)
<i>Doratoxylon apetalum</i>	Extrait EtOH (partie aérienne)	ZIKV (A549) DENV-1 DENV-2 DENV-3 DENV-4 (Huh7.5)	IC ₅₀ = 17,5 µg. mL ⁻¹ IC ₅₀ = 96,35 µg. mL ⁻¹ IC ₅₀ = 16,75 µg. mL ⁻¹ IC ₅₀ = 25,9 µg. mL ⁻¹ IC ₅₀ = 23,3 µg. mL ⁻¹	(Haddad et al., 2019a)
<i>Eupatorium patens</i>	Huile essentielle	DENV-2 (Vero)	VC ₅₀ = 150 ppm	(García et al., 2003)
<i>Flacourtia ramontchi</i>	Ecorce de la tige 3-β-cafféate d'acide bétulinique	DENV NS5 polymérase	IC ₅₀ = 0,85 µM	(Bourjot et al., 2012b)
<i>Flagellaria indica</i>	Extrait EtOH (plante entière)	DENV-2 (Vero)	ni	(Klawikkan et al., 2011)
<i>Ficus septica</i>	Extrait MeOH (feuilles)	DENV-2 A549	IC ₅₀ = 18,37 µg. mL ⁻¹	(Huang et al., 2017)
<i>Gastrodia elata</i>	WSS45 : dérivé sulfate de D-glucane	DENV-2 (BHK)	IC ₅₀ = 0,68 µg. mL ⁻¹	(Tong et al., 2010)
<i>Garcinia mangostana</i>	α-mangostine	DENV-2 (Vero, Huh7,	ni	(Tarasuk et al., 2017)

		HepG2)		
<i>Gossypium sp</i>	Gossypol Dérivés de gossypol	ZIKV (Vero, LLC-MK2)	IC ₅₀ = 3,78 µM IC ₅₀ = 2,29 à 35,02 µM	(Haddad et al., 2021; Gao et al., 2022)
<i>Gymnogongrus griffithsiae</i>	Extrait polysaccharidique	DENV-1 DENV-2 DENV-3 DENV-4 (Vero)	IC ₅₀ > 50 µg. mL ⁻¹ IC ₅₀ = 0,9 µg. mL ⁻¹ IC ₅₀ = 13,9 µg. mL ⁻¹ IC ₅₀ > 50 µg. mL ⁻¹	(Talarico et al., 2005)
<i>Gymnogongrus torulosus</i>	Hybrides de DL-galactane	DENV-2 (Vero)	IC ₅₀ = 0,19 - 1,7 µg. mL ⁻¹	(Pujol et al., 2002)
<i>Houttunya cordata</i>	Extrait EtOH (partie entière)	DENV-2 (Vero)	ni	(Klawikkan et al., 2011)
<i>Hypericum perforatum</i>	Isoquercitrine	ZIKV (A549, HuH7, SH-SY5Y)	IC ₅₀ = 15,5 ; 14 ; 9,5 µM	(Gaudry et al., 2018)
<i>Kaempferia parviflora</i>	Bornéol, flavonoïdes	DENV-2	ni	(Lim et al., 2021a)
<i>Lantana grisebachii</i>	Huile essentielle	DENV-2 (Vero)	VC ₅₀ = 21,1ppm	(García et al., 2010)
<i>Leucaena leucocephala</i>	Dérivés sulfates de galactomannanes	DENV-1 C636	ni	(Ono et al., 2003)
<i>Lippia alba</i>	Huile essentielle	DENV-2 (Vero)	IC ₅₀ = 0,4 µg.mL ⁻¹	(Ocazionez et al., 2010)
<i>Mimosa scabrella</i>	Dérivés sulfates de galactomannanes	DENV-1 (C636)	ni	(Ono et al., 2003)
<i>Momordica charantia</i>	Extrait MeOH (partie non spécifiée)	DENV-1 (Vero)	IC ₅₀ = 0,20 mg. mL ⁻¹	(Tang et al., 2012)
<i>Myristica fatua</i>	Extrait méthanol (partie non spécifiée)	DENV-2 HuH7	IC ₅₀ = 25,3 µg. mL ⁻¹	(Rosmalena et al., 2019)
<i>Nephelium lappaceum</i>	Géranine	DENV-2 (Vero)	IC ₅₀ = 1,76 µM	(Abdul Ahmad et al., 2017)
<i>Ocimum sanctum</i>	Extrait MeOH (partie aérienne)	DENV-1 (HepG2)	ni	(Ling et al., 2014)
<i>Phyllanthus amarus, P.niruri, P. urinaria, P.watsonii</i>	Extrait aqueux (mélange des 4 espèces) Extrait MeOH (mélange des 4 espèces)	DENV-2 (Vero)	ni ⁻¹	(Lee et al., 2013)
<i>Piper retrofractum</i>	Extrait EtOH (partie entière) Extrait DCM (partie aérienne)	DENV-2 (Vero)	ni	(Klawikkan et al., 2011)
<i>Psidium guajava</i>	Extrait EtOH (tige)	DENV-2 (Vero)	IC ₅₀ = 7,8 µg. mL ⁻¹	(Trujillo-Correa et al., 2019)
<i>Psiloxylon mauritianum</i>	Extrait aqueux (partie aérienne / La Réunion)	ZIKV DENV-1 à 4 (Vero, Huh7)	ni	(Clain et al., 2019)
<i>Quercus lusitanica</i>	Extrait MeOH (graines)	DENV-2 (C636)	ni	(Muliawan et al., 2006)
<i>Rhizophora apiculata</i>	Extrait EtOH (partie entière)	DENV-2 (Vero)	ni	(Klawikkan et al., 2011)
<i>Schisandra chinensis</i>	Schisandrine A	DENV-2 (Huh7)	IC ₅₀ = 28,1 µM	(Yu et al., 2017a)
<i>Scutellaria baicalensis</i>	Racine Baicaléine	DENV-2 (Vero)	IC ₅₀ = 6,46 µg. mL ⁻¹	(Zandi et al., 2013)
<i>Senna augustifolia</i>	Extrait EtOH (feuilles)	DENV-2 NS2B-NS3 Pro	IC ₅₀ = 30,1 µg. mL ⁻¹	(Rothan et al., 2014)
<i>Tarenna asiatica</i>	Extrait acétone (feuilles)	DENV (C636)	ni	(Pratheeba et al., 2019)
<i>Tephrosia madrensis</i>	Glabranine 7-O-méthylglabranine	DENV-2 (LLCMK2)	IC ₅₀ = 7,8 µM IC ₅₀ < 12 µM	(Sánchez et al., 2000)
<i>Tridax procumbens</i>	Extrait EtOH (feuilles)	DENV-2 NS2B-NS3 Pro	IC ₅₀ = 25,6 µg. mL ⁻¹	(Rothan et al., 2014)

<i>Trigonostemum cherrieri</i>	Trigocherine A Trigocheriolide A Trigocheriolide B	DENV-2 polymérase	NS5	IC ₅₀ = 12,7 µM IC ₅₀ = 3,1 µM IC ₅₀ = 16 µM	(Allard et al., 2012)
<i>Turnera diffusa</i>	Pinocembrine	ZIKV (JEG-3)		IC ₅₀ = 17,44 µM	(Lee et al., 2019a; Haddad et al., 2021)
<i>Vernonia cinerea</i>	Extrait MeOH (feuilles)	DENV-2 NS3 prot	NS2B-	IC ₅₀ = 23,7 µg. mL ⁻¹	(Rothan et al., 2014)
<i>Zostera marina</i>	Ac zostérique CF 238	DENV-2		IC ₅₀ = 2,3 mM IC ₅₀ = 2,5 mM	(Rees et al., 2008)

ni : non indiqué

Les évaluations de l'activité anti-ZIKV et anti-DENV *in vivo* avec les plantes médicinales ou leurs composés actifs restent modérées (Tableau 11). Alors que toute étude approfondie sur le potentiel de ces plantes avec leurs molécules bioactives, mérite de faire l'objet d'essais supplémentaires avec des modèles pré-cliniques en termes d'évaluation de toxicité, de biodisponibilité et d'efficacité. On peut citer quelques exemples. Des études *in vivo* avec l'extrait de feuilles de *Azadirachta indica* ont montré son potentiel à bloquer la réplication virale de la dengue (Tableau 11) par l'absence de symptômes cliniques et d'amplicons spécifiques liés à la dengue chez les souris allaitantes (Parida et al., 2002). Une étude a également montré que le traitement journalier à la castanospermine a empêché la mortalité chez les souris après l'infection par le DENV (Whitby et al., 2005). Ichsyani et ses collaborateurs ont montré la capacité de l'extrait de *Curcuma longa* à réduire considérablement la charge virale des souris infectées par le DENV (Ichsyani et al., 2017). Ces études montrent le potentiel antiviral des plantes médicinales contre le DENV avec une faible cytotoxicité et une inhibition efficace.

Tableau 11- Évaluation de l'activité antivirale *in vivo* de certaines plantes médicinales contre ZIKV et DENV

Plante	MV/ molécules	Virus	Résultats	Référence
<i>Azadirachta indica</i>	Extrait aqueux (feuilles)	DENV-2 Souris allaitantes (inoculation intracérébrale)	Inhibition de l'infection avec 120–30 mg.mL ⁻¹	(Parida et al., 2002)
<i>Castanospermum australe</i>	Castanospermine	DENV-2 Souris A/J (Voie intracrânienne)	Réduction marquée de la morbidité et de la mortalité des souris infectées pendant un traitement de 10 jours, Dose : 250 mg.kg ⁻¹	(Whitby et al., 2005)
<i>Curcuma longa</i>	Extrait EtOH	DENV-2 Souris mâles et femelles (Voie intrapéritonéale)	Réduction de la période de virémie à 6 et 24 heures post-infection. Dose : 500 et 1000 mg.kg ⁻¹	(Ichsyani et al., 2017)

Les mécanismes d'action de ces substances antivirales doivent être identifiés de manière à faciliter leur exploitation dans la recherche et le développement des médicaments. En se concentrant sur chaque étape du cycle infectieux, les antiviraux peuvent interagir :

- 1) Avec la particule infectieuse ;
- 2) Durant l'entrée de la particule virale dans la cellule hôte (attachement, internalisation et fusion) ;
- 3) Durant les phases tardives du cycle viral (synthèse de l'ARN, réplication, assemblage, maturation et relargage) ;

II-1. Action directe des substances naturelles au niveau de la particule virale

Les antiviraux peuvent agir directement sur la particule virale en étant virostatiques ou virucides. Un virostatique perturbe la structure de la particule virale engendrant une inhibition de sa croissance et de sa multiplication. Un virucide induit, en plus de ces changements morphologiques, des dommages à l'ARN ou à l'ADN du virus. Il a été démontré que les plantes riches en composés phénoliques sont susceptibles d'inhiber l'infectiosité de ZIKV et DENV (Haddad et al., 2021) : *A. theiformis*, *P. mauritianum*, *K. parviflora*, *S. baicalensis*, *R. apiculata*, etc...(Klawikkan et al., 2011; Clain et al., 2018, 2019; Zhao et al., 2019; Haddad et al., 2020; Lim et al., 2021a). Les polyphénols comme l'épigallocatechine gallate dans le thé vert (*C. sinensis*), la delphinidine (*D. consolida*) et la curcumine (*C. longa*) ont été décrits comme virucides contre ZIKV et DENV (Carneiro et al., 2016; Balasubramanian et al., 2019; Ponciano et al., 2021) .

Par ailleurs, les extraits de *C. pareira* et *F. septica* possèdent une activité anti-dengue au niveau de la particule virale (Sood et al., 2015 ; Huang et al., 2017). Il est connu que leur composition chimique est riche en alcaloïdes (Ragasa et al., 2016; Kumari et al., 2021). En outre, un alcaloïde indolizidine (castanospermine) isolé de *C. australe*, impacte directement la particule virale (Whitby et al., 2005). D'une manière équivalente, la berbérine, un alcaloïde présent principalement dans deux genres de plantes, *Coptis sp.* et *Berberis sp.*, agit au niveau de l'infectivité du ZIKV (Haddad et al., 2021; Ratanakomol et al., 2021).

Des études *in vitro* ont également montré l'inactivation virale par des plantes médicinales riches en amides et en polysaccharides comme *P. retrofractum*, *H. cordata* (Lim et al., 2021a). Les huiles essentielles de *L. alba*, *L. citriodora*, *E. patens* et *A. douglasiana* possèdent

également un mode d'action antiviral au niveau de la particule infectieuse de ZIKV et DENV (Ocazionez et al., 2010).

II-2. Action des substances naturelles au niveau de l'entrée virale

Les antiviraux inhibiteurs des phases précoces du cycle du flavivirus peuvent agir durant l'attachement du virion sur la membrane cellulaire, l'internalisation par endocytose, ou la fusion de la membrane virale avec l'endosome. Plusieurs extraits de plantes et molécules naturelles ont été étudiés pour leur potentiel à bloquer l'entrée du virus dans les cellules hôtes. Citons les cas des peptides d'*A. catechu* et la digitonine qui interagissent avec les cellules hôtes empêchant l'attachement viral (Gao et al., 2019; Panya et al., 2019). D'autres molécules ont été mises en évidence pour leur capacité à interagir avec le domaine III de l'enveloppe E telles que la fucoïdane, le géraniine et le gossypol (*Gossypium sp*) (Abdul Ahmad et al., 2017; Haddad et al., 2021; Lim et al., 2021a; Gao et al., 2022). Mises à part les molécules naturelles, certaines plantes médicinales riches en composés phénoliques telles que *Phyllanthus sp*, *O. basilicum*, *P. guajava* appartiennent à cette catégorie d'antiviraux (Lee et al., 2013; Trujillo-Correa et al., 2019).

Après l'attachement, les virions entrent dans le cytoplasme par un mécanisme d'endocytose clathrine-dépendant. Prenons l'exemple de l'isoquercitrine, une flavone *O*-glycosylée présente dans *H. perforatum* qui montre une propriété antivirale en agissant sur l'internalisation de ZIKV dans les cellules A549, Huh7 et SH-SY5Y (Gaudry et al., 2018). En plus, l'éther diméthylque de thymohydroquinone (THQ) isolé de l'huile essentielle d'*A. triplinervis*, agit de la même manière contre le ZIKV (Haddad et al., 2021). Par ailleurs, des extraits des algues rouges telles que *C. crispus*, *C. crenulata*, *G. elata*, *G. torulosus* bloquent l'étape de l'entrée du virus en agissant directement sur les phases d'attachement et/ou d'endocytose du cycle viral. Le mode d'action précis de ces extraits de plantes est encore peu connu (Haddad et al., 2021).

II-3. Action des substances naturelles au niveau des phases tardives du cycle viral

Certaines substances naturelles peuvent agir sur l'une des phases tardives du cycle viral comprenant les étapes de réplication, assemblage et maturation. Le tableau 12 regroupe les plantes médicinales et leurs molécules naturelles qui ont le potentiel d'inhibition des phases tardives du cycle viral de ZIKV et DENV.

Tableau 12- Liste non exhaustive des plantes médicinales inhibant les phases tardives du cycle virale de ZIKV et DENV

Mécanisme d'action	Plante	Molécule active	Virus/ Modèle cellulaire ou animal	Référence
Synthèse de l'ARN	<i>Acorus calamus l.</i>	Tatanan A.	DENV-2/ C636 ; BHK-21	(Yao et al., 2018)
	<i>Eucalyptus robusta</i>	Eucalyprobusone G	ZIKV/ A549, Vero, HEK, Huh7	(Yao et al., 2021)
	<i>Turnera diffusa</i>	Pinoembrine	ZIKV/ JEG-3	(Lee et al., 2019b; Haddad et al., 2021)
Réplication	<i>Aglaia foveolata</i>	Silvestrol	ZIKV/A549	(Elgner et al., 2018)
	<i>Andrographis paniculata</i>	Andrographolide	DENV-1 à 4 / C636, HepG2, HeLa	(Chavda et al., 2022)
	<i>Azadirachta indica</i>	ni	DENV-2/ C636 <i>In vivo/ souris</i>	(Parida et al., 2002)
	<i>Psidium guajava</i>	Quercétine, Acide gallique, Naringine, Catéchine	DENV-2 Vero	(Trujillo-Correa et al., 2019)
NS2B-NS3 sérine protéase	<i>Citrus sp</i>	Naringénine	ZIKV/ C636, Huh7.5	(Cataneo et al., 2019)
	<i>Laurentia longiflora</i>	Nd	DENV-2/ Vero	(Lim et al., 2021)
	<i>Lippia alba</i>	β -caryophyllène	ZIKV/ Vero	(Nogueira Sobrinho et al., 2021)
	<i>Senna angustifolia</i>	Nd	DENV-2/ Vero	(Lim et al., 2021)
	<i>Tridax procumbens</i>	Nd	DENV-2/Vero	(Lim et al., 2021)
	<i>Vernonia cinerea</i>	Nd	DENV-2/ Vero	(Lim et al., 2021)
NS3 protéase	<i>Boesenbergia rotunda</i>	4-hydroxypanduratinA panduratin A	DENV-2/ Vero	(Kiat et al., 2006)
NS5 polymérase	<i>Anacolosia pervilleana</i>	Acides acétyléniques	DENV-2/ dosage polymérase RdRp	(Bourjot et al., 2012a)
	<i>Cryptocarya chartacée</i>	Chartaceones C-F	DENV/ KB	(Lim et al., 2021)
	<i>Flacourtia ramontchi</i>	3 β -cafféate d'acide bétulinique	DENV-2/ dosage polymérase RdRp	(Lim et al., 2021)
	<i>Myrtilis corymbosa</i>	Nd	DENV-2/ MRC-5	(Lim et al., 2021)
	<i>Scutellaria baicalensis</i>	Baicaline, baicaléine	ZIKV, DENV-2/ C636, Vero	(Moghaddam et al., 2014; Oo et al., 2019)
	<i>Trigonostemon cherrieri</i>	Trigocherrine A et les trigocherriolides A et B	DENV	(Lim et al., 2021)

Malgré l'avancée de la recherche scientifique dans la découverte des antiviraux pour traiter les infections par le ZIKV et le DENV, il n'existe toujours pas de traitement approuvé. L'utilisation des plantes médicinales dans les stratégies antivirales contribue à la lutte contre ces maladies virales. Les plantes sont constituées d'innombrables métabolites secondaires qui

peuvent être une source prometteuse de composés antiviraux d'origine naturelle (Tableaux 10 et 11). Leur mécanisme d'action contre ZIKV et DENV sont reconnus pour inhiber (i) l'entrée virale ; (ii) la synthèse de l'ARN viral ; (iii) les protéines virales (NS2B, NS3, NS5) (Tableau 12). Les études bibliographiques montrent que les extraits végétaux riches en polyphénols agissent sur les phases précoces du cycle viral, soit en neutralisant l'infectiosité, soit en inhibant l'attachement ou l'internalisation de la particule virale (Tableaux 10 et 11). Parallèlement, les extraits et composés phytochimiques comme les flavonoïdes et les alcaloïdes (Tableau 12) peuvent cibler les protéines virales en inhibant l'activité protéase ou l'activité polymérase.

III. La biodiversité végétale de Madagascar comme source potentielle des substances naturelles actives contre ZIKV et DENV

III-1. Contexte de la biodiversité végétale de Madagascar

Madagascar est la plus grande île du continent africain, situant dans l'Océan Indien à 400 km de la côte Est de la Mozambique. Elle possède une superficie de 587 000 km² constituant la taille du Texas (Vences et al., 2009). Le pays est considéré comme une région hotspot de biodiversité végétale et animale. Sa richesse floristique comprend entre 12000 et 14000 espèces de plantes vasculaires dont 96% sont constituées d'arbres, avec 90% d'endémicité (Razafindraibe et al., 2013). La découverte de substances naturelles issues des plantes endémiques, d'organismes marins et de microorganismes, a accru l'intérêt des recherches scientifiques pour la biodiversité de Madagascar.

La majorité de la population malgache sont des agriculteurs et vivent aux dépens de ces ressources naturelles (Rafidison et al., 2019). En outre, la dépendance à l'égard des remèdes dérivés de plantes médicinales est particulièrement importante dans les pays en voie de développement comme Madagascar. Les plantes médicinales sont largement utilisées pour le traitement des maladies par des individus, des chercheurs, des groupes de chercheurs et des institutions publiques. La médecine moderne est souvent absente et surtout inaccessible pour la majorité de la population. De plus, les malgaches respectent la tradition, la familiarité et préfèrent la médecine traditionnelle par rapport à la médecine moderne. Cette tradition se conserve de génération en génération dans les campagnes et les régions éloignées des hôpitaux. Dans les grandes villes, différentes espèces de plantes médicinales sont vendues

dans les grands marchés. Aussi, des sociétés pharmaceutiques nationales produisent et commercialisent des huiles essentielles et des phytomédicaments pour traiter les maladies respiratoires, les maladies intestinales, les plaies, le paludisme, etc...(Rafidison et al., 2019).

Au début du XXI^{ème} siècle, la situation sanitaire de Madagascar est toujours dominée par les maladies infectieuses transmissibles (HIV/Sida), les maladies bactériennes (la peste et le paludisme) et les maladies virales émergentes (la dengue, Chikungunya, Covid-19) (Andrianarisoa et al., 2007). Or, les conditions de vie de la population continuent à se détériorer en affectant leur moyen économique et leur privant par la suite l'acquisition des soins médicaux.

Pour traiter les maladies virales, les malgaches utilisent au quotidien des tisanes, des infusés et des huiles essentielles de certaines plantes comme alternatives aux médicaments (Verguin, 1956; Pernet and Meyer, 1957; Humbert, 1967; Debray, 1975; Rasoanaivo et al., 1992; Verdier-Pinard, 1994; Novy, 1997; Nicolas, 2012; Razafindraibe et al., 2013; Randriamiharisoa et al., 2015; Randrianarivony et al., 2017; Larcher, 2020; Rakotosaona et al., 2022). Principalement, le décocté des feuilles de plantes *Eucalyptus* est utilisé traditionnellement pour soigner les maladies respiratoires et calmer la fièvre et la toux (Coppen, 2002; Nicolas, 2012). Aussi, les malgaches utilisent le décocté ou l'infusé des parties aériennes de « mandravasarotra » (*C. fragrans*) pour soigner la grippe, la toux, la fièvre et les bronchites (Pernet and Meyer, 1957; Novy, 1997; Nicolas, 2012; Randriamiharisoa et al., 2015). L'huile essentielle de Ravintsara (*C. camphora*) est utilisée également pour ses propriétés antivirales et anti-infectieuses (Blanchard, 2007; Mansard et al., 2019).

L'ensemble de ces résultats montre que les substances naturelles peuvent être proposées comme modèle pour des travaux de chimie médicinale. Surtout dans les pays riches en biodiversité végétale comme Madagascar, le champ de recherche est particulièrement étendu et prometteur. Malheureusement, Madagascar a connu une perte dramatique de ses forêts ces 50 dernières années. Sa biodiversité est aujourd'hui profondément menacée par les usages anthropiques comme la culture sur brûlis traditionnel, le pâturage, la production de charbon de bois et l'exploitation minière (Grinand et al., 2013; Eka Prasetya et al., 2022). En général, la disparition et la destruction de la biodiversité ont de graves répercussions sur la stabilité de l'environnement mais également sur la santé humaine. Étant donné que cette biodiversité contribue directement au bien-être d'une communauté en tant que ressources médicales.

De plus, les études chimiques et biologiques sur les plantes médicinales à Madagascar restent focalisées sur une espèce végétale ou une maladie. Actuellement, peu d'investigations scientifiques ont été effectuées sur les plantes malgaches. Leurs utilisations restent au niveau de la population locale. Ce manque d'études scientifiques s'applique surtout dans le domaine des arbovirus comme la dengue. Alors qu'un risque épidémique associé à la dengue et au zika est très élevé dans les zones tropicales et chaudes comme Madagascar (WHO, 2022). Des connaissances approfondies sur l'utilisation thérapeutique et le mécanisme d'action des plantes médicinales malgaches sont très importantes d'une part pour la gestion et la conservation des espèces végétales et d'autre part pour la valorisation de ces usages traditionnels pouvant contribuer à l'évolution de la chimie médicinale. Dans ce contexte, il est intéressant et primordial de valoriser la richesse floristique de Madagascar en contribuant à la recherche des agents antiviraux contre ZIKV et DENV.

III-2. Objectifs de la valorisation de la biodiversité végétale malgache

Vu l'évolution de l'épidémie de la dengue à l'île de La Réunion depuis l'année 2018 et le risque élevé d'épidémies de zika et de la dengue dans l'Océan Indien (Madagascar et La Réunion), il est primordial de trouver rapidement des molécules antivirales contre ces deux flavivirus. La biodiversité végétale riche de Madagascar offre la possibilité d'identifier des nouvelles molécules actives avec un nouveau mécanisme d'action antivirale. Cependant aucune investigation scientifique dans le domaine des antiviraux contre ZIKV et DENV n'a été réalisée sur les plantes malgaches. Ainsi, nos travaux de recherche sont axés sur la valorisation de la flore de Madagascar à travers les caractérisations chimique et biologique des molécules bioactives issues de ses plantes médicinales.

III-3. Critères de sélection de plantes malgaches

Dans le but de valoriser les plantes médicinales malgaches et spécifiquement dans la recherche d'agents antiviraux contre les flavivirus ZIKV et DENV, des critères de sélection ont été mis en place. Des enquêtes ethnobotaniques ont été effectués auprès de la population malgache, des marchands d'herbes médicinales, des tradipraticiens afin d'identifier les usages traditionnels de certaines plantes ainsi que leur distribution et leur localisation. Les critères de sélection comprennent :

- Usages traditionnels des plantes pour traiter les maladies infectieuses comme la grippe, la fièvre, les inflammations ;
- Travaux antérieurs réalisés avec les plantes en termes de composition chimique et d'activités biologiques ;
- Approvisionnement et accès facile au matériel végétal ;

Ainsi, 17 plantes médicinales ont été sélectionnées sur la base de ces critères de sélection (Tableau 13).

Tableau 13- Liste des plantes médicinales sélectionnées pour l'étude

Nom botanique	Famille	Nom(s) vernaculaire(s)	Parties utilisées	Usages traditionnels
<i>Artocarpus heterophylla</i>	<i>Moraceae</i>	Jacquier, Ampalibe	Fruits, Feuilles, Suc laiteux	Alimentation, diarrhée, antisiphilitique et vermifuges
<i>Bidens pilosa</i>	<i>Asteraceae</i>	Sornet, Tspolitra	Herbe	Maux de gorge, cicatrisant
<i>Cassia occidentalis</i>	<i>Fabaceae</i>	Cassie puante, séné à café, Tsotsorinagantra	Feuilles, tiges, racines	Migraine, vermifuge, jaunisse, paludisme, tisane hépatique, fièvre jaune (avec <i>Pentopetia sp</i> et <i>M. paradisiaca</i>)
<i>Cajanus cajan</i>	<i>Fabaceae</i>	Pois d'angole	Feuilles, tiges	Analgésique, antiparasitaire, contre les maux d'estomac, caries dentaires
<i>Cajanus indicus</i>	<i>Fabaceae</i>	Pois cajan	Feuilles	Maux de dents, calculs urinaires
<i>Cinnamomum camphora</i>	<i>Lauraceae</i>	Camphrier, Ravintsara	Feuilles	Antidépresseur, immunostimulant et antiviral
<i>Dodonaea madagascariensis</i>	<i>Sapindaceae</i>	Tsitoavina	Racine, feuilles	Antibactérienne, antivirale et analgésique
<i>Furcraea foetida</i>	<i>Agavaceae</i>	Chanvre de Maurice, choca vert	Feuilles	Source de fibres, savon végétal
<i>Melia azedarach</i>	<i>Meliaceae</i>	Lilas de perse	Feuilles, tiges	Insecticide, astringente, brosse à dents
<i>Morinda citrifolia</i>	<i>Rubiaceae</i>	Noni, Pomme chien	Fruits, feuilles	Anticancéreux, antiinflammatoire, antibactérienne, antivirale
<i>Musa paradisiaca</i>	<i>Musaceae</i>	Banane	Fruits, bourgeon mâle	Alimentation, cosmétique, jaunisse (avec <i>Pentopetia sp</i> et <i>C. occidentalis</i>)
<i>Ocimum canum</i>	<i>Lamiaceae</i>	Basilic sauvage, Karanjany	Feuilles	Torticolis, rhumatisme, conjonctivite, paludisme,
<i>Psiadia altissima</i>	<i>Asteraceae</i>	Arina, Iary	Feuilles, tiges	Plaies ulcérées, gale, diarrhée et paludisme
<i>Pentopetia sp</i>	<i>Asclepiadaceae</i>	Tandrokosal	Feuilles, tiges	Toux, névralgie, hépatite, jaunisse, gonorrhée (avec <i>Pentopetia sp</i> et <i>M. paradisiaca</i>)
<i>Stenocline ericoides</i>	<i>Asteraceae</i>	Mahaibe	Partie aérienne	Plaies, sinusites
<i>Stenocline inuloides</i>	<i>Asteraceae</i>	Fiandrivalala	Partie aérienne	Maladies de la peau, vertiges, tension artérielle
<i>Waltheria indica</i>	<i>Malvaceae</i>	Guimauve	Partie aérienne, racines	Asthme, diarrhée, pneumonie, toux sèches, bilharziose et constipation

Toutes les plantes sélectionnées sont utilisées traditionnellement par le peuple malgache sous forme de décocté, d'infusé ou même sous forme de boisson pour se soigner (Tableau 13). Elles sont facilement accessibles car certaines plantes sont vendues auprès des marchands de tisane. Dans la sélection, il existe des plantes endémiques (*Pentopetia sp*, *S. ericoides*, *S. inuloides*, etc...), des plantes naturalisées (*W. indica*, *M. azedarach*, etc...) et des plantes introduites à Madagascar. Dans la partie suivante, je présente l'état de l'art et les connaissances bibliographiques uniquement sur les plantes qui ont montré un effet antiviral suite au criblage.

III-3-1. *Pentopetia sp*

a) Description botanique et distribution géographique

Nom scientifique et synonyme

L'identification précise de l'espèce que nous avons utilisée est encore en cours d'investigation par les botanistes.

Noms vernaculaires

Pentopetia sp : Tandrokosy (Madagascar) (Randriamiharisoa et al., 2015)

Classification botanique (Secrétariat du GBIF, 2022; WFO, 2022a)

- Embranchement : Angiospermes (plantes à fleurs)
- Ordre : Gentianales
- Famille : Apocynaceae
- Genre : *Pentopetia*

Le genre *Pentopetia* comprend environ 23 espèces qui sont principalement endémiques de Madagascar. La plante est une herbacée rampante ou grimpante pouvant atteindre 1 à 1,5 m de hauteur. Les feuilles de *Pentopetia sp* sont opposées, simples et sous forme elliptique à largement ovale. Ces fruits sont constitués de double follicule rappelant une paire de cornes comme l'indique son nom vernaculaire malgache.



Figure 8- Photo de *Pentopetia* sp

Distribution géographique

Les plantes du genre *Pentopetia* sont rencontrées dans les forêts sèches, les savanes et les végétations arbustives. Elles poussent principalement sur des sols sableux, mais également sur des sols basaltiques, latéritiques ou rocailloux, du niveau de la mer jusqu'à 2000 m d'altitude. Elles sont distribuées partout dans la grande Ile (Figure 9) (Secrétariat du GBIF, 2022).

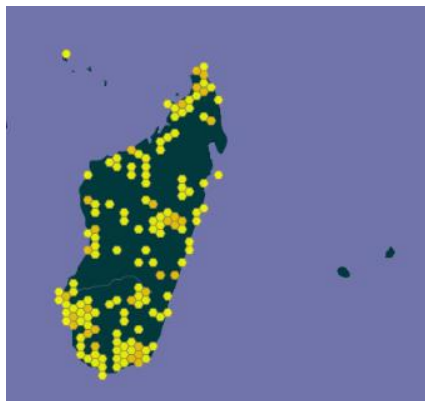


Figure 9- Distribution des plantes *Pentopetia* à Madagascar (Secrétariat du GBIF, 2022)

b) Etudes chimiques et biologiques antérieures

Usages traditionnels

La partie aérienne et la racine des plantes du genre *Pentopetia*, sont largement utilisées à Madagascar sous forme de décocté pour traiter la toux, l'hépatite, la névralgie (Randriamiharisoa et al., 2015) et les douleurs dorsales (Razafindrambao et al., 1971). La décoction d'écorce de racine est appliquée sur les abcès. L'écorce de racine est également considérée comme étant émétique et à forte dose, elle est utilisée pour empoisonner les chiens errants.

L'infusion des tiges feuillées est également absorbée sous forme de boisson pour traiter la syphilis (Pernet and Meyer, 1957), la jaunisse, l'œdème, la goutte (Pernet and Meyer, 1957), le sang dans les urines et comme cholagogue. Elle est également prise par les femmes enceintes pour traiter l'anémie. Cet infusé est également pris pour traiter les vers intestinaux et les hémorroïdes.

Composition chimique et activités biologiques

Malgré tous les usages traditionnels cités ci-dessus, très peu d'études chimiques et pharmacologiques ont été menées sur le genre *Pentopetia*. Des études scientifiques ont été réalisées uniquement avec *P. androsaemifolia*. L'extrait éthanolique de racines et de tiges de cette plante contient des cardénolides glycosylés présentant une activité antiproliférative contre les cellules cancéreuses de l'ovaire A2780 (Adou et al., 2010). Une étude *in vivo* a montré le potentiel uricémique et uricosurique de l'extrait hydro-alcoolique de cette plante (50 à 200 mg. kg⁻¹) chez des souris hyperuricémiques. Cette activité pourrait être due au présence des flavonoïdes inhibiteurs de la xanthine oxydase (Randrianavony et al., 2017).

III-3-2. *Stenocline ericoides* et *Stenocline inuloides*

a) Description botanique et distribution géographique

Noms scientifiques et synonymes

- *Stenocline ericoides* DC. synonyme *Helichrysum ericoides* Bojer ex DC. d'après The World Flora Online et Tropicos (Tropicos, 2022b; WFO, 2022b)
- *Stenocline inuloides* DC. synonyme *Helichrysum inuloides* Bojer ex DC. d'après The World Flora Online et Tropicos (Tropicos, 2022c; WFO, 2022c)

Noms vernaculaires

- *S. ericoides* : Mahaibe (Razafindrambao et al., 1971)
- *S. inuloides* : Fiandrivalala

Classification botanique (Tropicos, 2022a; WFO, 2022)

- Embranchement : Angiospermes (plantes à fleurs)
- Ordre : Asterales
- Famille : Asteraceae

- Genre : *Stenocline*
- Espèces : *Stenocline ericoides* et *Stenocline inuloides*

Description botanique

Le genre *Stenocline* regroupe les plantes herbacées, vivaces ou sous arbrisseaux à feuilles altères, sessiles et entières (Figure 10). Il existe environ 20 espèces dans le genre et la dernière révision taxonomique stipule que les espèces *incana* et *gymnocephala* sont synonymes (Tropicos, 2022a).

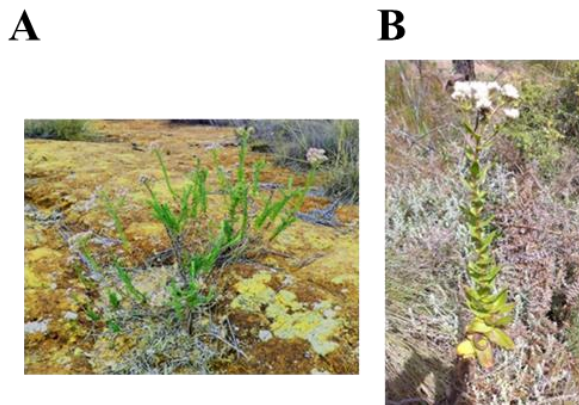


Figure 10- Photo des *Stenocline* : (A) *S. ericoides* (B) *S. inuloides* par Andrianaivalonirina M.A.

Distribution géographique

Les deux espèces sont endémiques de Madagascar (Figure 11). Leurs environnements naturels sont des lieux découverts. Ces plantes poussent dans les montagnes, sur des sols latéritiques ou rocailleux allant d'une altitude de 500 m à plus de 2500 m. Elles sont répandues dans les régions d'Analamanga, de Vakinankaratra, d'Amoron'i Mania, de Haute Matsiatra, d'Ihorombe, d'Alaotra-Mangoro, de Diana et d'Anosy (Figure 11) (Perrier de la Bathie, 1932).

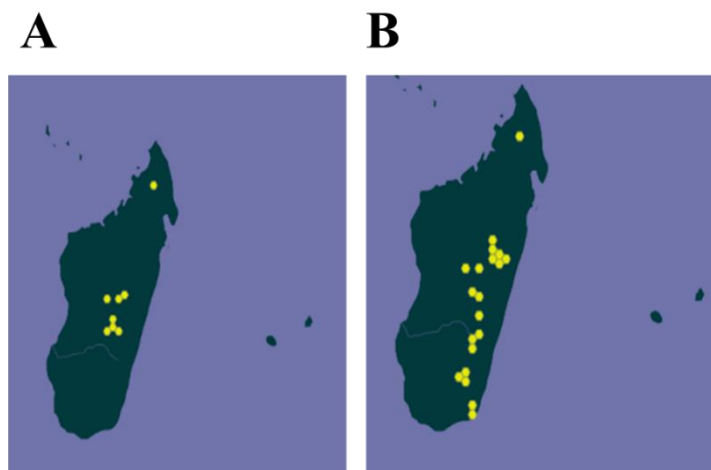


Figure 11- Distribution des *Stenocline* à Madagascar (1839 à 2022) (A) *S. ericoides* (Sécretariat de GBIF, 2021a) (B) *S. inuloides* (Sécretariat de GBIF, 2021b)

b) Etudes chimiques et biologiques antérieures

Usages traditionnels

En médecine traditionnelle, *S. ericoides* et *S. inuloides* sont utilisées dans la prévention des maladies cutanées, des plaies et des sinusites (Razafindrambao et al., 1971).

Composition chimique et activités biologiques

Selon les recherches bibliographiques, aucune donnée scientifique n'a été trouvée sur ces deux espèces.

III-3-3. *Waltheria indica*

a) Description botanique et distribution géographique

Nom scientifique et synonymes

- *Waltheria indica* L. synonyme *Waltheria americana* var. *indica* (L.) K. Schum (et 42 autres synonymes) d'après The World Flora Online et Tropicos (WFO, 2022d; Tropicos, n.d.)

Noms vernaculaires

Madagascar : mandravaratrotra (Majunga), sandahorimavo (Antakarana), tsimatimpangady, tsindahorolahy, tsindiditsy (Sava) (Nicolas, 2012)

Autres pays: sleepy morning , monkey bush (Amérique), guinar (Mexique), barulad (Philippines), uhaloa (Hawaii), nallabenda (Inde) (Zongo, 2013), guimauve ou mauve gris (La Réunion) (Flore de La Réunion, 2002)

Description botanique

Le genre *Waltheria* L. comprend 60 espèces dont *Waltheria indica* (Figure 12) (Saunders, 1995). Il s'agit d'un arbuste ou un sous-arbrisseau de 0,5 à 1,5 m de hauteur à ramification multiples. La partie aérienne de la plante est constituée par des feuilles peu pubescentes, tomenteuses ou veloutines et de petites fleurs jaunes, aux calices velus, encombrés de glomérules axillaires (Figure 12) (WFO, 2022d).



Figure 12- Photo de *W. indica* (Secrétariat du GBIF, 2021)

Classification botanique (WFO, 2022d; Tropicos, n.d.)

- Embranchement : Angiospermes (plantes à fleurs)
- Ordre : Malvales
- Famille : Sterculiaceae
- Genre : *Waltheria*
- Espèce : *Waltheria indica* L.

Distribution géographique

W. indica se trouve dans les régions subtropicales et tropicales (Amérique, Afrique, Asie et Océanie) (Useful Tropical Plants, 2014) . La plante est originaire de l'Océanie mais naturalisée et devenue invasive à Madagascar et à La Réunion (Flore de La Réunion, 2002). La plante est distribuée dans les parties centrale, australe et occidentale de Madagascar (Figure 13) (Secrétariat du GBIF, 2021).

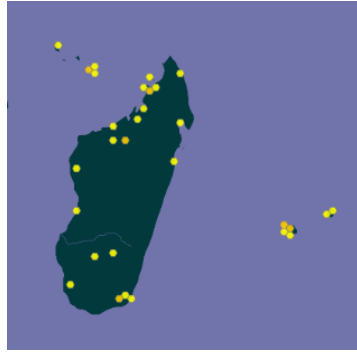


Figure 13- Distribution de *W. indica* à Madagascar (1770-2022) (Secrétariat du GBIF, 2021)

W. indica pousse sur les terrains boisés et broussailleux, sur les collines rocheuses, les lits de rivières, les dunes, les affleurements calcaires ou basaltiques, les plaines sablonneuses et herbeuses (Useful Tropical Plants, 2014). Elle est également répartie en bordure de route, dans les vieux pâturages et dans les pentes des forêts, (Zongo, 2013).

b) Etudes chimiques et biologiques antérieures

Usages traditionnels

Chaque partie de la plante est généralement utilisée dans la pharmacopée traditionnelle en Afrique, en Amérique du Sud et à Hawaï, principalement contre la toux (Kokwaro, 1976), l'hémoptysie (O. O. Olajuyigbe, 2011), les infections pulmonaires (Nirmala and Sridevi, 2021), l'inflammation (Zongo, 2013), les ulcères, les rhumatismes (Dimayuga et al., 1987), les conditions d'anémie, la diarrhée (Nirmala and Sridevi, 2021), la dysenterie (Kokwaro, 1976), la conjonctivite, les maladies de la vessie (Nirmala and Sridevi, 2021), le diabète (Zongo et al., 2013), le paludisme, les fièvres typhoïdes (Jansen et al., 2008) et l'asthme (Zerbo et al., 2012). A Madagascar, le décocté des feuilles est recommandé pour le traitement de la coqueluche (Nicolas, 2012). La médecine traditionnelle recommande aussi l'utilisation de la plante pour soulager les névralgies (Nirmala and Sridevi, 2021), l'épilepsie (Kheraro and Adam, 1974) et les convulsions. La tisane et les extraits de plantes sont conseillés pour soigner les douleurs, les courbatures, la stérilité féminine, l'impuissance mais aussi comme aphrodisiaque (Nirmala and Sridevi, 2021). En outre, l'application en externe de cette plante sert à traiter les maladies cutanées comme les éruptions, les plaies (Kheraro and Adam, 1974), les abcès et la lèpre (O. O. Olajuyigbe, 2011).

Composition chimique

Les études phytochimiques sur les diverses parties de la plante ont révélé la présence de plusieurs familles de métabolites secondaires (Tableau 14) (Zongo, 2013; Nirmala and Sridevi, 2021). La plante entière contient des alcaloïdes quinoléiques type waltheriones et des adouétines (Zongo, 2013; Cretton et al., 2014, 2015, 2016, 2020) (Tableau 14). En plus, des composés phénoliques tels que les acides phénoliques (acide caféique) (Petrus, 1990), les flavonoïdes et ses dérivés glycosides (Petrus, 1990; Ragasa et al., 1997; Rao et al., 2005; Maheswara et al., 2006) ont été isolés des extraits de *W. indica*.

En outre, des criblages phytochimiques ont montré la présence des anthraquinones, des saponines, des tanins, des carbohydrates, des terpènes et des stérols dans les différents extraits de cette plante (O. O. Olajuyigbe, 2011; Gbadamosi et al., 2012).

Tableau 14- Composition chimique de *W. indica*

	Composés isolés	Partie de la plante	Références
Alcaloïdes	Alcaloïdes quinoléiques : waltheriones	Racines, partie aérienne	(Cretton et al., 2014, 2015, 2020)
	Adouetine X, Y, Y1, Z	Partie entière	(Zongo, 2013; Cretton et al., 2014, 2015)
Acides phénoliques	Acide caféique	Partie aérienne	(Petrus, 1990)
Flavonoïdes	Flavonoïdes : (-) -épicatéchine	Partie entière	(Rao et al., 2005)
	gossypétine	Partie aérienne	(Petrus, 1990)
	herbacétine	Partie aérienne	(Petrus, 1990)
	kaempférol	Partie entière	(Rao et al., 2005; Maheswara et al., 2006)
	quercétine	Partie entière	(Rao et al., 2005; Maheswara et al., 2006)
	Flavonoïdes glycosylés : 2''-O-glucosylvitexin	Partie aérienne	(Petrus, 1990)
	5,2',5'-trihydroxy-3,7,4'-triméthoxyflavone	Feuilles	(Ragasa et al., 1997)
	5,2'-dihydroxy-3,7,4',5'-tetraméthoxyflavone		(Ragasa et al., 1997)
	isoquercitrine	Partie entière	(Maheswara et al., 2006)
	kaempférol-3-O-galactoside	Partie aérienne	(Petrus, 1990)
	kaempferol-3-O-β-D-(6''-E-p-coumaryl)-glucopyranoside	Partie entière	(Maheswara et al., 2006)
	kaempferol-3-O-α-L-rhamnoside	Partie entière	(Maheswara et al., 2006)
	kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside	Partie entière	(Maheswara et al., 2006)
gossypetin-8-glucuronide	Partie aérienne	(Petrus, 1990)	
herbacetin-8-O-glucuronide	Partie aérienne	(Petrus, 1990)	
tiliroside	Partie entière	(Rao et al., 2005)	
Anthraquinones	(Résultat de criblage phytochimique)	Feuilles	(O. O. Olajuyigbe, 2011; Gbadamosi et al., 2012)
Saponines	(Résultat de criblage phytochimique)	Partie entière	(O. O. Olajuyigbe, 2011; Gbadamosi et al., 2012; Rafiu et al., 2020)
Tanins	(Résultat de criblage phytochimique)	Tiges, feuilles, racines	(O. O. Olajuyigbe, 2011; Borokini and Omotayo, 2012; Gbadamosi et al., 2012; Rafiu et al., 2020)
Terpènes	(Résultat de criblage phytochimique)	Feuilles	(Zailani et al., 2010; O. O. Olajuyigbe, 2011)
Carbohydrates	(Résultat de criblage phytochimique)	Tiges, feuilles, racines	(Zailani et al., 2010; O. O. Olajuyigbe, 2011)

	phytochimique)		Olajuyigbe, 2011; Gbadamosi et al., 2012)
Stéroïds	(Résultat de criblage phytochimique)	Tiges, racines et feuilles	(Zailani et al., 2010; Borokini and Omotayo, 2012; Rafiu et al., 2020)

Propriétés pharmacologiques

Des études *in vitro* et *in vivo* avec des extraits bruts et des composés isolés de *W. indica* ont mis en évidence leurs propriétés analgésique, anti-inflammatoire, antibactérienne, antifongique, antipaludéenne, antianémique, antioxydante, sédative et anticonvulsivante (Zongo, 2013; Nirmala and Sridevi, 2021) (Tableau 15).

Tableau 15- Activités biologiques de *W. indica*

Activité biologique	Matériel végétal testé	Modèle d'étude	Résultats	Références
Analgésique	Extrait aqueux (racines)	<i>In vivo</i>	Réduction des contractions abdominales induites par des traces d'acide acétique chez les souris	(Nirmala and Sridevi, 2021)
	Extrait AcOEt (partie aérienne)	<i>In vivo</i>	Protection des souris contre la convulsion et la mort	(Hamidu et al., 2008)
	Extrait MeOH (feuilles)	<i>In vivo</i>	Activité antinociceptive chez les souris	(Owemidu et al., 2018)
Antiinflammatoire	Epicatechine Quercétine Tiliroside	<i>In vitro</i>	Inhibition de la production NO et des cytokines (TNF α et IL12) Inhibition COX-2 (tiliroside) Inhibition de la protéine tyrosine kinase (quercétine)	(Rao et al., 2005) (Termer et al., 2021) (Nirmala and Sridevi, 2021)
	Walthériones A, C	<i>In vitro</i>	Inhibition du facteur nucléaire (NF- κ B)	(Monteillier et al., 2017)
Antibactérienne	Extrait hexane (feuilles)	Méthode de diffusion sur gélose	Activité contre <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. typhi</i>	(Zailani et al., 2010; Salihu, 2012)
	Extrait aqueux (racines)	Méthode de diffusion sur gélose	Activité contre 74 souches bactériennes GRAM + et GRAM -	(O. O. Olajuyigbe, 2011)
	Extrait Acétone, MeOH, EtOH, aqueux (racines)	Méthode de diffusion sur gélose	Activité contre <i>B. cereus</i>	(Mongalo et al., 2012b)
	Extrait aqueux (partie aérienne)	Méthode de diffusion sur gélose	Activité contre <i>S. aureus</i>	(Mongalo et al., 2013)
	Extrait chloroforme	Méthode de diffusion sur gélose	Activité contre <i>E. coli</i> , <i>K. pneumonia</i>	(Osman et al., 2013)
	Ni	Ni	Activité contre chlamydiae et mycoplasma	(Zongo, 2013)
Antioxydante	Extrait MeOH (racines)	Test DPPH	Inhibition de la DPPH dose-dépendante.	(Mongalo et al., 2012a)
	Extrait aqueux (tiges feuillées)	Test DPPH	Inhibition du radical de DPPH, la lipoxygénase et la peroxydation lipidique	(Yougbare-Ziebrou et al., 2016)
Antifongique	5,2',5'-trihydroxy-3,7,4'-triméthoxy flavone (1) 5,2'-dihydroxy-3,7,4',5'-tetraméthoxy flavone (2)	Ni	Activité antifongique élevée contre <i>C. albicans</i> (composé 1) Activité antifongique modérée contre <i>A. niger</i> et <i>T. mentagrophytes</i> (Composé 2)	(Ragasa et al., 1997)

	Extraits chloroforme, AcOEt, chloroforme/méthanol v/v	Méthode de diffusion sur gélose	Activité antifongique <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>A. niger</i>	(Olakunle et al., 2017)
	Alcaloïdes quinoléiques	<i>In vitro</i>	Activité contre <i>C.albicans</i>	(Cretton et al., 2016)
Antiparasitaire	Extrait MeOH 80% (pousses)	<i>In vitro</i>	Activité antiplasmodiale modérée (IC ₅₀ = 125 à 250 µg. mL ⁻¹)	(Maregesi et al., 2010)
	Extrait EtOH (plante entière)	<i>In vitro</i>	Activité contre <i>T. brucei</i>	((Nirmala and Sridevi, 2021)
	Extrait DCM (racines)	<i>In vitro</i>	Activité inhibitrice contre <i>T. cruzi</i> (IC ₅₀ = 0,74 µg.mL ⁻¹) et <i>T.brucei</i> (IC ₅₀ = 20 µg.mL ⁻¹)	(Cretton et al., 2014)
	Waltherione C	<i>In vitro</i>	Activité contre <i>T. cruzi</i> (IC ₅₀ = 1,93 µM).	(Cretton et al., 2015)
	Waltheriones M, P et Q	<i>In vitro</i>	Activité contre <i>T cruzi</i> (IC ₅₀ = 1,3 ; 0,5 ; et 0,1 µM	(Cretton et al., 2016)
Activité hématinique	Extrait aqueux (racine)	<i>In vivo</i>	Augmentation significative du nombre d'hémoglobines, de l'hématocrite, des globules rouges, du taux de poids corporel du foie et de l'hémoglobine corpusculaire moyenne chez des rats	(Nirmala and Sridevi, 2021))
	Extrait aqueux (feuilles)	<i>In vivo</i>	Augmentation du nombre de globules rouges, de globules blancs et les valeurs d'alanine et d'aspartate aminotransférase, de créatinine et d'azote uréique du sang chez des rats mâles albinos	(Basiru and Olayemi, 2014)
Aphrodisiaque	Extrait aqueux (racine)	<i>In vivo</i>	Activité aphrodisiaque dose-dépendante chez les rats mâles albinos Wistar	(Nirmala and Sridevi, 2021)
Anti-diabétique	Extrait MeOH (plante entière)	<i>In vivo</i>	Diminution dose-dépendante du taux de sucre dans le sang aux 4 ^{ème} , 7 ^{ème} et 14 ^{ème} jours d'analyse chez les rats diabétiques induits par l'alloxane,	(Kannan et al., 2016)
	Extrait hydroalcoolique (racine)	<i>In vivo</i>	Activité hypoglycémiant après administration orale de glucose (2 g. kg ⁻¹)	(Povi et al., 2015)
Anti-cataracte	Extrait EtOH (feuilles)	<i>In vivo</i>	Restauration de la superoxyde dismutase (SOD), le malondialdéhyde (MDA), la catalase et la glutathion S transférase à des niveaux normaux chez des rats atteints de cataracte au naphthalène.	(Kokwaro, 1976; Atif et al., 2014)

En résumé, les nombreuses études biologiques réalisées sur *W. indica* ont permis de vérifier et confirmer certains usages traditionnels. La prise des tisanes de plantes contre les douleurs et les convulsions a été confirmée avec l'évaluation de l'activité analgésique chez des souris (Nirmala and Sridevi, 2021). Des études ont mis en évidence le potentiel antimicrobien, antifongique et antiparasitaire de certains méthoxyflavones et des waltheriones isolés de la plante justifiant leur vertus thérapeutiques (Ragasa et al., 1997; Cretton et al., 2014, 2016, 2020). En outre, les extraits de diverses parties de la plante ont montré des effets anti-inflammatoires, antioxydants, anti-diabétiques et aphrodisiaques (Zongo, 2013).

Activité antivirale

Quelques évaluations des effets antiviraux ont été effectuées sur les extraits ou les composés isolés de *W. indica*. Une étude a montré que les extraits hydroalcoolique et aqueux de la plante ont inhibé la synthèse de l'ARN génomique du rotavirus (Nirmala and Sridevi, 2021). Ceux issus de l'extraction à l'eau et au méthanol des tiges ont présenté une inhibition significative de la protéase du HIV-1 (Nirmala and Sridevi, 2021). En outre, l'extrait eau-méthanol des pousses a également agi sur le HIV-1 (souche IIIb) ($IC_{50} = 36 \mu\text{g. mL}^{-1}$) et le HIV-2 ($IC_{50} > 125 \mu\text{g. mL}^{-1}$) (souche ROD) (Maregesi et al., 2010). Toutefois, les tests sur HSV, le virus de la forêt Semliki, le virus de la stomatite vésiculeuse et le virus Coxsackie n'ont pas montré d'inhibition significative (Zongo, 2013). Certes, ces résultats montrent le potentiel antiviral de *W. indica*. Toutefois, la caractérisation antivirale est ouverte pour évaluer d'autres types de virus comme le ZIKV et le DENV. Des investigations plus approfondies concernant le mécanisme d'action antivirale sont également intéressantes et innovantes.

Toxicologie

Les études chez des modèles de souris et de rats ont indiqué que les extraits polaires de *W. indica* présentent une légère toxicité *in vivo* (Tableau 16) (Zongo et al., 2013). Le sulfonate d'adouétine Z, isolée de la plante, a été évaluée par ailleurs comme toxique chez des souris avec un $LD_{50} = 52,5 \text{ mg. kg}^{-1} \%$ au poids corporel de l'animal (Blanpin et al., 1963). Par contre, l'évaluation de la cytotoxicité par MTT a indiqué que les flavonoïdes (tiliroside, quercétine, (-)-épicatchine) isolés de la plante ne diminuent pas l'activité mitochondriale des macrophages murins (Rao et al., 2005). De ce fait, l'utilisation et l'administration de la plante doit être effectuée avec prudence.

Tableau 16- Evaluation de la toxicité aigüe de *W. indica*

Matériel végétal utilisé	Modèle d'étude	LD_{50}	Référence
Extrait aqueux (plante entière)	Administration intrapéritonéale dans des souris	500 mg. $\text{kg}^{-1} \%$ au poids de l'animal	(Dhar et al., 1973)
Extrait aqueux : (Feuilles Tige Racine)	Administration intrapéritonéale dans des souris	(% au poids corporel de l'animal) 363 mg. kg^{-1} 141 mg. kg^{-1} 69 mg. kg^{-1}	(Mohammed et al., 2007)
Extrait EtOH (partie aérienne)	Administration intrapéritonéale dans des souris	875 mg. $\text{kg}^{-1} \%$ au poids corporel de l'animal	(Hamidu et al., 2008)
Sulfonate d'adouétine Z	Administration intrapéritonéale dans des souris	52,5 mg. $\text{kg}^{-1} \%$ au poids corporel de l'animal	(Blanpin et al., 1963)

En conclusion, *Pentopetia sp* est une nouvelle plante endémique malgache non identifiée. Des investigations sont effectuées au niveau du département botanique de Madagascar. La plante est largement utilisée par les malgaches pour traiter diverses maladies infectieuses. Quant aux *Stenocline*, la recherche bibliographique montre un dossier vide concernant leurs caractérisations chimiques et biologiques. Concernant *W. indica*, quelques investigations scientifiques ont été déjà réalisées avec la plante montrant sa composition chimique riche en alcaloïdes, en terpénoïdes et en polyphénols. En addition, des études biologiques valident ses nombreux usages traditionnels avec des données scientifiques significatives.

Depuis toujours, la médecine traditionnelle est pratiquée et priorisée à Madagascar, quelquefois mélangée avec la médecine moderne. La population malgache se rapproche des herboristes, des guérisseurs pour se soigner. Par contre, les études chimique et pharmacologique de la flore malgache sont insuffisantes et peu exploitées en prenant l'exemple des *Stenocline*. Même, les plantes médicinales se heurtent encore à la difficulté de détermination botanique comme le cas de *Pentopetia sp*. Pour les autres plantes comme *W. indica*, des recherches plus poussées sont nécessaires pour fournir davantage de données probantes sur leur composition chimique et leur activité pharmacologique.

D. Les flavonoïdes : molécules à large spectre antiviral

I. Contexte de l'étude des flavonoïdes

Pour remédier au manque actuel d'antiviraux contre les arbovirus, de grands efforts sont émis pour rechercher de nouveaux composés potentiellement actifs en appliquant diverses approches telles que la réutilisation des médicaments aux applications des remèdes traditionnels issus des plantes médicinales jusqu'au dépistage des différentes bibliothèques de composés synthétiques ou naturels bioactifs.

Cette dernière approche offre une longueur d'avance sur le processus de découverte de médicaments et pourrait aider à accélérer le développement des traitements thérapeutiques et prophylactiques des maladies virales (Zandi et al., 2011a; Goh et al., 2020; Loaiza-Cano et al., 2020; Cataneo et al., 2021). De plus, les structures chimiques des composés identifiés comme antiviraux pourraient servir de squelette de base pour fabriquer des analogues semi-synthétiques ou synthétiques en grande quantité afin d'optimiser leur stabilité, de diminuer leur toxicité ou d'accroître leur pouvoir antiviral. Statistiquement, environ 50 % des nouvelles entités chimiques proviennent des produits naturels ou de ses analogues (Koehn and Carter, 2005; Li and Vederas, 2009; Molinari, 2009).

Les flavonoïdes sont des molécules polyphénoliques naturelles que l'on trouve largement dans les différentes parties des plantes (racines, écorces, feuilles et fleurs) et qui sont responsables d'une variété de processus biologiques (Kumar and Pandey, 2013; Newman and Cragg, 2016; Oliveira et al., 2017). Plus de 6000 flavonoïdes ont été découverts avec une énorme diversité structurale et des propriétés pharmacologiques intéressantes (Kumar and Pandey, 2013).

Ces composés bioactifs d'origine végétale sont généralement peu toxiques et présentent un grand intérêt scientifique en raison de leurs multiples propriétés remarquables comme antioxydants, anti-inflammatoires, antibactériens, antifongiques et anti-tumoraux (Hinderer and Seitz, 1988; Harborne and Williams, 2000; Kumar and Pandey, 2013; Ninfali et al., 2020). En outre, un des axes de recherche du Laboratoire International Associé est la valorisation des sous produits dont les flavonoïdes issus des déchets végétaux (Rasoanaivo et al., 2014; Rabemahefa et al., 2021; Ranarijaona et al., 2021). L'extraction et la modification structurale de ces types de molécules entrent dans les compétences du laboratoire. Par conséquent, nous avons consacré une partie de notre étude sur la recherche et développement de flavonoïdes de synthèse ayant des propriétés contre ZIKV et DENV.

II. Les flavonoïdes

II-1. Structure chimique et classification

Les flavonoïdes représentent 60% de la grande famille des polyphénols (plus de 4500 membres) (Dey and Harborne, 1997). Ces molécules sont synthétisées par les végétaux lors du métabolisme secondaire pour leur défense (Harborne and Williams, 2000). Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et sont constitués d'un même élément structural de base formé par un squelette à 15 atomes de C. Ce squelette de base est constitué de deux cycles benzéniques (cycles A et B), reliés par une chaîne à trois carbones formant un hétérocycle oxygéné (cycle C) (C6-C3-C6) (Cook and Samman, 1996) (Figure 14).

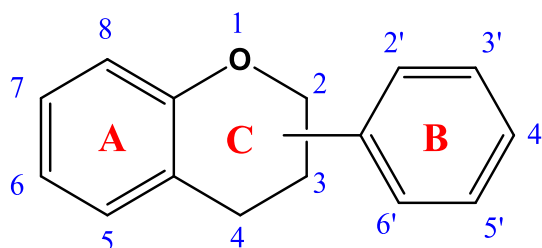
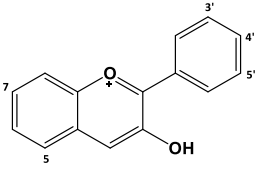
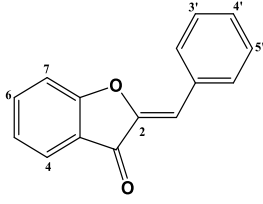
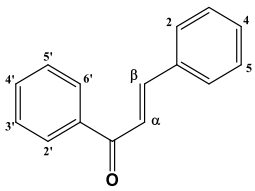
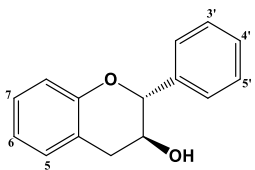
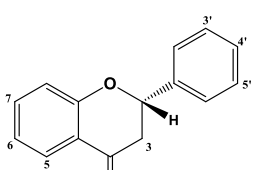
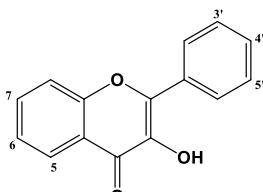
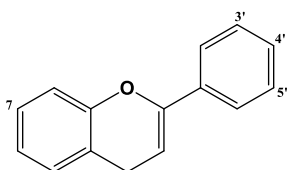


Figure 14- Structure de base des flavonoïdes et numérotation adoptée (Cook and Samman, 1996)

Les flavonoïdes sont divisés en plusieurs classes en fonction de la position de la liaison entre les noyaux B et C, le degré de saturation du noyau C, le degré d'oxydation et d'hydroxylation de l'hétérocycle central C (Hinderer and Seitz, 1988; Harborne and Williams, 2000) (Tableau 17).

Tableau 17- Classification des flavonoïdes (Hinderer and Seitz, 1988; Harborne and Williams, 2000)

Classe	Structure de base	Exemples						
Anthocyanes		3	5	7	3'	4'	5'	
		Cyanidine	OH	OH	OH	OH	OH	H
		Delphinidine	OH	OH	OH	OH	OH	OH
Aurones		4	6	7	3'	4'	5'	
		Leptosidine	H	OH	OMe	OH	OH	H
		Muritimétine	H	OH	OH	OH	OH	H
Chalcones		2'	3'	4'	5'	6'	4	
		Davidigénine	OH	H	OH	H	H	OH
		Asebogénine	OH	H	OMe	H	OH	OH
Flavanols		5	6	7	3'	4'	5'	
		Catéchine	OH	H	OH	OH	OH	H
		Gallocatéchine	OH	H	OH	OH	OH	OH
Flavanones		5	6	7	3'	4'	5'	
		Hespéritine	OH	H	OH	OH	OMe	H
		Naringénine	OH	H	OH	H	OH	H
Flavonols		5	6	7	3'	4'	5'	
		Kempférol	OH	H	OH	H	OH	H
		Quercétine	OH	H	OH	OH	OH	H
Flavones		5	6	7	3'	4'	5'	
		Apigénine	OH	H	OH	H	OH	H
		Lutéoline	OH	H	OH	OH	OH	H

Les flavonoïdes sont fréquemment rencontrés sous leur forme glycosylée dans les organes végétaux et floraux (Hulse, 1980). La liaison entre l'aglycone et le sucre se fait généralement par l'un des hydroxyles phénoliques, en particulier ceux en position 3 (pour les flavonols) ou en 7 (pour les flavones) et parfois en 6 ou 8. Les sucres les plus couramment rencontrés sont le D-glucose, le D-galactose, le L-rhamnose, l'acide D-glucuronique, l'acide D-galacturonique, le L-arabinose, le D-xylose et occasionnellement le D-allose, l'apiose et le D-mannose (Harborne and Williams, 2000).

II-2. Distribution et répartition

Les flavonoïdes sont distribués chez les gymnospermes comme dans les angiospermes. Ils sont également présents chez les Bryophytes (mousses et hépatiques) et les Pteridophytes (fougères). Ils sont principalement répartis dans toutes les parties des plantes (Verpoorte, 1984; Tanase et al., 2019). Ils peuvent être stockés dans les parties aériennes (feuilles, fleurs, fruits, graines, tiges et écorces) ainsi que les racines (Verpoorte, 1984; Tanase et al., 2019).

Les flavonoïdes constituent également une part importante de notre alimentation. Ils sont souvent rencontrés dans les fruits comme les agrumes, les légumes verts (salade, chou, épinard, etc.), divers boissons (thé, café, bière, vin, etc...), les herbes fraîches et les épices (Hulse, 1980) (Tableau 18). Par ailleurs, ces métabolites secondaires peuvent être retrouvés au sein du règne animal comme dans le miel (Amiot et al., 1989).

Tableau 18- Exemples de distribution des flavonoïdes dans les fruits et légumes (Chebil, 2006)

Sous-classe	Exemples	Distribution	Référence
Anthocyanes	Cyanidine, malvidine	Fruits et légumes colorés en rouge et violet (raisins rouges, cerises, fraises, pommes, baies, kaki et cassis, etc...)	(Verpoorte, 1984; Rice-Evans et al., 1996)
Aurones	Auréusidine, hispidol	Graines (soja, fève tonka), épices, cactus (<i>C. senilis</i>) et fleurs des plantes <i>Acacia</i>	(Haudecoeur, 2011)
Chalcones	Davidigénine, asébogénine	Agrumes (<i>Citrus nensis</i>) et tomates	(Yamamoto et al., 2004; Li et al., 2006)
Flavanols	Catéchine, EGCG,	Fruits (raisins, pommes), boissons chaudes (thé vert, thé noir), chocolat et	(Rice-Evans et al., 1996)

plante (<i>Vitis vinifera</i>)				
Flavanones	Hespéritine, taxifoline	naringine,	Agrumes et citrus et plante (<i>Eucalyptus globulus</i>)	(Rice-Evans et al., 1996)
Flavonols	Quercétine, kempférol	myricétine et	Fruits (pommes, raisins, pamplemousse), légumes (chicon, brocoli, laitues, oignons, olives) et thé noir	(Rice-Evans et al., 1996)
Flavones	apigénine, chryisine	lutéoline,	Herbes aromatiques (romarin, thym, persil), céréales et les légumes (pois, haricots) et plantes (<i>Petroselinum sativum</i> et <i>Apium graveolens</i>)	(Rice-Evans et al., 1996)

II-3. Biosynthèse

La biosynthèse des flavonoïdes passe par l'acide shikimique (voie shikimate) (Figure 15). Le précurseur principal est le 4-hydroxycinnamate-coenzyme A, synthétisé à partir de la phénylalanine (Hahlbrock and Grisebach, 1975; Winkel, 2006). Leur structure de base résulte de la condensation, catalysée par l'enzyme chalcone synthase, de trois molécules de malonyl-CoA avec le 4-coumaroyl-CoA (4-hydroxycinnamoyl-CoA). Il est à préciser que le malonyl-CoA provient des polyacétates (voie malonate) alors que le 4-coumaroyl-CoA est issu de la voie shikimate (Hahlbrock and Grisebach, 1975; Winkel, 2006). Ensuite, les diverses structures de flavonoïdes sont formées via un intermédiaire commun : la 2',4,4',6'-tétrahydroxychalcone (Hahlbrock and Grisebach, 1975; Winkel, 2006).

Une cyclisation catalysée par la chalcone isomérase forme le noyau C des flavonoïdes. Il s'agit d'un mécanisme de fermeture stéréospécifique du cycle : une addition syn sur la double liaison E (Figure 15) (Hahlbrock and Grisebach, 1975; Winkel, 2006).

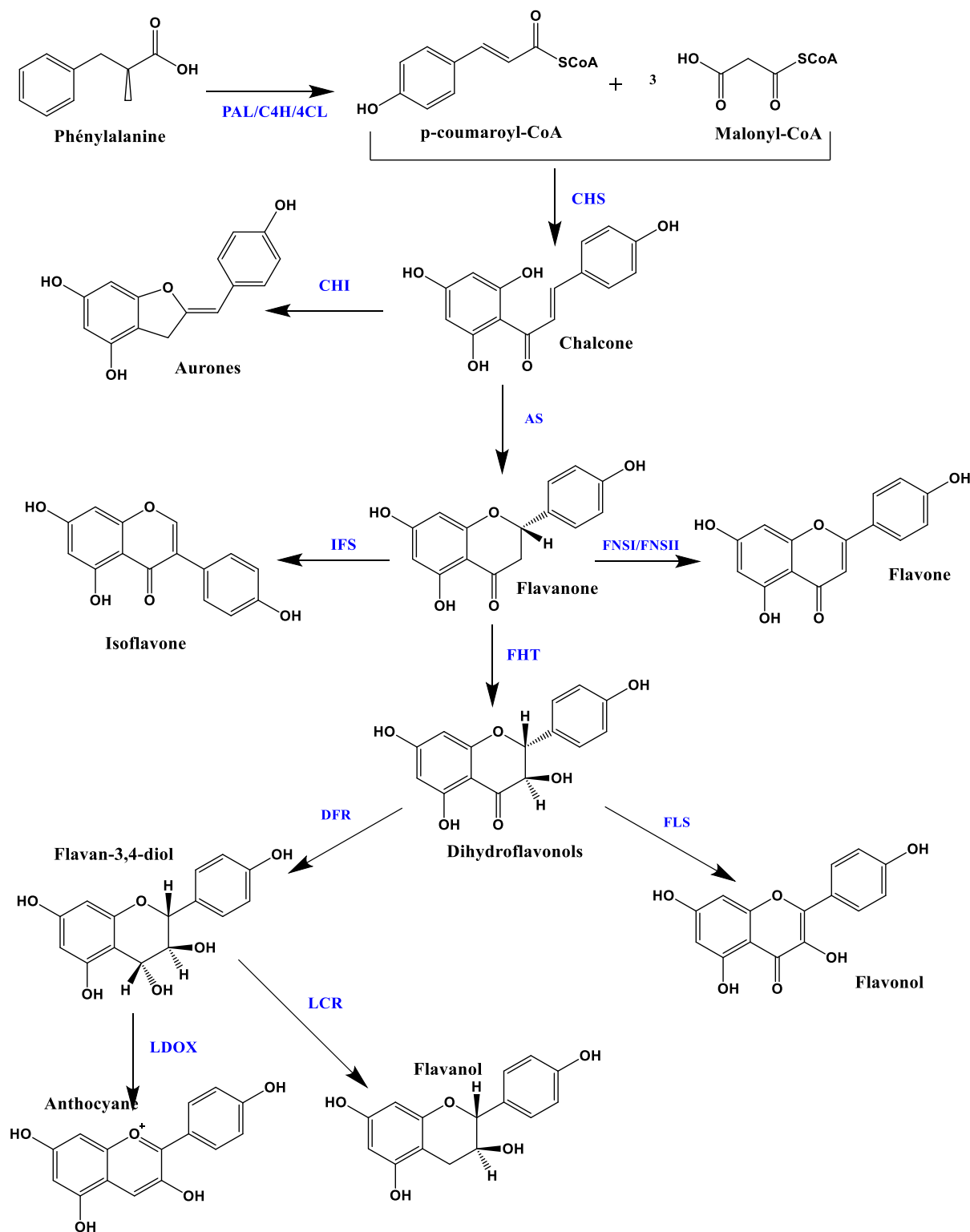


Figure 15- Biosynthèse des flavonoïdes

AS : aurone synthase, CHI : chalcone isomérase, CHS : chalcone synthase, DFR : dihydroflavonol-4-réductase, FHT : flavanone-3-hydrolase, FLS : flavonol synthase, FNSI/FNSII : flavone synthase, IFS : isoflavone synthase, LDOX : leucothoanthocyanidine dioxygénase, LCR : leucoanthocyanidine réductase, PAL : Phénylalanine

II-4. Rôles, propriétés physico-chimiques et biodisponibilité

II-4-1. Rôles des flavonoïdes dans les plantes

Le premier rôle des flavonoïdes dans le règne végétal est de contribuer à leur couleur et notamment à celle des fleurs. Ils sont connus comme des pigments naturels au même titre que les chlorophylles (couleur verte) et les caroténoïdes (couleur jaune et orangée). Par contre, les anthocyanes peuvent pigmenter les plantes avec une vaste gamme de couleurs comme jaune-orangée, bleu, pourpre et rouge (Nozzolillo and McNeill, 1985). Les flavones, les chalcones et les aurones apportent la couleur jaune, rouge voire blanche aux fleurs des plantes. Ces couleurs attirent les insectes pollinisateurs permettant la reproduction des végétaux (Hulse, 1980). Par conséquent, ces molécules possèdent un rôle dans la fertilité des plantes.

Comme tous métabolites secondaires, ils protègent les plantes avec leur capacité à repousser certains insectes par leur goût désagréable. Ils agissent également comme des phytoalexines : des substances naturelles pouvant lutter contre les infections bactériennes (Samanta et al., 2011; Khalid et al., 2019). En outre, ils jouent des rôles importants dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance (Samanta et al., 2011; Khalid et al., 2019).

II-4-2. Propriétés physico-chimiques des flavonoïdes

Solubilité

Nombreux paramètres peuvent influencer la solubilité des flavonoïdes : le solvant utilisé, le composé lui-même (nature, substituants) ainsi que les conditions environnementales (la température de la pièce, la luminosité, le pH, etc). Les flavonoïdes non glycosylés sont principalement solubles dans des solvants de faible polarité comme l'hexane, l'éther éthylique et les solvants halogénés (dichlorométhane, chloroforme) (Chebil et al., 2007, 2010). Par contre les flavonoïdes glycosylés sont solubles dans des solvants polaires (acétone, éthanol) (Chebil et al. 2007, 2010). Ainsi, les composés d'un même groupe peuvent réagir différemment en présence de certains solvants. Plus le nombre de groupements hydroxyles et le nombre de sucres sont élevés, plus les flavonoïdes sont solubles dans les solvants polaires

et inversement dans les solvants apolaires (Markham, 1989; Rothwell et al., 2005; Chebil et al., 2007, 2010; Xiao et al., 2011).

Les flavonoïdes sont principalement moins solubles dans l'eau à cause des groupes phénols qui les constituent. Leur solubilité dans les solvants apolaires est également limitée en raison de la présence des groupements hydroxyles.

Pour pallier à ce manque de solubilité des flavonoïdes, différentes stratégies ont été développées :

- L'acylation des groupements phénols 7-OH et 3'-OH de l'hespéridine a permis de stabiliser la fonction du phénol et d'augmenter la solubilité du flavonoïde en milieu lipophile (Benavente-García et al., 2001).
- La glycosylation de la naringine à l'aide de l'amylose maltogénique (bactérie *Bacillus stearothermophilus*) et de maltotriose a permis d'augmenter de 250 fois sa solubilité dans l'eau (Lee et al., 1999).
- L'insertion d'une β -cyclodextrine dans l'hespéridine ou la naringinine a permis d'augmenter sa solubilité dans les solvants polaires (Tommasini et al., 2004).

Absorption UV B

La capacité des flavonoïdes à produire une diversité de couleurs leur confèrent des propriétés spectrales d'absorption dans les ultraviolets permettant de les distinguer. Ainsi, ils peuvent agir comme des filtres anti-UV et protègent les plantes d'éventuels dommages (Harborne and Williams, 2000; Agati and Tattini, 2010).

Il existe trois types de rayonnement UV atteignant la surface de la terre : UV-A (320 - 400 nm), UV-B (280 - 320 nm) et UV-C (254 - 280 nm). Les dommages les plus graves sont causés par la bande UV-B perturbant la photosynthèse et la pollinisation provoquant ainsi des perturbations au niveau de la croissance cellulaire des plantes (Samanta et al., 2011).

Principalement, les flavonoïdes ont la capacité d'absorber le rayonnement UV-B protégeant ainsi les tissus végétaux. Les spectres des flavonoïdes présentent deux bandes d'absorption (Kootstra, 1994; Harborne and Williams, 2000; Agati and Tattini, 2010) (Figure 16) :

- La bande I, située entre 290 et 385 nm, associée à l'absorption du noyau B (chromophore cinnamoyle)

- La bande II, située entre 240 et 285 nm, associée à l'absorption du noyau A (chromophore benzoylé)

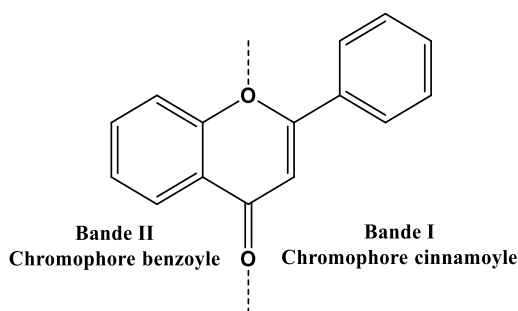


Figure 16- Domaines d'absorption UV des flavonoïdes

Les bandes d'absorption des flavonoïdes peuvent être influencées par différents facteurs : la nature (hydroxylation, méthylation, acylation) et la position de la substitution, le pH, le solvant, les interactions intra et inter moléculaires (liaisons hydrogènes). Par exemple, une méthylation ou une acylation peut engendrer un effet hypsochrome c'est à dire déplacer les bandes d'absorption vers les plus courtes longueurs d'onde. Au contraire, un degré d'hydroxylation élevé entraîne un effet bathochrome déplaçant les bandes d'absorption vers les plus grandes longueurs d'onde (Kootstra, 1994 ; Harborne and Williams, 2000 ; Agati and Tattini, 2010) (Tableau 19).

Tableau 19- Absorption UV des flavonoïdes dans le méthanol

Classe	Bande I (nm)	Bande II (nm)
Anthocyanes	270-280	465-560
Aurones	230-270	340-390
Chalcones	230-270	380-430
Flavanols	275-295	300-330
Flavanones	275-295	300-330
Flavonols	250-280	330-385
Flavones	250-280	310-350

Stabilité

Comme les flavonoïdes sont des molécules très réactives, leur stabilité est facilement influençable par différents paramètres tels que la lumière (Ishihara and Nakajima, 2003; Tommasini et al., 2004), le pH (Friedman and Jürgens, 2000), la température, le solvant (Tommasini et al., 2004) ou bien encore la présence d'enzymes (Makris and Rossiter, 2002a; Kubo et al., 2004), d'ions métalliques (Makris and Rossiter, 2002b; Mochizuki et al., 2002) et d'oxydants (Fargeix, 2000). Parmi les flavonoïdes, les flavonols sont moins sensibles à la lumière que les flavones à cause du groupement hydroxyle libre 3-OH (Fargeix, 2000). Tous les flavonoïdes se dégradent facilement dans un environnement avec une température élevée, un pH basique et en présence d'ions métalliques. Ce pH basique va augmenter l'oxydation des flavonoïdes à cause d'une déprotonation ou le fait que l'oxydant est plus stable. La nature du solvant peut également provoquer le mécanisme de dégradation des flavonoïdes (Friedman and Jürgens, 2000; Makris and Rossiter, 2002b, 2002a; Mochizuki et al., 2002; Tommasini et al., 2004).

Biodisponibilité des flavonoïdes

De nombreuses études biologiques ont mis en évidence les potentiels thérapeutiques des flavonoïdes contre les maladies dégénératives chroniques, les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires, le diabète, l'ostéoporose et les cancers (Hinderer and Seitz, 1988; Harborne and Williams, 2000). Néanmoins, les flavonoïdes présentent une biodisponibilité limitée observée en raison de leur nature, de leurs substituants et de leur masse moléculaire. Les isoflavones, les flavanones, les catéchines et les glucosides de quercétine sont mieux absorbés, au contraire des tanins condensés, anthocyanes et catéchines (Tableau 20) (Manach et al., 2005). La faible biodisponibilité orale peut être directement associée à la présence de groupements hydroxyles libres. En outre, le degré de glycosylation et le type de sucre lié peuvent influencer la biodisponibilité de ces flavonoïdes (Manach et al., 2005). Cette limite en biodisponibilité peut être également liée à leur faibles teneurs plasmatiques soulevant des questions sur les mécanismes par lesquels ils atteignent des concentrations intracellulaires efficaces dans les tissus cibles (Reinboth et al., 2010). Certains flavonoïdes sont rapidement absorbés et apparaissent dans le plasma, par exemple, le temps nécessaire pour atteindre la concentration plasmatique maximale (T_{max}) pour les anthocyanes

est de 15 minutes, tandis que le T_{max} est égal à 24 h pour les flavanols (Ichiyanagi et al., 2006). (Tableau 20).

Tableau 20- Exemples des études pharmacocinétiques des flavonoïdes (Čvorović et al., 2018)

	Sous-classe	Études précliniques (animaux)	Études cliniques (Humains)	Transporteurs de membranes
<div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> <div style="margin-bottom: 10px;">Moins</div> <div style="flex-grow: 1; border-left: 2px solid black; margin: 0 10px;"></div> <div style="margin-top: 10px;">Plus</div> </div>	Anthocyanes	C _{max} = 0,18 à 0,84 μM	C _{max} = 0,56 à 5,8 nM	BCRP, BTL, P-gp, SVCT1
	Galloyl catéchines	T _{max} = 15 à 60 min BA = 0,49 à 1,82%	T _{max} = 0,5 à 2,2 h	
	Flavonols	C _{max} = 0,9 à 6,8 μM T _{max} = 30 min à 2,9 h BA = 0,5 à 5,3%	C _{max} = 137 nM à 7,64 μM T _{max} = 0,68 à 7,5 h	BCRP, BTL, GLUT2, MRP1, MRP2, MCT1, OAT1, OATP, P-gp, SGLT1, SVCT1, URAT1
	Flavanones	C _{max} = 21 nM à 6 μM T _{max} = 41 min à 4,03 h BA = ni	C _{max} = 60 nM à 7,4 μM T _{max} = 2 à 5,8 h	BCRP, GLUT2, MRP1, MRP2, MRP3, OATPs, P-gp, SVCT1
	Flavanols	C _{max} = 0,3 à 2,7 μM T _{max} = 24 h BA = 0,1 à 31,2%	C _{max} = 70 nM à 7,35 μM T _{max} = 1,2 à 4,1 h	BCRP, MCT1, MRP2, MRP3, OATPs, P-gp, SVCT1
	Isoflavones	C _{max} = 2,2 à 20,9 μM T _{max} = 10 min à 1,5h BA = 1,4 à 30 %	C _{max} = 0,17 à 25,4 μM T _{max} = 2,5 à 11 h	BCRP, MRP2, OATP1B1, P-gp, SVCT1, SVCT2

BA, biodisponibilité orale estimée ; C_{max}, concentration plasmatique maximale (pic) après ingestion orale à dose unique ; T_{max}, temps nécessaire pour atteindre C_{max} ; ni : non indiqué. La flèche indique une échelle croissante de moins biodisponible à plus biodisponible.

In vitro, des travaux de recherche ont montré que les flavonoïdes hydrophobes sont mieux absorbés, en raison de leur perméabilité plus élevée par rapport à la membrane cellulaire. En revanche, les flavonoïdes glycosylés sont moins assimilés par les modèles cellulaires à cause des entités de sucres rattachées. Par contre, des études *in vivo* ont révélé que certains flavonoïdes glycosylés sont faciles à absorber que leurs homologues aglycones (Manach et al., 2005; Čvorović et al., 2018; de Freitas Queiroz Barros and Maróstica Junior, 2019). On peut prendre comme exemple le cas de la quercétine et de l'isoquercitrine dans des

modèles de porcs et de rats. Les résultats ont montré une quantité plus importante de métabolites formés dans le plasma avec l'isoquercitrine.

Principalement, les flavonoïdes peuvent être considérés comme des composés hydrophiles (log P faibles) avec un faible poids moléculaire, leur introduction dans le compartiment intracellulaire s'effectue via des protéines de transport transmembranaires spécifiques (Čvorović et al., 2018). Les transporteurs apparaissent comme des facteurs importants dans la conciliation de l'activité biologique des flavonoïdes au niveau cellulaire et au niveau des organes (Čvorović et al., 2018).

II-4-3. Activité antivirale des flavonoïdes

En appui et en alternative aux médicaments synthétiques, les produits naturels et ses dérivés représentent une source potentielle d'agents antiviraux (Patridge et al., 2016). Les composés phénoliques comme les flavonoïdes constituent la famille de métabolites secondaires la plus répandue dans le règne végétal (Loaiza-Cano et al., 2020). Des milliers de flavonoïdes ont déjà été isolés et identifiés ces dernières années avec des activités biologiques intéressantes (antioxydant, antimicrobien, anti-inflammatoire, anticancéreux, etc (Loaiza-Cano et al., 2020).

En effet, des flavonoïdes naturels ont montré des caractéristiques antivirales, en particulier contre les infections grippales A et B qui touchent plusieurs millions de patients chaque année (Moscona, 2005).

Des études *in vitro* ont mis en évidence l'activité de l'épigallocatechine (Imanishi et al., 2002), du (±) dihydromyricétine et du 5, 7, 3', 4'-tétra-O-méthylquercétine contre H1N1 (Roschek et al., 2009). Ces molécules ont également le potentiel d'inhiber *in vitro* l'infection par HCV (apigénine, naringénine) (Nahmias et al., 2008 ; Shibata et al., 2014), HBV (EGCG) (He, 2011), enterovirus A71 (apigénine, baicaline, kempférol) (Tsai et al., 2011; Zhang et al., 2014; Li et al., 2015), poliovirus (3-méthylquercétine, les acides 6-chloro-4'-oxazolinyle et 6-chloro-3-hydroxyflavone-4'-carboxylique) (González et al., 1990; Desideri et al., 1995), rhinovirus (quercétine) (Ganesan et al., 2012) et le coxsackievirus (dihydroquercétine, lutéoline) (Xu et al., 2014; Galochkina et al., 2016).

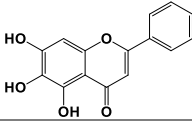
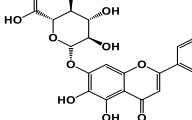
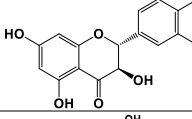
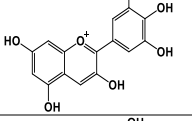
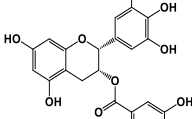
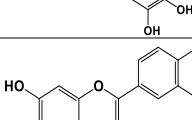
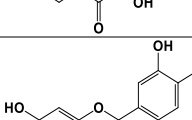
La quercétine, la galangine, l'épicatéchine et l'EGCG ont été également identifiées comme des inhibiteurs de HSV-1, HSV-2 *in vitro* (Lyu et al., 2005). Par ailleurs, certains flavonoïdes possèdent une activité antivirale contre HIV-1 (baicaline, genistéine, sodium rutine sulfate)

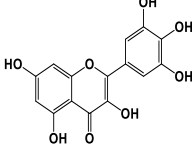
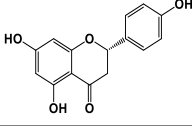
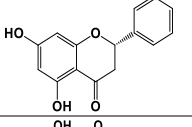
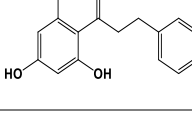
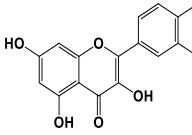
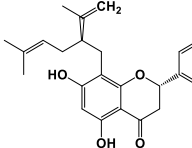
(Li et al., 2000; Tao et al., 2007; Sauter et al., 2014) et l'ebolavirus (isoquercitrine $IC_{50} = 5,3 \mu M$, quercétine $IC_{50} = 7,4 \mu M$) (Qiu et al., 2016; Fanunza et al., 2020). Depuis la pandémie du COVID-19, des tests sur les flavonoïdes ont été réalisés et ont montré l'activité antivirale *in vitro* de l'EGCG et du théaflavine (Jang et al., 2020), et *in silico* de la quercétine, la fisétine, la rutine, la biochanin A et de la sylimarine (Badshah et al., 2021).

Ces flavonoïdes interagissent contre CHIKV (baicaléine, quercétine) (Lani et al., 2016) et contre certains flavivirus comme le JEV (la baicaléine) (Johari et al., 2012), le ZIKV (EGCG, isoquercitrine, myricétine et quercétine) (Badshah et al., 2021) et le DENV (quercétine, baicaléine) (Zandi et al., 2011b).

Dans la suite de cette partie, je souligne les travaux de recherche sur le pouvoir antiviral des flavonoïdes contre les flavivirus ZIKV et DENV (Tableau 21).

Tableau 21- Quelques flavonoïdes actifs contre ZIKV et DENV

Flavonoïde	Structure	Virus	Modèle d'étude	IC_{50}	Mécanisme d'action	Référence
Baicaléine		ZIKV	<i>In vitro</i> / Vero	4 nM	Entrée et réplication	(Oo et al., 2019)
Baicaléine		DENV-2	<i>In vitro</i> / Vero	14,9 $\mu g. mL^{-1}$	Entrée et réplication	(Badshah et al., 2021)
		ZIKV	<i>In vitro</i> / Vero	14 μM	Entrée et réplication	(Oo et al., 2019)
Catéchine		DENV-2	<i>In vitro</i> / Vero	33,7 $\mu g. mL^{-1}$	Non élucidé	(Raekiansyah et al., 2018)
Delphinidine		DENV-2	<i>In vitro</i> / Vero	ni	Non élucidé	(Raekiansyah et al., 2018)
EGCG		ZIKV	<i>In vitro</i> / C636	21,4 μM	Entrée	(Carneiro et al., 2016)
Fisétine		DENV	<i>In vitro</i> / U937-DC-SIGN	7,3 μM	Réduction de la régulation du TNF- α	(Jasso-Miranda et al., 2019)
Isoquercitrine		ZIKV	<i>In vitro</i> / SH-SY5Y	9,7 μM	Entrée (Internalisation)	(Gaudry et al., 2018)

Myricétine		ZIKV	<i>In vitro/ Vero</i>	0,58 μM	Réplication	(Zou et al., 2020)
Naringénine		DENV-2	<i>In vitro/ Vero</i>	47,9 $\mu\text{g. mL}^{-1}$	Non élucidé	(Loaiza-Cano et al., 2020)
		DENV-2	<i>In vitro/ Vero</i>	168,2 $\mu\text{g. mL}^{-1}$	Réplication	(Zandi et al., 2011b)
Pinocembrine		ZIKV	<i>In vitro/ JEG-3</i>	17,44 μM	Inhibition de la synthèse d'ARN	(Lee et al., 2019b)
Phlorétine		ZIKV	<i>In vitro/ Vero</i>	22,85 μM	Assemblage	(Lin et al., 2019)
Quercétine		DENV	<i>In vitro/ U937-DC-SIGN</i>	24,5 μM	Réduction de la régulation du TNF- α	(Jasso-Miranda et al., 2019)
		DENV-2	<i>In vitro/ Vero</i>	19,2 $\mu\text{g. mL}^{-1}$	Non élucidé	(Trujillo-Correa et al., 2019)
		DENV-2	<i>In vitro/ Vero</i>	35,7 $\mu\text{g. mL}^{-1}$	Réplication	(Zandi et al., 2011b)
		DENV-2	<i>In vitro/ BHK-21</i>	125 $\mu\text{g. mL}^{-1}$	Possible effet virucide	(Chio et al., 2016)
		ZIKV	<i>In vitro/ Vero</i>	2,30 μM	Réplication	(Zou et al., 2020)
Sophoraflavone G		DENV	<i>In vitro/ Vero</i>	14,48 μM	Inhibition NS5 polymérase	(Sze et al., 2017)
		ZIKV	<i>In vitro/ Vero</i>	22,61 μM	Inhibition NS5 polymérase	(Sze et al., 2017)

Des travaux de recherche ont montré l'effet antiviral *in vitro* de la quercétine contre la souche DENV-2 (NGC) de la Nouvelle Guinée. La production de copies d'ARN de DENV-2 a diminué de 67% après traitement avec 50 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ (165 μM) de quercétine. Les mêmes résultats positifs contre le DENV-2 (NGC) sur les cellules Vero ont été observés avec la baicaline, la naringine, la naringénine, la catéchine et la fisétine (Zandi et al., 2011a, 2011b; Trujillo-Correa et al., 2019).

L'activité anti-ZIKV et anti-DENV de la baicaleïne et de la baicaline montre une réduction de 50% de l'infection. Les deux composés inhibent l'infection à différentes étapes du cycle viral. Toutefois, la baicaleïne est plus puissante durant l'étape de la réplication, tandis que la baicaline est plus efficace durant l'entrée des flavivirus (Zandi et al., 2012 ; Oo et al., 2019). L'évaluation des effets antiviraux de delphinidine contre trois flavivirus différents (DENV, ZIKV, WNO) ont affirmé que la molécule réduit les infections en inhibant

l'internalisation du virus (Raekiansyah et al., 2018). Le traitement avec la sophoraflavanone G après l'infection par le ZIKV et le DENV, a entraîné une réduction des cellules infectées en affectant les phases tardives du cycle viral (Sze et al., 2017).

En outre, l'epigallocatechine gallate (EGCG) a été évaluée comme virucide contre ZIKV (Carneiro et al., 2016). La myricétine et la quercétine présentent également une activité anti-ZIKV *in vitro* en ciblant le processus d'entrée du virus (Zou et al., 2020). D'autres études antivirales ont montré que la pinocembrine inhibe à la fois la production d'ARN viral et la synthèse de la protéine d'enveloppe E (Lee et al., 2019b). La phloretine a été testée *in vitro* contre l'infection par le ZIKV. Les résultats obtenus ont montré une réduction du taux de mortalité des cellules Vero induit par l'infection. La phloretine était capable d'interférer dans plusieurs étapes du cycle viral, mais principalement dans la production d'ARN et les étapes ultérieures du cycle. La naringénine montre une activité antivirale contre ZIKV sur les cellules A549. Une suggestion affirme que le mode d'action de ce flavonoïde entre en vigueur durant la phase de réplication et de l'assemblage virion (Cataneo et al., 2021).

Au sein de mon laboratoire d'accueil l'UMR PIMIT, des études *in vitro* ont montré l'effet antiviral de l'isoquercitrine (Q3G) contre ZIKV dans différentes lignées cellulaires. Q3G interfère avec le processus d'entrée du ZIKV en bloquant son internalisation dans les cellules hôtes (Gaudry et al., 2018). Des études *in vivo* ont également montré que l'administration de Q3G à une dose maximale de 100 mg. kg⁻¹ chez des souris infectées par le ZIKV, est partiellement efficace (50% de souris survivants) avec une perte de poids moyenne de 20% (Wong et al., 2017). Par la suite, je détaillerai dans les paragraphes suivants les études antivirales effectuées sur l'isoquercitrine et la quercétine.

III. La quercétine et l'isoquercitrine

Depuis des décennies, la quercétine a fait l'objet d'un grand nombre d'études pharmacologiques. Par contre, les investigations biologiques des glycosides de quercétine comme l'isoquercitrine ont été élaborées dans une moindre mesure (Valentová et al., 2014).

L'isoquercitrine est isolée pour la première fois à partir des gousses de *Cercis canadensis L* (Douglass et al., 1949). Il s'agit du monoglucoside de la quercétine naturelle la plus abondante parce que la molécule est omniprésente dans le règne végétal, les fruits, les légumes, les céréales et diverses boissons d'origine végétale telles que le thé et le vin (Valentová et al., 2014). Bien que l'isoquercitrine soit largement distribuée, sa teneur dans le

matériel végétal est extrêmement faible. Ainsi, il est difficile d'en obtenir des quantités suffisantes à l'état pur pour des applications en industries alimentaire et pharmaceutique (Lu, 2012). La technique la plus classique pour obtenir de l'isoquercitrine est la synthèse à partir de la rutine. Il s'agit d'une élimination sélective du rhamnose de la molécule de rutine par clivage enzymatique en utilisant les naringinase, hesperinase et rhamnosidase (Schéma 1).

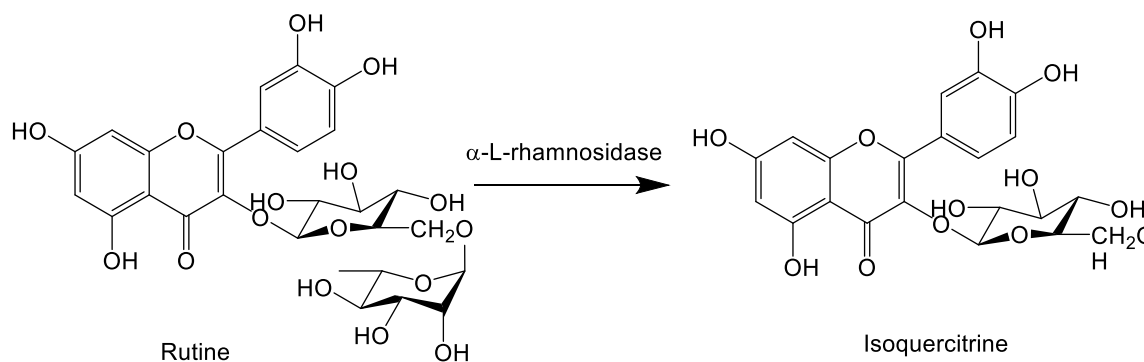


Schéma 1- Synthèse de l'isoquercitrine à partir de la rutine

L'isoquercitrine est largement biodisponible que la quercétine et elle présente un large spectre d'activités biologiques *in vitro* et *in vivo* contre le stress oxydatif, les maladies cancéreuses, les troubles cardiovasculaires, les réactions allergiques, les maladies chroniques comme le diabète, les maladies infectieuses et virales (Valentová et al., 2014).

III-1. Résultats préliminaires sur l'activité antivirale de l'isoquercitrine

Gaudry et ses collaborateurs ont démontré que l'isoquercitrine exerce une activité antivirale contre les deux souches africaine et asiatique de ZIKV *in vitro*. Les tests ont été effectués sur trois lignées cellulaires A549, Huh-7 et SH-SY5Y infectées par le ZIKV (MOI =1 ou 10) en présence de différentes concentrations de l'isoquercitrine. Les résultats obtenus ont montré que ce composé possède une activité significative contre l'infection par le ZIKV dans les différentes cellules humaines (Gaudry et al., 2018)(Tableau 22).

Tableau 22- Activité antivirale de l'isoquercitrine contre ZIKV sur différentes lignées cellulaires (Gaudry et al., 2018)

Lignées cellulaires	CC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	SI
A549	551,2 ± 43,2	15,5 ± 2,3	35,6
HuH-7	326,8 ± 45,7	14,0 ± 3,8	23,3
SH-SY5Y	582,2 ± 41,4	9,7 ± 1,2	60,0

Les tests mécanistiques ont montré que l'isoquercitrine agisse sur les phases précoces du cycle viral en empêchant l'internalisation clathrine dépendante des particules virales dans les cellules hôtes (Gaudry et al., 2018).

Ensuite, la même équipe a évalué les activités d'autres flavonoïdes apparentés à l'isoquercitrine contre ZIKV : la quercétine, le kaempférol et l'hyperoside (Figure 17). Aux concentrations non cytotoxiques les plus élevées, il a été constaté que **la quercétine, le kaempférol et l'hyperoside n'ont présenté aucun effet antiviral significatif contre ZIKV** par rapport à l'isoquercitrine.

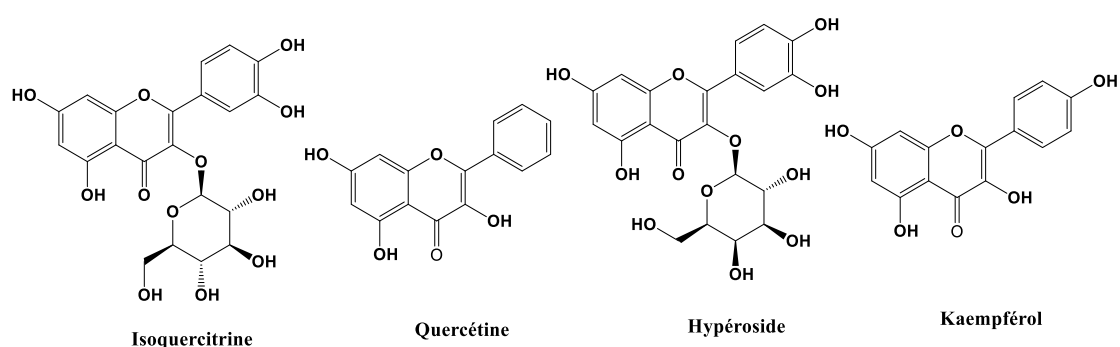


Figure 17- Structures chimiques de la quercétine, l'isoquercitrine, l'hyperoside et le kaempférol

Premièrement, étant donné que la quercétine ayant le même aglycone que l'isoquercitrine est inefficace contre le ZIKV, cela laisse supposer que **la fraction glycosylée de l'isoquercitrine** pourrait jouer un rôle dans son effet antiviral.

Deuxièmement, l'hyperoside et l'isoquercitrine sont des *O*-glycosydes de la quercétine qui se différencient par la nature de leur sucre en position 3 respectivement un galactose et un glucose (Figure 17). Ce qui démontre **l'influence de la nature du sucre** sur le potentiel d'un glycoside de quercétine à inhiber l'infection du virus.

Ces résultats soulignent l'importance de l'isoquercitrine en tant que **modèle** antiviral naturel prometteur contre ces flavivirus.

III-2. Objectif de l'étude sur les dérivés de la quercétine

Mes travaux de recherches contribuent aux principaux objectifs de la chimie médicinale et de la virologie dans le développement de nouveaux antiviraux, efficaces contre les flavivirus, au spectre d'activités le plus large possible. Une des approches pour trouver des

agents antiviraux est le dépistage massif des produits naturels comme les flavonoïdes et de leurs analogues contre les virus cibles. Le développement de ces molécules, substances les plus abondantes dans les sous-produits de transformation des plantes malgaches, en tant qu'agents antiviraux, contribue à la valorisation et à la conservation de la richesse floristique de Madagascar. Dans le cadre de cette thèse, on s'intéresse en particulier à la quercétine et ses dérivés en tenant compte de son large spectre antiviral (contre les flavivirus, les herpès, les orthomyxovirus et les coronavirus) (Di Petrillo et al., 2022). En se focalisant sur les molécules anti-flavivirus, l'isoquercitrine, un dérivé de la quercétine, présente une activité antivirale méritant des études supplémentaires plus approfondies. La molécule pourra être également un échafaudage pour élaborer d'autres analogues bioactifs.

Par conséquent, la deuxième partie de mes travaux a pour objectif l'identification des pharmacophores afin de mettre en exergue les relations entre la structure chimique et l'activité antivirale des dérivés de la quercétine et de l'isoquercitrine.

III-3. Hypothèses et stratégies menées pour élucider la relation entre la structure et l'activité antivirale des dérivés de la quercétine

En se basant sur les études antivirales antérieures effectuées sur l'isoquercitrine, je vais détailler les deux hypothèses suivantes :

- Est-ce que l'activité anti-ZIKV de l'isoquercitrine provient de sa polarité et son hydrophilie plus élevée à cause de ses substituants hydroxyles ?
- Est-ce que l'activité anti-ZIKV de l'isoquercitrine dépend principalement de la présence d'une partie osidique et de la nature même du sucre dans sa structure ?

En chimie, la polarité se définit par la manière dont les charges électriques négatives et positives sont réparties dans une molécule ou une liaison chimique. Cette polarité résulte de la différence d'électronégativité entre les atomes, des différences de charge qu'elle induit et de leur répartition dans l'espace. La polarité impacte les caractéristiques physico-chimiques d'une molécule (tension superficielle, point de fusion, point d'ébullition, solubilité et réactivité) (Hallouët and Borry, 2009; Lestremau, 2014).

Généralement, un composé hydrophile possède une affinité pour l'eau, ainsi typiquement polaire. Il est également ionique et possède la capacité de créer des liaisons hydrogène avec l'eau ou un solvant protique polaire. Les molécules polaires et hydrophiles

sont caractérisées par différents indices, par exemple a) le Log K_D (coefficient de partition entre le sol et l'eau), b) le Log K_{OC} (coefficient de partition carbone organique/eau) ou c) le Log P (coefficient octanol/eau) (Lestremau, 2014).

Les composés organiques sont généralement classés en fonction de leur polarité selon le Log P ou Log Kow. Il s'agit d'un indice de la solubilité différentielle de la molécule dans deux solvants de polarité opposée : l'octanol et l'eau (Caron et al., 2018).

Ce paramètre permet d'appréhender le caractère hydrophile ou lipophile d'une substance. En effet, si le Log P > 0 et très élevé, la molécule est bien plus soluble dans l'octanol que dans l'eau indiquant son caractère lipophile. Au contraire, si le Log P < 0, la molécule est considérée comme hydrophile. Un Log P = 0 signifie que la molécule est aussi soluble dans un solvant apolaire que dans un solvant polaire (Caron et al., 2018).

D'une part, Gaudry et al ont démontré que l'isoquercitrine (Figure 17) exerce une activité antivirale agissant sur l'entrée du ZIKV au contraire de la quercétine, qui est resté inactif. Cela indique en hypothèse que la partie osidique est importante pour l'activité antivirale par rapport à son apport en solubilité mais également en stabilité et en biodisponibilité. Effectivement, l'ajout d'un sucre est un moyen efficace pour modifier la solubilité dans l'eau et la stabilité des flavonoïdes. La glycosylation exerce de multiples effets sur les propriétés chimiques des flavonoïdes et modifie généralement son métabolisme et son absorption *in vivo* (Yang et al., 2018a).

D'autre part, l'étude menée par Gaudry et al. a mis en évidence que l'hypéroside (Figure 17) est inactive contre ZIKV (Gaudry et al., 2018). La différence entre les deux O-glycosides est la nature de sucre attaché à la position 3, qui est un galactose pour l'hypéroside. En terme de caractère hydrophile, le glucose est largement hydrophile (Log P = -3,6) (Mazzobre et al., 2005; Mohan et al., 2015; FooDB, 2019b) par rapport au galactose (Log P = -2,6) (FooDB, 2019a). Ainsi, notre hypothèse indique que le glucose a pour rôle d'augmenter l'hydrophilie et par conséquent la polarité de la quercétine. Ce fait pourrait être à l'origine de l'activité antivirale de l'isoquercitrine contre ZIKV.

Dans le but d'étudier la relation structure activité antivirale de l'isoquercitrine et d'autres dérivés de la quercétine, la stratégie de recherche adoptée se divise en deux catégories :

- **Synthétiser** par O-alkylation, O-acétylation **des dérivés peu polaires** de la quercétine **et évaluer leur activité antivirale** en comparaison avec d'autres dérivés synthétiques ;

- Synthétiser des dérivés polaires de la quercétine avec une structure non glycosylée (par la réaction de Mitsunobu) et évaluer leur activité antivirale en comparaison avec d'autres dérivés polaires avec ou sans une structure glycosylée ;

Pour les glycosides de la quercétine, plusieurs paramètres pouvant influencer l'effet antiviral sont étudiés : la nature du sucre attaché à la quercétine, les positions de la liaison glycosidique, le nombre d'oses attachés ainsi que la présence ou non d'autres substituants sur le squelette de base.

IV. Synthèse chimique des dérivés de flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés plus ou moins instables à la lumière et aux températures élevées. Leur solubilité reste faible et difficile à estimer dans un milieu aqueux comme dans un milieu très hydrophobe. Ces caractéristiques limitent leur incorporation dans les formulations médicamenteuses, alimentaires et cosmétiques (Walle, 2004). Pour pallier à ce problème, des modifications structurales par réaction chimique en vue d'améliorer leurs propriétés physico-chimiques peuvent être envisagées comme par exemple l'alkylation, l'acylation et la glycosylation.

IV-1. O-Alkylation des flavones

La synthèse des éthers de flavonoïdes rencontre des difficultés au niveau de la sélectivité et de la spécificité de l'alkylation. Par contre, il est connu que l'acidité relative prononcée de l'hydroxyle en position 7 des flavones/flavonols (Figure 18) et des coumarines permet une alkylation sélective en utilisant le sulfate de diméthyle et du bicarbonate de sodium (Jurd, 1958).

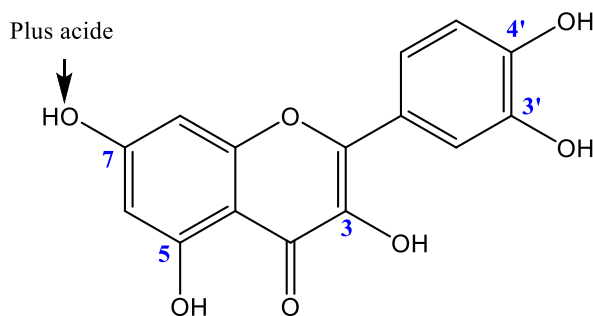


Figure 18- Structure chimique de la quercétine

Dans le cadre de mes travaux de thèse, trois réactions d'alkylation sélective des flavonoïdes ont été développées à savoir la catalyse acide, la catalyse par transfert de phase et la réaction de Mitsunobu.

IV-2-1. Catalyse acide

Une catalyse acide est une réaction chimique catalysée par un acide qui est souvent un ion hydronium (« proton »). Les estérifications, les adolisations et les alkylations sont des réactions typiquement catalysées par transfert de proton. L'application de la catalyse acide avec un composé aromatique a été décrite en formant un alcoxy-naphtalène au cours de la réaction entre le 2-naphtol et un alcool aliphatique en présence d'un acide de Brønsted (Cazorla et al., 2011). Le catalyseur étant l'acide sulfurique, a été mis en reflux avec l'alcool aliphatique qui joue à la fois un rôle de réactif et de solvant (Schéma 2). Par contre, une température élevée est nécessaire favorisant la déshydratation des alcools encombrés et par conséquent la formation d'alcènes (Cazorla et al., 2011).

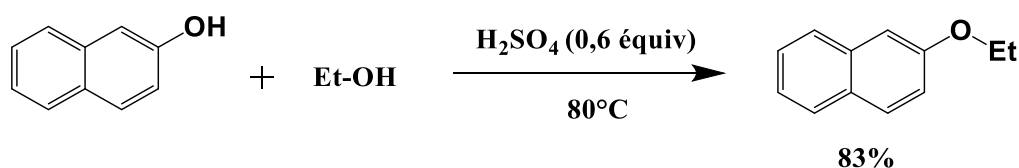


Schéma 2- O-alkylation du 2-naphtol par l'acide sulfurique

Ainsi, l'alkylation des dérivés phénoliques comme les coumarines peut être facilement réalisée avec un bon rendement (83%) en présence d'un acide de Lewis ou de Brønsted. La réaction respecte l'environnement (chimie durable) en utilisant un catalyseur totalement recyclable et en ne produisant que de l'eau comme sous produit (Cazorla et al., 2011; Ramiharimanana et al., 2022). Néanmoins, jusqu'à l'heure actuelle et à notre connaissance, la synthèse des dérivés flavonoïdiques avec la catalyse acide n'a jamais été réalisée.

IV-2-2. Catalyse par transfert de phase (CTP)

La synthèse de Williamson améliorée en est un exemple de cette catalyse par transfert de phase. C'est la méthode la plus simple pour obtenir des éthers, qui consiste à faire réagir un ion alcoolate avec un halogénoalcane primaire par substitution nucléophile de second ordre

(SN2) (Williamson, 1850; Fuhrmann and Talbiersky, 2005). Depuis près de 70 ans, des tentatives d'amélioration des conditions de la réaction ont fait l'objet de recherche afin de réduire la durée, les températures et pour limiter l'utilisation des réactifs cancérigènes et très onéreux (Freedman and Dubois, 1975; Peng and Song, 2002; Paul and Gupta, 2004; Fuhrmann and Talbiersky, 2005; Massah et al., 2007). L'utilisation de catalyseurs par transfert de phase activée est l'une des stratégies les plus générales et les plus efficaces pour satisfaire à cette exigence (Freedman and Dubois, 1975; Makosza, 2000).

La CTP est applicable à une grande variété de réactions durant lesquelles les anions inorganiques et organiques réagissent avec les substrats organiques. Elle repose sur le transfert d'un réactif anionique en phase organique formant une paire d'ions lipophiles avec un cation lipophile. La réaction peut être conduite en système liquide-liquide ou en système solide-liquide (Freedman, 1986; Albanese et al., 1999; Makosza, 2000).

L'alkylation (substitution nucléophile) de la coumarine par des alcanes en condition basique a pu être réalisée grâce à l'hydroxyde de tétrabutylammonium, un catalyseur de transfert de phase (Ramiharimanana et al., 2022). L'éthérisation à partir d'un bromure d'alkyle a été effectuée durant la première étape. Puis, une substitution nucléophile a été entreprise à partir de l'alcoolate de la 7-hydroxycoumarine et le bromure d'alkyle (Schéma 3) (Ramiharimanana et al., 2022). Ce type de réaction peut potentiellement produire des flavonoïdes alkylés.

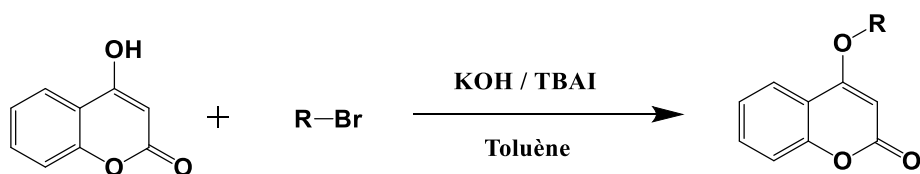


Schéma 3- Ethérisation du 4-hydroxycoumarine

IV-2-3. Réaction de Mitsunobu

La réaction de Mitsunobu a été décrite en 1967. Il s'agit de l'acylation d'un alcool avec de l'azodicarboxylate de diéthyle (DEAD) et de la triphénylphosphine (Schéma 4) (Mitsunobu and Yamada, 1967). La réaction permet de convertir un alcool primaire ou secondaire en éther, ester, imide, thioéther, β -dicétone, etc... en utilisant le nucléophile approprié.

La tributylphosphine est plus sélective pour les alcools primaires. Au contraire, la triméthylphosphine est plus efficace pour l'alkylation des phénols et des alcools benzyliques secondaires. Parmi les azodicarboxylates, l'azodicarboxylate de diéthyle (DEAD) est la plus utilisée même si ce réactif est très coûteux et difficile à éliminer. L'azodicarboxylate de diisopropyle (DIAD) paraît la moins coûteuse et l'azodicarboxylate de ditertbutyle (DBAD) est la plus facile à éliminer par extraction en milieu acide (Mitsunobu and Yamada, 1967).

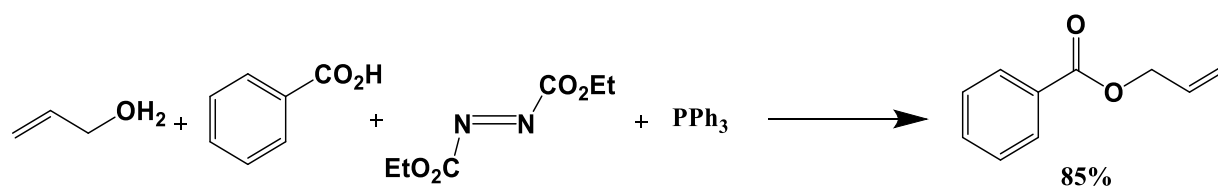


Schéma 4- Synthèse de l'allylbenzoate par réaction de Mitsunobu

La synthèse de la pavonin-4, un répulsif pour les requins, par la réaction de Mitsunobu a permis de déterminer qu'il y a eu une inversion complète de configuration après la synthèse (Schéma 5) (Williams et al., 2005). En outre, cette étude a indiqué que l'encombrement stérique est très important dans cette réaction. L'alcool secondaire le moins encombré est substitué par l'alcool benzylique, tandis que l'alcool le plus encombré reste inchangé (Williams et al., 2005).

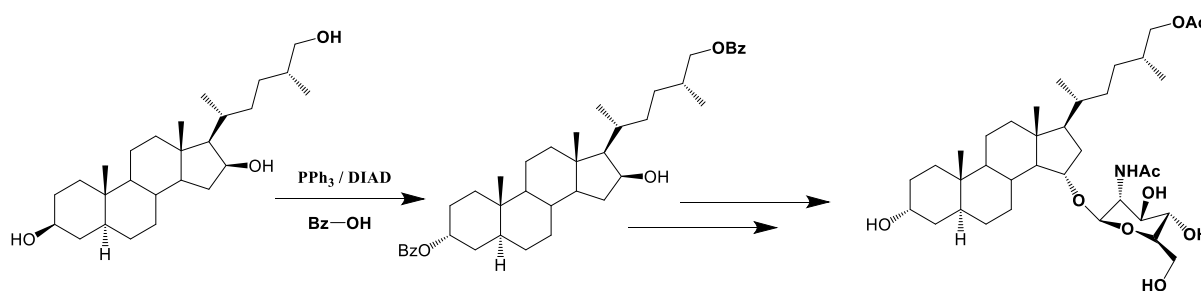


Schéma 5- Synthèse de pavonin-4 par réaction de Mitsunobu

Malgré son efficacité élevée, la réaction de Mitsunobu présente quelques inconvénients. Elle possède une faible économie atomique avec des réactifs onéreux et toxiques. La purification et la séparation des produits obtenus sont parfois compliquées à cause des excès de sous-produits (Ahn et al., 2002; But and Toy, 2007; Fletcher, 2015).

Récemment, certaines améliorations ont été apportées à la réaction de Mitsunobu pour réduire son coût élevé et les déchets engendrés. Une alternative proposée est l'utilisation de nouveaux réactifs dégradables, de faible toxicité pour simplifier le processus de purification.

D'autres options améliorées de la réaction de Mitsunobu ont été la réaction catalytique, la réaction fluorée et la réaction sous ultrasons (But and Toy, 2007; Swamy et al., 2009; Fletcher, 2015).

IV-2. O- Acétylation

L'acétylation est un cas particulier d'acylation en apportant un groupement fonctionnel acétyle dans un composé organique. L'acétylation des flavonoïdes permet d'augmenter leur hydrophobicité ou leur lipophilie. Ainsi, les dérivés acétylés des flavonoïdes seront plus stables et plus solubles dans un milieu hydrophobe. L'acétylation d'un flavonoïde peut être effectuée par voie chimique ou par voie enzymatique (Bresson et al., 1999; Chebil et al., 2006).

Le procédé chimique d'acétylation présente des inconvénients en raison de leur non sélectivité, c'est-à-dire, tous les groupements hydroxyles peuvent être acétylés facilement en milieu alcalin. Au contraire, de nombreux travaux avec l'acétylation enzymatique ont mis en évidence l'obtention des dérivés acétylés d'une manière régiosélective (Bresson et al., 1999; Chebil et al., 2006). Les enzymes utilisés sont souvent des lipases dont celle de *Candida antarctica* (CALB) reste la plus efficace (Schéma 6) (Chebil et al., 2006).

Les flavonoïdes glycosylés sont plus sensibles à l'acétylation enzymatique que les aglycones (Chebil et al., 2006). Ces synthèses peuvent être réalisées avec divers donneurs d'acyle comme les acides phénoliques et les esters de vinyle (Chebil et al., 2006).

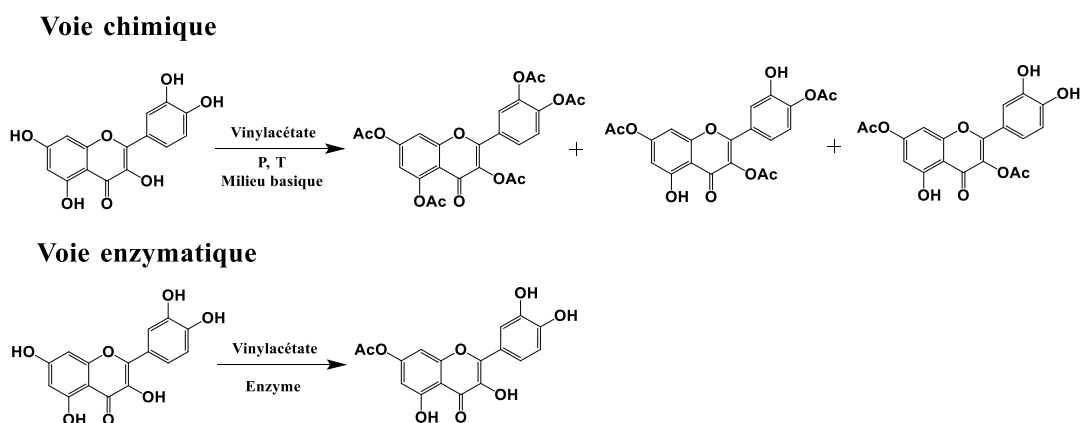


Schéma 6- Schéma représentatif de l'acétylation de la quercétine par voies chimique ou enzymatique

IV-3. Glycosylation

La glycosylation des flavonoïdes se fait généralement via l'action de la glycosyltransférase chez les plantes ou les micro-organismes. Les schémas généraux de glycosylation comprennent le *O*-glycosylation et le *C*-glycosylation.

IV-3-1. *C*-glycosylation

La liaison *C*-glycosidique est une liaison C-C qui lie le carbone anomérique du sucre et le squelette carboné du flavonoïde. Généralement, elle s'effectue sur les carbones C6 et C8 du cycle A. Quelques-uns peuvent être liés à d'autres positions comme le C3 (Yang et al., 2018a).

La plupart des *C*-glycosides naturels sont des flavones, des flavonols, des isoflavones et des chalcones (apigénine et la lutéoline) (Yang et al., 2018a).

Principalement, les *C*-glycosylflavones sont obtenus par des réactions de type Friedel et Crafts ou par la réaction de Knoenigs-Knorr. Toutefois, elles ont de faibles rendements en raison de l'encombrement stérique. Plus récemment, d'autres méthodes ont été proposées :

- *C*-glycosylation par un sucre protégé et activé de la 2',4',6'-trihydroxyacétophénone protégée via une transposition O-C du sucre (Kumazawa et al., 2000).
- Mono- ou di-*C*-glycosylation directe par un sucre libre de la 2',4',6'-trihydroxyacétophénone non protégée en solution aqueuse (Sato et al., 2006).

IV-3-2. O-glycosylation

D'une manière générale, tous les groupements hydroxyles du squelette de flavone ont la capacité de former une liaison avec un sucre (Yang et al., 2018b). Dans la nature, certaines positions sont favorisées comme les 3 et 7-OH (flavones, flavonols et les flavanols) (Yang et al., 2018b). Pour les flavones et flavonols où un groupe carbonyle est placé en C4, il est rare de générer du 5-*O* –glycoside. Cela s'explique par la possibilité d'une liaison hydrogène entre le 5-hydroxyle et le 4-carbonyle (Yang et al., 2018a).

Principalement, les synthèses d' *O*-glycosylflavonoïdes sont des hémisynthèses s'effectuant à partir d'aglycones de flavonoïdes naturels. Ce sont les flavones et les flavonols qui constituent le plus grand nombre de dérivés *O*-glycosides (C. Veitch and J. Grayer, 2008). Citons les *O* -glycosides de kaempférol qui se dénombrent en 458 variants et les *O*-glycosides de quercétine en 363 produits apparentés (C. Veitch and J. Grayer, 2008). Les flavonoïdes *O*-glycosides peuvent être des monosaccharides, disaccharides, trisaccharides et tétrasaccharides, etc... (Yang et al., 2018).

Comme la *C*-glycosylation, les procédures de synthèse reposent habituellement sur des séries de protections et de déprotections régiosélectives, permettant la glycosylation sélective d'un hydroxyle. Comme exemple, des études chimiques ont été réalisées pour obtenir différentes quercétines *O*-glycosylés dont notamment la quercétine 7-*O*-glucoside et la quercétine 7-*O*-glucuronide (Li et al., 2009; Kadjout and Rolando, 2011) (Schéma 7). La quercétine 7-*O*-glucoside est obtenue en 6 étapes avec un rendement global de 22% à partir de la quercétine alors que la quercétine 7-*O*-glucuronide est obtenue en 7 étapes avec un rendement de 18% (Li et al., 2009; Kadjout and Rolando, 2011).

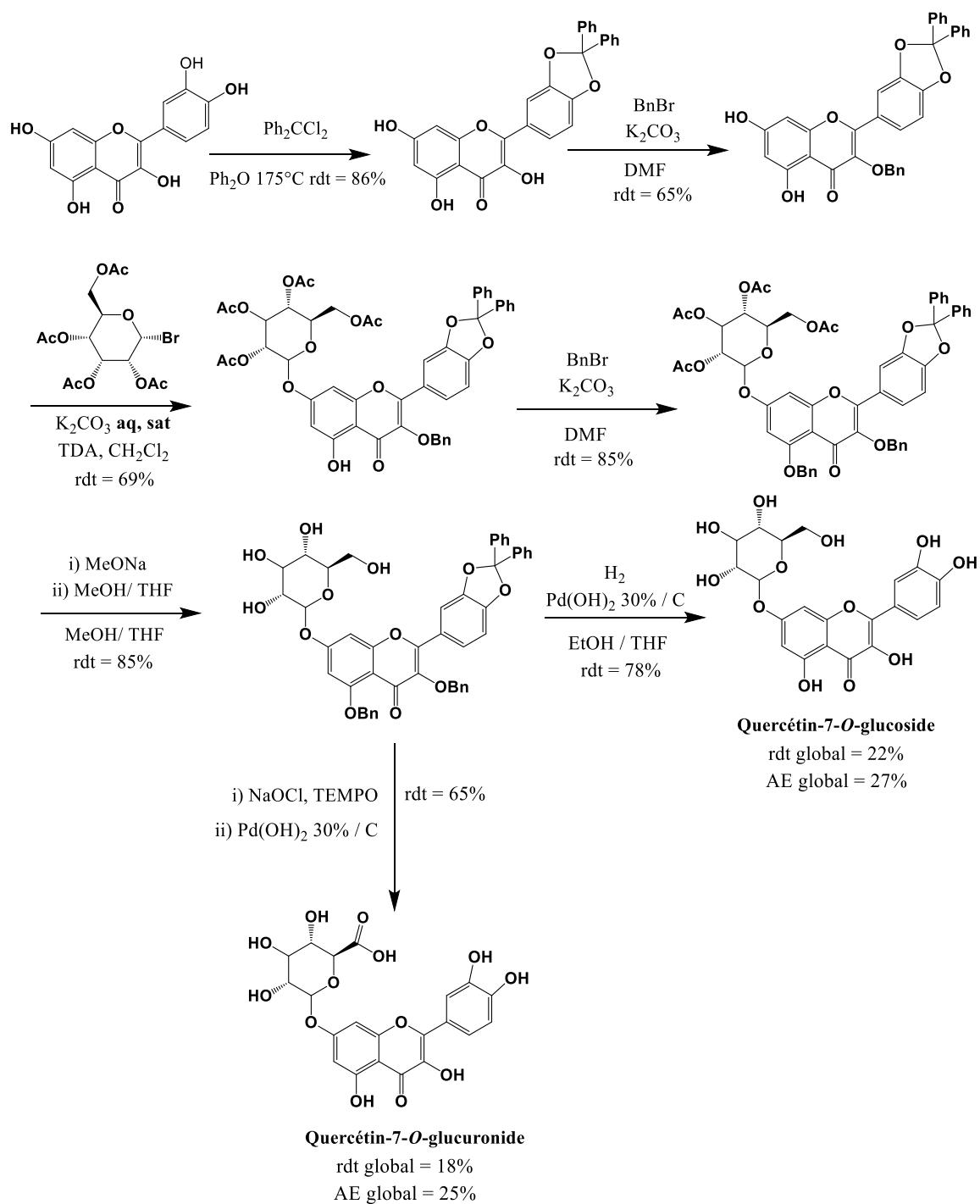


Schéma 7- Synthèse de quercétin-7-O-glucoside et quercétin-7-O-glucuronide

Ainsi, toutes les réactions de modifications structurales décrites ne sont pas toujours simples car elles comportent plusieurs étapes et donnent les produits avec des rendements n'excedant pas les 20%.

Partie II- Résultats et discussion

A. Caractérisation antivirale des plantes médicinales malgaches contre le virus zika et le virus de la dengue

I. Échantillonnage des plantes médicinales malgaches sélectionnées

La première partie de mes travaux est axée sur la valorisation de la flore de Madagascar à travers les caractérisations chimique et antivirale des molécules bioactives issues des plantes médicinales.

Une liste de plantes mentionnées dans le tableau 23 a été établie pour la réalisation de mes travaux. Les 17 plantes ont été collectées dans les parties centrale et occidentale de Madagascar (Tableau 23). Les extractions ont été effectuées par macération à froid dans un solvant polaire (méthanol ou éthanol 80%) et un solvant apolaire (acétate d'éthyle) pendant 72 heures.

Tableau 23- Liste de plantes sélectionnées pour l'étude (lieu de collecte et rendement d'extraction)

Nom botanique	Partie utilisée	Lieu de collecte	Rendement (%)	
			Extrait polaire	Extrait apolaire
<i>Artocarpus heterophylla</i>	Feuilles	Analamanga (Centre)	11,7	2,6
<i>Bidens pilosa</i>	Partie aérienne	Bongolava (Moyen-Ouest)	22,3	3,2
<i>Cassia occidentalis</i>	Feuilles	Bongolava	18,9	2,4
<i>Cajanus cajan</i>	Partie aérienne	Boeny (Ouest)	11,1	6,8
<i>Cajanus indicus</i>	Partie aérienne	Bongolava	11,5	7,7
<i>Cinnamomum camphora</i>	Tiges feuillées	Marché Antananarivo (Centre)	3,4	1,6
<i>Dodonaea madagascariensis</i>	Partie aérienne	Analamanga	Données non présentées ^a	
<i>Furcraea foetida</i>	Chênevottes	Artisans Antananarivo (Centre)	Données non présentées ^b	
<i>Melia azedarach</i>	Feuilles	Analamanga	17,1	1,8
<i>Morinda citrifolia</i>	Feuilles	Bongolava	28,3	1,8
<i>Musa paradisiaca</i>	Bourgeon mâle	Bongolava	19,8	2,6
<i>Ocimum canum</i>	Feuilles	Bongolava	10,1	5,2
<i>Psiadia altissima</i>	Feuilles	Analamanga	34,2	17,6
<i>Pentopetia sp</i>	Tiges feuillées	Bongolava	10	5,1
<i>Stenocline ericoides</i>	Feuilles	Vakinankaratra (Centre)	9,2 ^c	25,3 ^c
<i>Stenocline inuloides</i>	Partie aérienne	Vakinankaratra	8,3 ^c	22,9 ^c
<i>Waltheria indica</i>	Partie aérienne	Boeny (Ouest)	10,7	1,7

^a Extraction réalisée par CNRE ^b Extraction réalisée par Tiana H. Randriamamonjy ^c Extraction réalisée par Maminiaina A Andrianaivalonirina

Le tableau 23 indique les rendements obtenus pour chacune des plantes étudiées. Ils sont calculés par rapport à la masse du matériel végétal sec. On constate que les extraits polaires possèdent un meilleur rendement que les extraits apolaires sauf pour les deux espèces de *Stenocline* (Tableau 23). Les meilleurs rendements ont été observés avec *P. altissima* (extrait polaire : 34,2% ; extrait apolaire : 17,6%). Au contraire, les extractions de *C.*

camphora dans l'éthanol 80% comme dans l'acétate d'éthyle ont de très faible production (3,4 et 1,6% respectivement).

I-1. Criblage antiviral des plantes médicinales malgaches sélectionnées

Pour évaluer l'activité antivirale des extraits, nous avons utilisé le virus zika comme un modèle de flavivirus qui se manipule dans un laboratoire de niveau de sécurité 2 (BSL2). Ainsi, un clone moléculaire de ZIKV exprimant la GFP (ZIKV_{GFP}) dérivé de la souche ancestrale ZIKV-MR766 a été utilisé (Gadea et al., 2016). Les cellules épithéliales humaines A549, qui sont permissives au virus zika (Frumence et al., 2016), ont été infectées par ZIKV_{GFP} à une multiplicité d'infection (MOI) de 2 puis traitées simultanément avec les différents extraits de plantes à une concentration égale à 100 µg. mL⁻¹. Les cellules sont incubées pendant 24 heures à 37°C puis la quantification du taux de fluorescence dans les cellules en présence ou en absence des extraits de plantes a été analysé par cytométrie de flux.

Le criblage antiviral a permis d'identifier 5 plantes actives contre ZIKV : *Stenocline ericoides*, *Stenocline inuloides*, *Melia azedarach*, *Pentopetia sp* et *Waltheria indica* (Figure 19).

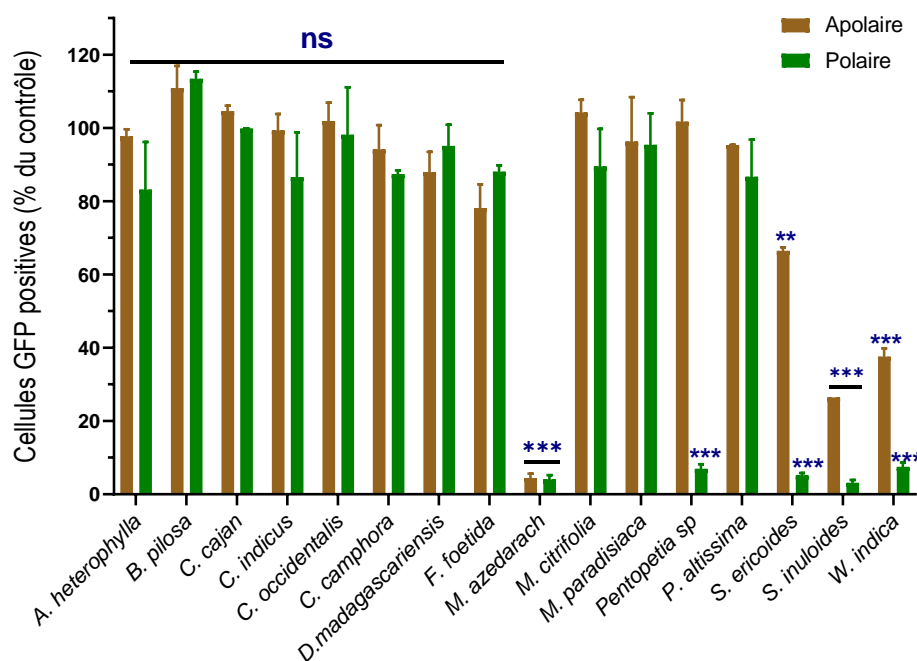


Figure 19- Criblage antiviral des extraits polaires et apolaires des plantes médicinales malgaches sélectionnées. Les cellules A549 ont été infectées par ZIKV_{GFP} à une MOI =2 et traitées simultanément avec les extraits de plantes (100 µg. mL⁻¹) puis incubées pendant 24 heures. Le pourcentage de cellules exprimant la fluorescence de GFP est défini par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM de trois expériences indépendantes (n=3) et en pourcentage relatif du contrôle infecté non traité par un extrait. Des analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'une analyse ANOVA unidirectionnelle et du test de Dunnett pour des comparaisons multiples (**p<0,01 ; ***p<0,001 ; ****p<0,0001 ; ns = non significatif).

Il est intéressant de noter qu'ils s'agissent des premiers travaux réalisés sur l'activité antivirale des plantes malgaches contre un flavivirus comme ZIKV. Pour *Melia azedarach*, les deux extraits (polaire + apolaire) présentent une activité antivirale contre ZIKV avec une diminution de plus de 80% de la fluorescence. Seul l'extrait polaire de *Pentopetia sp* possède un effet avec une inhibition de 80% du taux de la fluorescence. Concernant les deux espèces de *Stenocline*, les extraits polaires rapportent un effet antiviral plus important (80% d'inhibition) par rapport aux extraits apolaires (30 à 50% d'inhibition) (Figure 19). Les mêmes résultats ont été observés avec *W. indica* (Figure 19). Ces observations joignent l'effet de l'extrait méthanolique des pousses de *W. indica* contre le HIV-1 et 2 (Maregesi et al., 2010) et relatent le potentiel antiviral de cette plante.

De nouvelles récoltes et extractions avec de grandes quantités d'échantillons ont été réalisées sur les 5 plantes actives contre ZIKV. L'extrait présentant la meilleure activité a été choisi pour chaque plante : l'extrait apolaire (acétate d'éthyle) pour *M. azedarach* et l'extrait polaire (méthanol ou éthanol) pour les quatre autres. Les résultats de nouvelles extractions sont illustrés dans le tableau 24.

Tableau 24- Paramètres et rendement des extractions pour les 5 plantes anti-ZIKV

Nom botanique	Quantité de MV (g)	Solvant de macération	Temps d'extraction (h)	Rendement (%MV)
<i>M. azedarach</i>	850	Acétate d'éthyle	72 heures × 4 lavages	13,1%
<i>Pentopetia sp</i>	300	Ethanol 80%	72 heures × 5 lavages	19,4%
<i>S. ericoides</i>	350	Méthanol	72 heures × 4 lavages	9,2%
<i>S. inuloides</i>	350	Méthanol	72 heures × 4 lavages	8,3%
<i>W. indica</i>	156	Ethanol 80%	72 heures × 6 lavages	15,9%

MV Matériel végétal, %MV pourcentage par rapport au MV

Les poudres de plantes ont été macérées à froid dans le solvant d'extraction pendant 72 heures. Plusieurs lavages successifs ont été nécessaires pour épuiser totalement les résidus de matière végétale. Les rendements calculés par rapport à la masse des poudres du matériel végétal sec sont compris entre 9,2 à 15,9 % (Tableau 24). Les rendements les plus élevés ont été obtenus avec les macérations à l'éthanol 80% comme les cas de *Pentopetia sp* (19,4%) et de *W. indica* (15,9%). Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que l'éthanol 80% (20/80 eau/éthanol), étant un mélange hydroalcoolique, peut récupérer la majorité des molécules contenues (polaires et/ou apolaires) dans une plante. J'ai pris le soin de récolter les parties de plantes fraîches toujours au même endroit afin de minimiser les variabilités chimiques dues aux différents facteurs (environnemental, pédologique...). Mais avec le contrainte « temps » l'approvisionnement a été effectué à différentes périodes de l'année.

I-2. Caractérisation de l'activité antivirale et de la cytotoxicité des plantes actives

L'évaluation de la cytotoxicité des extraits de plantes actives a été menée par l'intermédiaire d'un test MTT permettant de mesurer l'activité mitochondriale. La concentration cytotoxique provoquant la mortalité de 50% des cellules (CC₅₀) et la concentration maximale non cytotoxique à 90% de viabilité cellulaire (MNTC) ont été déterminées graphiquement. La MNTC est ensuite utilisée pour confirmer les activités antivirales précédemment trouvées (Figure 20, Tableau 25).

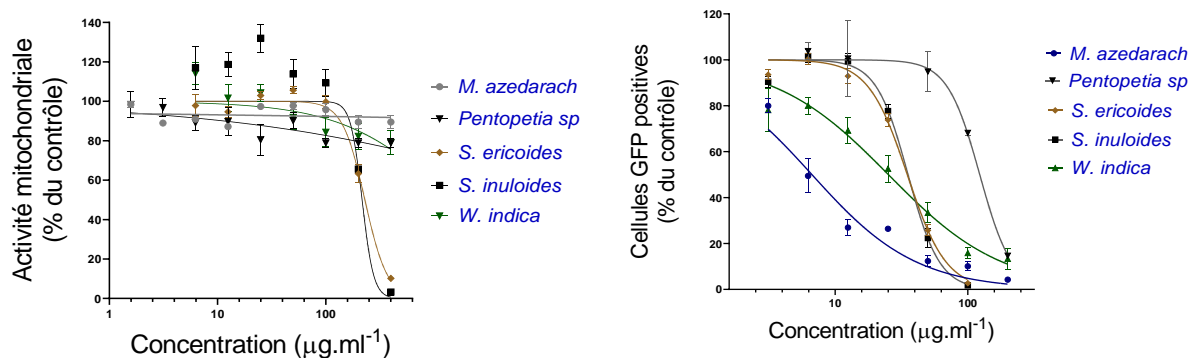


Figure 20- Evaluation de la cytotoxicité et de l'activité antivirale des extraits des plantes actives contre ZIKV (A) Les cellules A549 ont été incubées avec les différentes concentrations des extraits de plantes pendant 24h. La viabilité cellulaire a été déterminée à l'aide de l'activité métabolique au moyen d'un essai de MTT. (B) Les cellules A549 ont été infectées par ZIKV_{GFP} (MOI = 2) et traitées avec les différentes concentrations des extraits pendant 24h. Le pourcentage de cellules GFP-positives a été déterminé par cytométrie en flux. Les CC₅₀ et les CI₅₀ ont été déterminées par des courbes de régression non linéaire. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM des trois expériences indépendantes (n=3)

Tableau 25- Evaluation de la cytotoxicité et de l'activité antivirale des extraits des plantes actives contre ZIKV

Extrait	CC ₅₀ (µg. mL ⁻¹) ^a	CI ₅₀ (µg. mL ⁻¹) ^b	SI ^c
<i>M. azedarach</i>	>200 ± 5	2,31 ± 1,52	>43,3
<i>Pentopetia sp</i>	>200 ± 8	126,5 ± 9,8	>0,8
<i>S. ericoides</i>	229,8 ± 6,5	67,13 ± 9,6	3,4
<i>S. inuloides</i>	224,9 ± 20,3	70,83 ± 8,9	3,1
<i>W. indica</i>	>400 ± 15	25,19 ± 17,3	>15,9

Les CC₅₀ et les CI₅₀ ont été déterminées par des courbes de régression non linéaire. ^a Concentration cytotoxique à 50%, ^b Concentration inhibitrice de l'infection de 50%; ^c indice de sélectivité (CC₅₀/CI₅₀)

Les résultats observés ont montré que les extraits présentent une faible cytotoxicité sur les cellules A549 avec une valeur de CC₅₀ > 200 µg. mL⁻¹ (Figure 20, Tableau 25). En comparant avec les études de cytotoxicité des extraits de *M. azedarach* entreprises par Jafari *et.al* sur les cellules A549 (CC₅₀ > 650 µg. mL⁻¹), les résultats observés montrent un effet plus nocif avec un CC₅₀ > 200 µg. mL⁻¹ (Tableau 25) (Jafari *et al.*, 2013). Cette différence pourrait être liée aux divers paramètres affectant la composition chimique des extraits d'une même plante : le lieu de collecte (Madagascar et Bandar Abbas), la méthode d'extraction ainsi que le solvant d'extraction (acétate d'éthyle et méthanol).

A ma connaissance, aucune étude sur la cytotoxicité des espèces de *Stenocline* n'a été entamée. Ici, les données observées indiquent que ces plantes n'influencent pas l'activité mitochondriale des cellules A549 (Figure 20, Tableau 25).

Quant à *W. indica*, il s'agit de l'extrait le moins cytotoxique (CC₅₀ > 400 µg. mL⁻¹) (Tableau 25). Une évaluation de la cytotoxicité de l'extrait de racines de *W. indica* sur des cellules

Vero a montré une activité élevée par rapport à celle observée sur les cellules A549 ($CC_{50} > 100 \mu\text{g. mL}^{-1}$) (Tabidi et al., 2019).

Concernant le potentiel antiviral, l'extrait de *M. azedarach* est le plus efficace parce qu'il possède une activité très importante avec une CI_{50} de l'ordre de $2,31 \pm 1,52 \mu\text{g. mL}^{-1}$ (Tableau 25). Cette propriété antivirale a déjà été mise en évidence contre les virus junin (Castilla et al., 1998), pichinde, tacaribe, sindbis, stomatite vésiculeuse (VSV), herpès simplex (HSV) (Kim et al., 1999). Les limonoïdes isolés de l'extrait méthanolique des fruits, le 3- α -tigloyl-mélianol et la mélianone, ont montré également une propriété antivirale (CI_{50} de l'ordre de 3 à $11 \mu\text{M}$) contre trois agents pathogènes humains appartenant au genre *Flavivirus* (WNO, DENV-2 et YFV) (Sanna et al., 2015).

Par contre, l'activité antivirale de *Pentopetia sp* a disparu après de nouvelles collectes et extractions de plante (Tableau 25). Cette perte d'activité peut s'expliquer par la différence de la période de récolte ainsi que le changement climatique dans la région. Les paramètres d'extraction en termes de pureté du solvant, la température de bain d'évaporation, la conservation de l'extrait sec ou la solution stock sont également à vérifier.

Les deux plantes *Stenocline* sont utilisées en médecine traditionnelle en décoction ou en cataplasme dans le traitement des maladies de la peau, des vertiges, de la tension artérielle et des maladies vénériennes (Humbert, 1967). Ces espèces végétales n'ont jamais fait l'objet d'étude chimique ou biologique. Néanmoins, leur effet antiviral contre ZIKV reste modéré avec une valeur de CI_{50} avoisinant les $70 \pm 9 \mu\text{g. mL}^{-1}$ (Tableau 25).

W. indica possède également une activité anti-ZIKV intéressante avec une CI_{50} de $25,19 \pm 17,3 \mu\text{g. mL}^{-1}$ (Tableau 25). Il s'agit des premiers travaux sur les propriétés anti-flavivirus de la plante, d'autres études ont indiqué son effet contre HIV-1 ($CI_{50} = 36 \mu\text{g. mL}^{-1}$) et HIV-2 ($CI_{50} > 125 \mu\text{g. mL}^{-1}$) (Maregesi et al., 2010).

En résumé, parmi les 17 plantes malgaches sélectionnées, 5 plantes ont montré une activité anti-ZIKV, *M. azedarach*, *Pentopetia sp*, *S. ericoides*, *S. inuloides* et *W. indica*. Suite à des nouvelles collectes et extractions, ces plantes ont présenté les mêmes résultats précédents sauf *Pentopetia sp* dont l'activité a été perdue. Malgré que *M. azedarach* possède un effet antiviral intéressant ($SI > 43,3$), sa composition chimique et son potentiel pharmacologique sont largement étudiés. Pour la suite des travaux, il a été décidé d'investiguer uniquement sur les 3 espèces de plantes *S. ericoides*, *S. inuloides* et *W. indica*.

II. Evaluation de l'activité antivirale de *S. ericoides*, *S. inuloides* et *W. indica* contre la souche épidémique ZIKV et des isolats cliniques de la dengue

II-1. Activité antivirale des extraits de plantes actives contre la souche épidémique ZIKV

Les résultats précédents ont été obtenus avec un clone moléculaire ZIKV_{GFP} issu de la souche ancestrale africaine ZIKV-MR766 qui n'a pas provoqué des épidémies. On a voulu confirmer l'effet antiviral des plantes contre la souche contemporaine épidémique brésilienne (ZIKV_{BR15}) (Figure 21).

D'abord, les cellules A549 ont été infectées avec ZIKV_{BR15} à MOI de 2 en présence de différentes concentrations non cytotoxiques des extraits de plantes. La capacité des extraits à réduire la croissance virale du ZIKV_{BR15} a été estimée via un titrage des particules infectieuses relarguées dans le surnageant par la technique de plage de lyse (PFU). Un effet dose-dépendant a été observé pour les 3 extraits de plantes (Figure 21). À la dose MNTC (100 µg. mL⁻¹), *S. ericoides* et *S. inuloides* ont réduit la production virale de 1,5 log (Figure 21). A la même concentration, *W. indica* diminue l'infectivité résiduelle de 3-log et se trouve plus active contre ZIKV_{BR15} par rapport aux deux autres extraits (Figure 21). Ces résultats affirment que la souche épidémique ZIKV_{BR15} est aussi sensible que la souche ancestrale suite au traitement par les trois extraits de plantes actives.

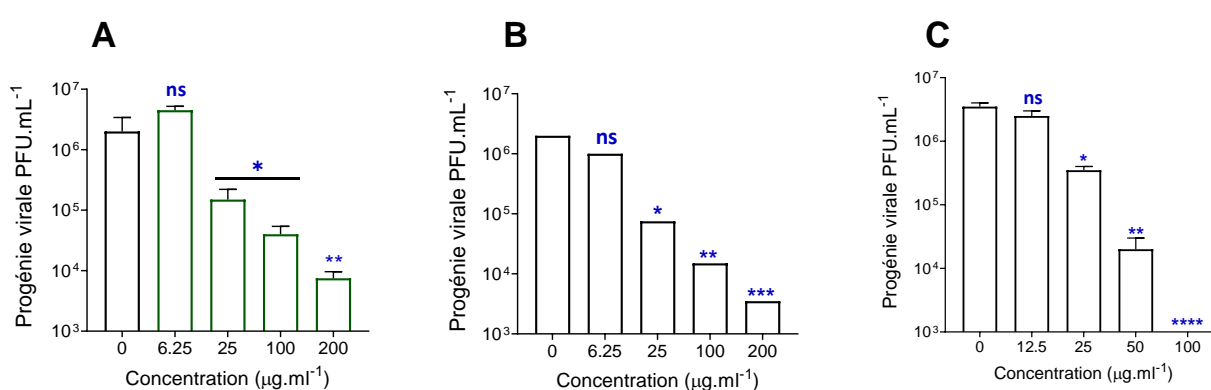


Figure 21- Activité antivirale des extraits de *S. ericoides*, *S. inuloides* et *W. indica* contre la souche épidémique ZIKV_{BR15}

Les cellules A549 ont été infectées (MOI = 2) et incubées continuellement avec différentes concentrations des extraits (A) *S. ericoides*, (B) *S. inuloides* et (C) *W. indica*. La production de la progénie de ZIKV a été quantifiée par titrage de plage lyse. Les données représentent en moyenne ± SEM des deux expériences indépendantes (n=2) et en pourcentage relatif du contrôle infecté non traité par un extrait. Des analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'une analyse ANOVA unidirectionnelle et du test de Dunnett pour des comparaisons multiples (*p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 ; ****p<0,0001 ; ns = non significatif)

II-2. Activité antivirale des extraits de plantes actives contre le virus de la dengue

II-2-1. Activité antivirale de *S. ericoides* et *S. inuloides* contre le sérotype DENV-

2

La propriété antivirale de *S. ericoides* et *S. inuloides* a été évaluée contre le virus de la dengue. Pour ce faire, la souche clinique DENV-2, isolée d'un patient lors de l'épidémie de dengue à la Réunion en 2018, a été utilisée pour infecter les cellules humaines hépatiques Huh7.5. Tout d'abord, l'évaluation de l'effet cytotoxique des deux extraits de *Stenocline* sur les cellules Huh7.5 a été réalisée à l'aide du test MTT après 72h de traitement (Figure 22). Les données ont montré que les extraits présentent des courbes dose-réponse approximativement similaires et l'activité mitochondriale commence à diminuer à partir de 100 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. Pour déterminer l'activité antivirale, les cellules Huh7.5 ont été infectées par DENV-2 pendant 48h à MOI de 1 en présence de différentes concentrations non cytotoxiques des extraits de *Stenocline*. Les résultats ont révélé que les deux *Stenocline* exercent un effet antiviral dose-dépendant. À une concentration égale à 100 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, le nombre de cellules infectées a diminué jusqu'à 80% (Figure 22).

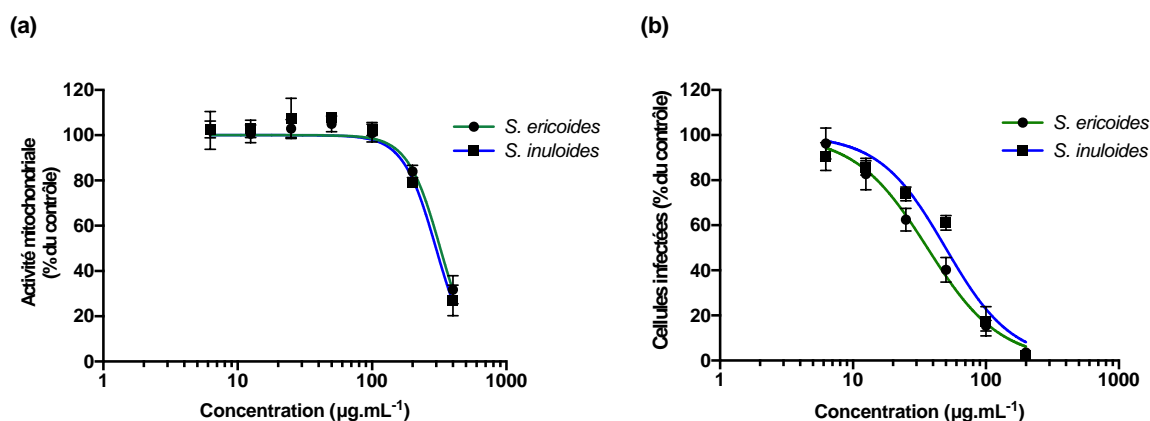


Figure 22- Activité antivirale des extraits de *S. ericoides* et *S. inuloides* contre DENV-2.

(a) Les cellules Huh7.5 ont été traitées avec diverses concentrations des extraits (6,25 à 400 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) pendant 72 h. L'activité mitochondriale a été évaluée au moyen d'un essai MTT. (b) Les cellules Huh7.5 ont été infectées par le DENV-2 (MOI = 1) et traitées simultanément avec différentes concentrations (6,25 à 200 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) d'extraits de plantes pendant 48 h. Le pourcentage de cellules infectées par Huh7.5 a été déterminé par cytométrie en flux à l'aide de l'anti-flavivirus E mAb 4G2. Les données représentent en moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes ($n = 3$) et en pourcentage relatif du contrôle infecté non traité par un extrait

Pour conclure, *S. ericoides* et *S. inuloides* présentent une activité antivirale contre les deux souches africaine et asiatique de ZIKV ainsi que le sérotype DENV-2. Plusieurs plantes

indigènes de la région Sud-Ouest de l’Océan Indien disposent les mêmes caractéristiques comme le cas de *A. theiformis*, *D. apetalum* et *S. baicalensis* (Zandi et al., 2013; Clain et al., 2018; Haddad et al., 2019a).

II-2-2. Activité antivirale de W. indica contre les 4 sérotypes de la dengue

L’activité antivirale de *W. indica* contre le virus de la dengue a été également évaluée. Dans cette partie, les tests ont été menés en collaboration avec l’Institut Fiocruz du Brésil sur 4 isolats cliniques de la dengue représentant les 4 sérotypes. Avant de réaliser les tests antiviraux, l’évaluation de la cytotoxicité de *W. indica* a été d’abord effectuée sur les cellules Huh7.5, une lignée cellulaire hépatique très permissive et utilisée fréquemment dans la recherche sur DENV. L’activité mitochondriale des cellules Huh7.5 a été mesurée en présence de l’extrait de *W. indica* par le test MTT. Les cellules ont été incubées pendant 72 heures avec les différentes concentrations (6,25 à 200 $\mu\text{g. mL}^{-1}$). La dose maximale non cytotoxique retrouvée est supérieure à 100 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ (Tableau 26). Cela confirme qu’à 72 h de traitement, l’extrait de *W. indica* n’induit pas une cytotoxicité sur les cellules Huh7.5.

Ensuite, les cellules HuH7.5 ont été infectées par les 4 sérotypes de la dengue et traitées simultanément avec les différentes concentrations de l’extrait pendant 72 heures à 37°C. Après incubation, on réalise une immunofluorescence sur les cellules avec un anticorps dirigé contre la protéine E. *W. indica* présente une propriété antivirale contre les 4 sérotypes de DENV avec une inhibition plus de 85% à 100 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ (Figure 23). Les sérotypes DENV-1 et DENV-4 sont les plus sensibles en comparant aux autres, leur nombre de cellules E-positives respectif a largement diminué (Figure 23). En outre, leur concentration inhibitrice à 50% donnent une valeur de 25,5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ pour DENV-1 et 20,12 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ pour DENV-4. Ces données sont semblables à ceux observés précédemment avec ZIKV. En confrontant avec les autres plantes anti-DENV, *W. indica* présente un meilleur profil contre le sérotype DENV-1 par rapport au *D. apetalum* ($\text{CI}_{50} = 96,35 \mu\text{g. mL}^{-1}$) sur les mêmes cellules Huh 7.5 (Haddad et al., 2019a). Ensemble, ces données approuvent la capacité de cette plante à inhiber l’infection virale par le ZIKV et DENV à des concentrations non-cytotoxiques.

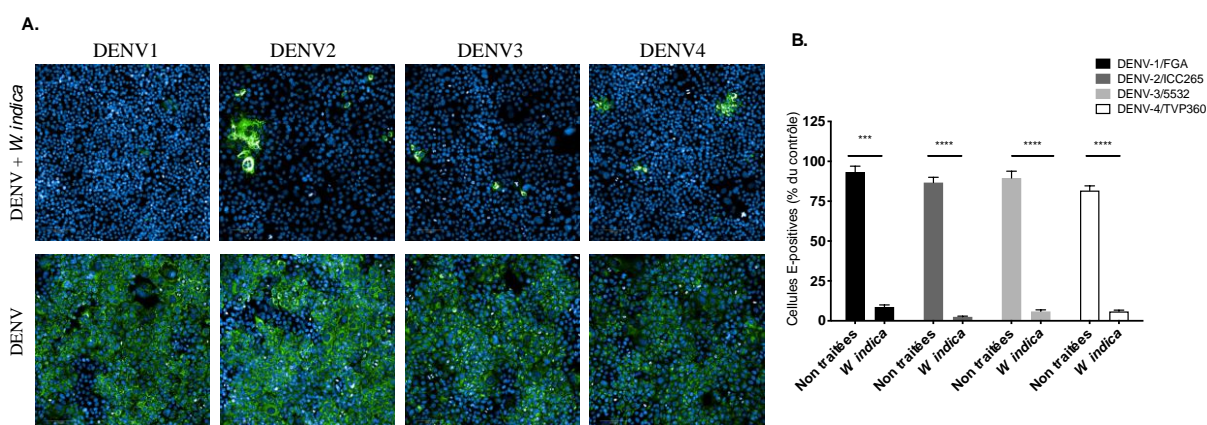


Figure 23- Activité antivirale de l'extrait de *W. indica* contre les 4 sérotypes du virus de la dengue.

(A) Les cellules HuH7.5 ont été infectées pendant 72 h par DENV en présence de différentes concentrations de *W. indica*. Le pourcentage de cellules E positives a été évalué à l'aide du Operetta High-Content Imaging System (PerkinElmer). (B) Le nombre de cellules E positives par immunofluorescence a été quantifié à partir du test effectué en A. Les données représentent la moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes ($n = 3$). Un ANOVA unidirectionnel et le test de Dunnett pour les comparaisons multiples ont été utilisés pour l'analyse statistique (***) $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

Tableau 26- Activité antivirale de *W. indica* contre les 4 sérotypes du virus de la dengue

Sérotipe	CC ₅₀ ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)	CI ₅₀ ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)	SI
DENV-1	126,4	25,5	4,9
DENV-2	126,4	47,5	2,7
DENV-3	126,4	30,15	4,2
DENV-4	126,4	20,12	6,4

Les CC₅₀ et les IC₅₀ ont été déterminées par des courbes de régression non linéaire. ^a Concentration cytotoxique à 50%, ^b Concentration inhibitrice de l'infection de 50%; ^c indice de sélectivité (CC₅₀/CI₅₀)

II-3. Mécanisme d'action antivirale de *S. ericoides*, *S. inuloides* et *W. indica*

Pour exploiter l'activité antivirale de ces 3 plantes, il est intéressant d'identifier leur mécanisme d'action. Pour cela, divers protocoles ont été mis en place (Figure 24A) pour cerner les différentes étapes ciblées par chaque extrait. L'extrait de *Pentopetia sp* ($100 \mu\text{g. mL}^{-1}$) a été utilisé comme contrôle négatif. Le cycle viral du ZIKV dure en moyenne 24 heures. L'étape de l'entrée se déroule pendant les deux premières heures englobant l'attachement, l'internalisation et la fusion. L'étape de réplication renferme les 22 heures restantes nécessaires au virus pour accomplir la synthèse de son ARN, la réplication, la maturation et l'exocytose des premiers virions infectieux. Durant le protocole « tout au long », les cellules sont traitées par les différents extraits tout au long du cycle viral (Figure 24A) avec la concentration MNTC de chaque extrait : *S. ericoides* ($100 \mu\text{g. mL}^{-1}$), *S. inuloides* ($100 \mu\text{g. mL}^{-1}$) et *W. indica* ($100 \mu\text{g. mL}^{-1}$). Lorsque les extraits de plantes (MNTC) sont ajoutés uniquement pendant la phase d'adsorption (entrée), on a constaté une inhibition significative de 60 à 80% du pourcentage de la fluorescence, pour toutes les plantes. Ces résultats sont

similaires de ceux observés durant le protocole « tout au long » (Figure 24B). Pour le scénario « réplication », *S. ericoides* et *S. inuloides* n'ont montré aucun effet significatif tandis qu'une inhibition de 30% est observée avec *W. indica* (Figure 24B). Ces données montrent que l'inhibition de l'infection médiée par les extraits de *Stenocline* est associée à une incapacité du ZIKV à lancer un cycle infectieux productif dans les cellules hôtes A549. Par contre, le mécanisme d'action antiviral de *W. indica* cible l'entrée du virus dans les cellules mais également la réplication virale (Figure 24B). Il se peut que cette plante renferme plusieurs molécules bioactives avec des mécanismes d'action antivirale différents.

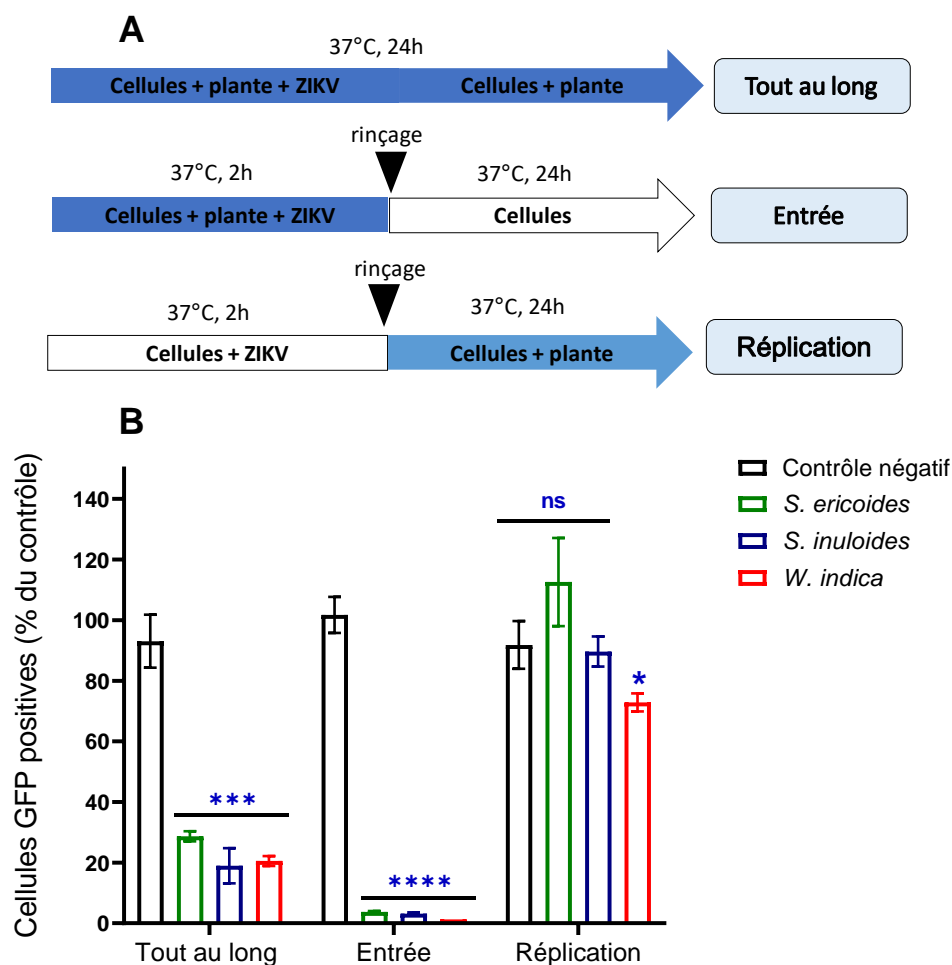


Figure 24- Mécanisme d'action antivirale des extraits de *S. ericoides*, *S. inuloides* et *W. indica*

Les cellules A549 ont été infectées par ZIKV_{GFP} (MOI =2). La représentation schématique des différents protocoles d'addition des extraits lors de l'infection sont représentés en (A). La flèche bleue indique la présence des extraits de plante. (B) Analyse par cytométrie en flux 24h post infection de l'expression de la protéine GFP, sous les conditions expérimentales montrées en A. L'extrait du *Pentopetia sp* (100 µg. mL⁻¹) a été utilisé comme contrôle négatif. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM de trois expériences indépendantes (n=3). Des analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'une analyse ANOVA unidirectionnelle et du test de Dunnett pour des comparaisons multiples (***) p < 0,001; ****) p < 0,0001 ; n.s = non significatif)

II-3-1. Activité directe de S. ericoides et W. indica au niveau de la particule virale

Les résultats ont montré que les extraits agissent au niveau de l'entrée virale. Afin de vérifier si ces extraits agissent directement sur la particule virale en inhibant son infectiosité, un test d'inactivation a été mené. L'objectif du test d'inactivation virale est de détecter si un échantillon présente un effet virucide ou virostatique. Dans ce cas, ZIKV_{GFP} a été pré-incubé 1h à 37°C avec les extraits de plantes à tester à leur MNTC. Le mélange est ensuite dilué 50 fois pour effectuer l'infection à une dose sous thérapeutique afin d'assurer l'action spécifique sur la particule virale. La phospholipase A2 (PLA2), connue pour son activité virucide contre plusieurs virus enveloppés, a été utilisée comme contrôle positif (10 µM) (Muller et al., 2014). L'extrait de *Pentopetia sp* (100 µg. mL⁻¹) a été utilisé en tant que contrôle négatif (Figure 25). Les résultats ont montré une réduction de plus de 80% de la fluorescence par rapport au contrôle infecté et non traité, avec les extraits de *S. ericoides* et *W. indica*. Cependant l'extrait de *S. inuloides* n'a pas montré un effet d'inactivation de la particule virale (Figure 25). Ces données montrent que le mécanisme d'action de *S. ericoides* diffère de celui de *S. inuloides*. Les deux espèces inhibent l'entrée virale d'une manière différente. En effet, *S. ericoides* exerce un effet virucide ou virostatique neutralisant ainsi l'infectiosité du ZIKV au contraire de *S. inuloides* qui interfère avec l'étape d'entrée virale et non pas avec la particule virale directement. L'action de *S. ericoides et W. indica* à agir directement au niveau de la particule virale les regroupe dans la catégorie des antiviraux virucides/virostatiques comme l'EGCG, le PLA2 et également les extraits d'*A. theiformis*, *P. mauritianum*, *S. baicalensis*, etc...(Zandi et al., 2013; Muller et al., 2014; Clain et al., 2018, 2019).

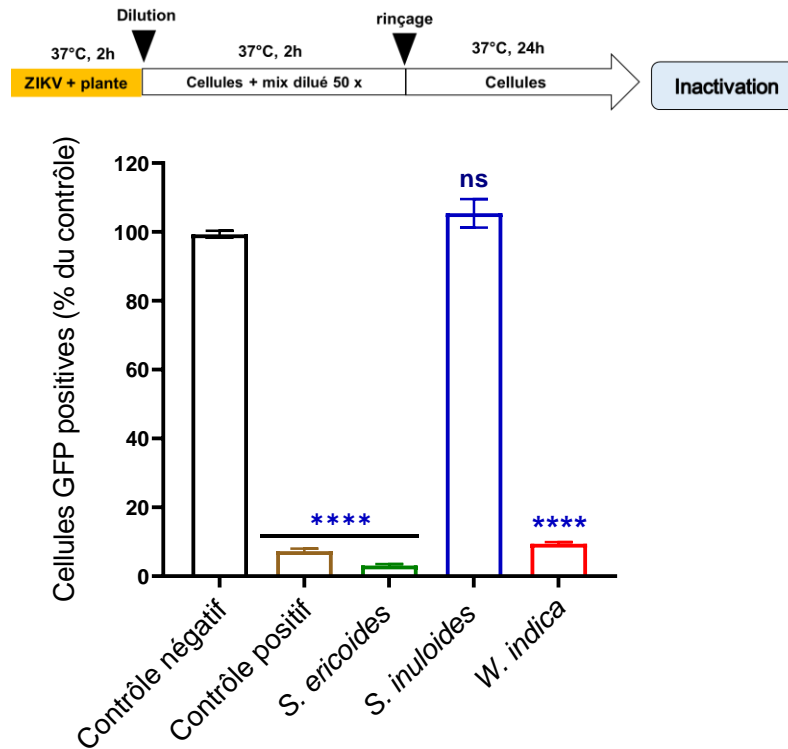


Figure 25- Inactivation virale de ZIKV par les extraits de *S. ericoïdes* et *W. indica*.

Les cellules A549 ont été infectées par ZIKV_{GFP} pré-incubé pendant 1 h à 37 °C avec la concentration MNTC *S. ericoïdes* (100 µg. mL⁻¹), *S. inuloïdes* (100 µg. mL⁻¹), *W. indica* (100 µg. mL⁻¹), *Pentopetia sp* (100 µg. mL⁻¹) en tant que contrôle négatif et PLA2 (10 µM) en tant que contrôle positif. Une analyse de fluorescence par cytométrie de flux a été effectuée 24 heures après l'infection. Les résultats montrés sont en moyennes ± SEM de trois expériences indépendantes (n = 3) et sont exprimés comme la valeur relative par rapport aux cellules infectées non traitées. Des analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'une analyse ANOVA unidirectionnelle et du test de Dunnett pour des comparaisons multiples (**** p < 0,0001 ; ns = non significatif)

II-3-2. Inhibition de l'attachement viral par *S. ericoïdes*, *S. inuloïdes* et *W. indica*

Les résultats précédents ont indiqué que les extraits de *S. ericoïdes*, *S. inuloïdes* et *W. indica* agissent au niveau des phases précoces du cycle viral (entrée). On a pu noter également l'aptitude de *S. ericoïdes* et *W. indica* à neutraliser l'infectiosité du ZIKV au contraire de *S. inuloïdes*. Afin d'identifier l'étape de l'entrée virale ciblée par *S. inuloïdes*, le test « attachement » a été réalisé. Il s'agit de la première étape de l'entrée du virus dans les cellules hôtes. Le protocole consiste à infecter les cellules par ZIKV en présence des extraits avec leur MNTC pendant 1h à 4°C (Figure 26). Cela va permettre aux particules virales de s'attacher aux récepteurs cellulaires en présence des extraits tout en bloquant l'étape suivante qui consiste à l'internalisation du virus. Les extraits ont été par la suite enlevés, les cellules ont été lavés et incubées à 37°C pour déclencher l'étape internalisation et continuer le cycle viral normal. (Figure 26). Les résultats ont mis en évidence une inhibition de 80% de la

fluorescence observée par cytométrie en flux avec *S. ericoides* (Figure 26). L'effet observé durant l'étape attachement montre 40% d'inhibition pour l'extrait de *W. indica* (Figure 26). Dans ce contexte, il se peut que le fait d'impacter directement le virus infectieux a permis aux deux extraits de plantes de bloquer l'attachement viral. Il est de même possible que les extraits renferment plusieurs molécules bioactives pourvues de caractéristiques différentes. Cette deuxième théorie est surtout probable dans le cas de *W. indica* dont le pourcentage d'inhibition constaté est différent entre les deux protocoles (activité virucide et attachement viral). Pour *S. inuloides*, la diminution de fluorescence par rapport aux cellules infectées non traitées est de 50 % (Figure 26) indiquant son mécanisme d'action ciblant l'étape attachement du virus sur les récepteurs cellulaires.

En conclusion, *S. ericoides*, *S. inuloides* et *W. indica* inhibent l'attachement du ZIKV à la surface des membranes cellulaires comme le cas de l'EGCG (Carneiro et.al, 2016), la curcumine (Mounce et.al, 2017) ainsi que les extraits de plantes indigènes de La Réunion (Clain et al., 2018, 2019; Haddad et al., 2019a). C'est également le cas de *S. baicalensis* et de *Phyllanthus sp* (Lee et al., 2013; Zandi et al., 2013).

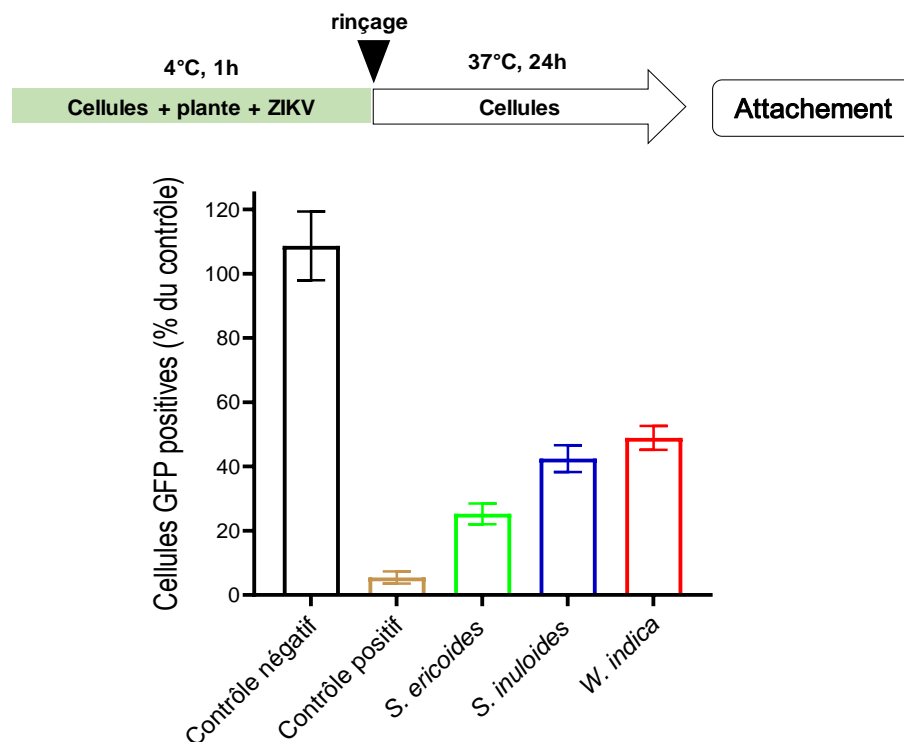


Figure 26- Inhibition de l'attachement de ZIKV par les extraits de *S. ericoides*, *S. inuloides* et *W. indica*. Les cellules A549 ont été infectées par le ZIKV_{GFP} (MOI = 2) pendant 1 h à 4 °C en présence de *S. ericoides* (100 µg. mL⁻¹), *S. inuloides* (100 µg. mL⁻¹), *W. indica* (100 µg. mL⁻¹), *Pentopetia sp* (100 µg. mL⁻¹) en tant que contrôle négatif et PLA2 (10 µM) en tant que contrôle positif. Puis la température a été ramenée à 37 °C en l'absence des extraits. Une analyse cytométrique de flux de fluorescence GFP a été effectuée 24 heures après l'infection. Les résultats montrés sont en moyennes ± SEM de trois expériences indépendantes (n = 3) et sont exprimés comme la valeur relative par rapport aux cellules

infectées non traitées. Des analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'une analyse ANOVA unidirectionnelle et du test de Dunnett pour des comparaisons multiples (***) $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; n.s = non significatif)

III. Évaluation de la toxicité *in vivo* de *S. ericoides* et *S. inuloides* dans un modèle de poisson zèbre

Afin d'évaluer l'innocuité de la dose antivirale des deux *Stenocline in vivo*, une étude de toxicité chez le poisson-zèbre comme modèle physiologique a été effectuée. Le poisson zèbre partage une homologie génomique élevée avec l'homme (>70%) ainsi que de nombreux processus physiologiques, ce qui en fait un modèle intéressant pour les tests de toxicité et le développement de médicaments (Colwill and Creton, 2011; Howe et al., 2013; MacRae and Peterson, 2015).

Le test consiste à effectuer une injection intrapéritonéale des extraits (0,1 mg. g⁻¹ de poids corporel) pour évaluer leur toxicité aiguë potentielle. Il s'agit de la dose correspondante à la concentration maximale non toxique estimée durant la cytotoxicité *in vitro*. Pour le contrôle de l'expérience, on a injecté une solution qui contient du tampon phosphate saline (PBS) avec 0,1% DMSO (quantité équivalent présente dans l'extrait de plante) chez les poissons témoins. Plusieurs fois par jour pendant une période de cinq jours, le comportement des poissons a été évalué. Cela consiste à prendre note des changements dans leur alimentation, leur mouvement et leur état de stress. En outre, leur survie a été vérifiée quotidiennement pendant les 5 jours d'expérience. A cinq jours post-injection, il a été montré que les poissons se comportent et se nourrissent normalement de même qu'aucun signe de stress n'a été détecté. Un taux de survie maximal (100 %) similaire à celle des poissons témoins a été détecté pour tous les deux *Stenocline* (Tableau 27). Ces données suggèrent que *S. ericoides* et *S. inuloides* ne sont pas toxiques pour le poisson zèbre à la dose antivirale.

Tableau 27- Survie et comportement des poissons injectés des extraits de *S. ericoides* et *S. inuloides* pendant les 5 / 7 jours après injection

	Nombre de poissons injectés	Nombre de poissons vivants					Taux de survie (%)	Comportement alimentaire	Comportement locomoteur
		1jpi	2jpi	3jpi	4jpi	5jpi			
Témoins	5			5			100	Normal	Normal
<i>S.ericoides</i>	5			5			100	Normal	Normal
<i>S.inuloides</i>	7			7			100	Normal	Normal

Pour approfondir le potentiel effet des *Stenocline* avec ces modèles, leur impact a été soigneusement surveillée en effectuant une analyse ZebraCube (Figure 27) à 24 heures post-injection. Les poissons traités et témoins ont été mis dans leurs nouveaux réservoirs et laissés en adaptation pendant 10 minutes. L'activité locomotrice des poissons a été ensuite contrôlée pendant une période de 10 minutes.

Il est constaté que les sujets traités ont parcouru la même distance dans des états d'activité petites et grandes que leurs contrôles respectifs à 24 heures post-injection (Figure 27 B, C, D) pour chaque échantillon. Par contre, une différence est observée pour la durée d'inactivité avec *S. ericoides* (Figure 27A) : le poisson traité effectue moins de mouvement et reste inactif plus longtemps que le poisson contrôle. En outre, les trajets parcourus par le poisson traité et le poisson témoin sont largement similaires (Figure 27 E). Ainsi, l'injection de *S. ericoides* et *S. inuloides* à la concentration maximale non cytotoxique n'apporte pas d'effet perturbateur significatif sur l'activité locomotrice et comportementale des poissons zèbres. Une étude a conduit à la même conclusion avec le thymohydroquinone (THQ), un produit isolé de l'huile essentielle d'*A. triplinervis* chez le même type de modèle *in vivo* (Haddad et al., 2019b).

Ensemble, ces résultats suggèrent que ces plantes ne présentent pas de toxicité aiguë *in vivo* dans nos conditions expérimentales.

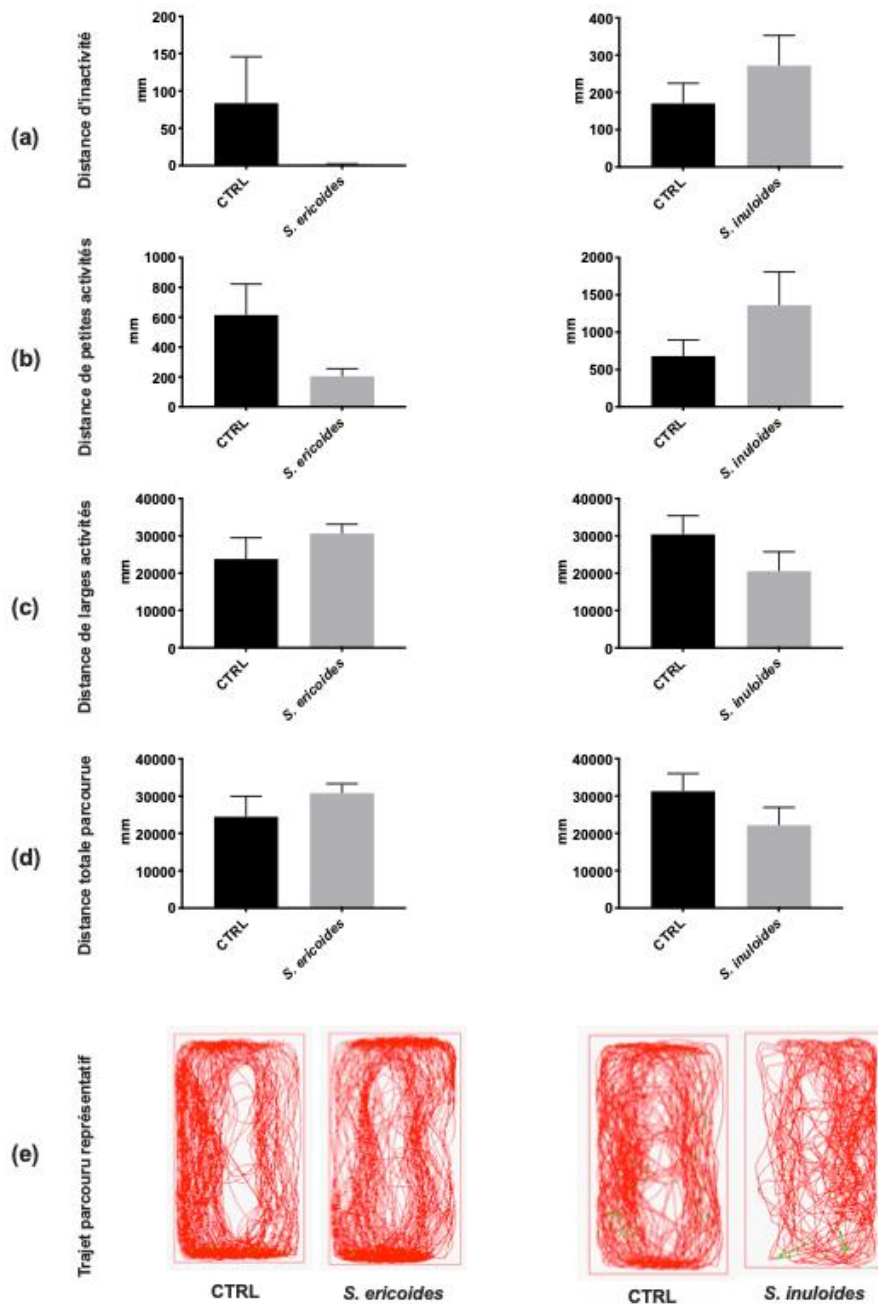


Figure 27- *S. ericoides* et *S. inuloides* n'impactent pas l'activité locomotrice syntonisée à un jour post injection. (a) Durée d'inactivation (<4 mm.s⁻¹). (b) Durée de petites activités (4 à 8 mm.s⁻¹). (c) Durée de grandes activités (>8 mm.s⁻¹). (d) Distance totale parcourue après une journée d'injection. Aucune différence significative n'a été observée par rapport au poisson contrôle CTRL (injecté du PBS 0,1% DMSO) (e) Trajets représentatifs parcourus par le poisson contrôle CTRL (injecté du PBS 0,1% DMSO) et les poissons traités (injectés des extraits de *S. ericoides* et *S. inuloides*) après 1 jour d'injection. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de comparaisons non appariées t-test. n = 5 pour *S. ericoides* et n = 7 pour *S. inuloides* (n : nombre de poissons par groupe)

IV. Analyse de la composition chimique de *S. ericoides* et *S. inuloides* par CLUHP-SM² et comparaison des profils chimiques par une approche de réseau moléculaire

Afin de savoir si la différence de mécanisme d'action observée est liée à une composition chimique différente entre les deux espèces de *Stenocline*, les profils chimiques des extraits bruts de ces plantes ont été analysés par chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à un spectromètre de masse en tandem (CLUHP-SM²), en collaboration avec le laboratoire ICSN à Gif-sur-Yvette. Cette analyse a permis de générer les réseaux moléculaires des extraits de *S. ericoides* et *S. inuloides* pour pouvoir les comparer (Figure 28).

Le réseau moléculaire est une approche chémoinformatique innovante développée récemment (Watrous et al., 2012). Cette approche est capable d'organiser, de visualiser sous forme de carte de similarité spectrale et de comparer des données de spectres SM² liés à la structure d'une molécule mettant en lumière l'existence de groupes spectraux similaires. Cette similarité est quantifiée par l'indice Cosine Score (CS) qui est attribuée entre deux spectres SM² comparés. La valeur de CS est comprise entre 0 et 1. La valeur 0 indique que les deux spectres n'ont pas d'ions fragments en commun tandis que la valeur 1 indique que les deux spectres de masse sont similaires (Frank et al., 2011). Principalement, deux spectres sont identifiés comme similaires lorsque CS>0,7 et qu'au moins 6 ions fragments communs sont détectés (Nothias et al., 2015). Les spectres SM² identiques sont regroupés par le biais d'un algorithme SL-Cluster et représentés sur la carte du réseau, sous forme de nœuds liés entre eux au sein d'un cluster (Frank et al., 2011) (Figure 28). Ensuite, les données spectrales sont comparées à celles de différentes bases de données spectrales comme le GNPS (Global Natural Product Social molecular networking), le HMDB (Human Metabolome Database), ReSpect, MassBank, NIST, DNP (Dictionary of Natural Product), MarinLit et MetLin (Nothias et al., 2015).

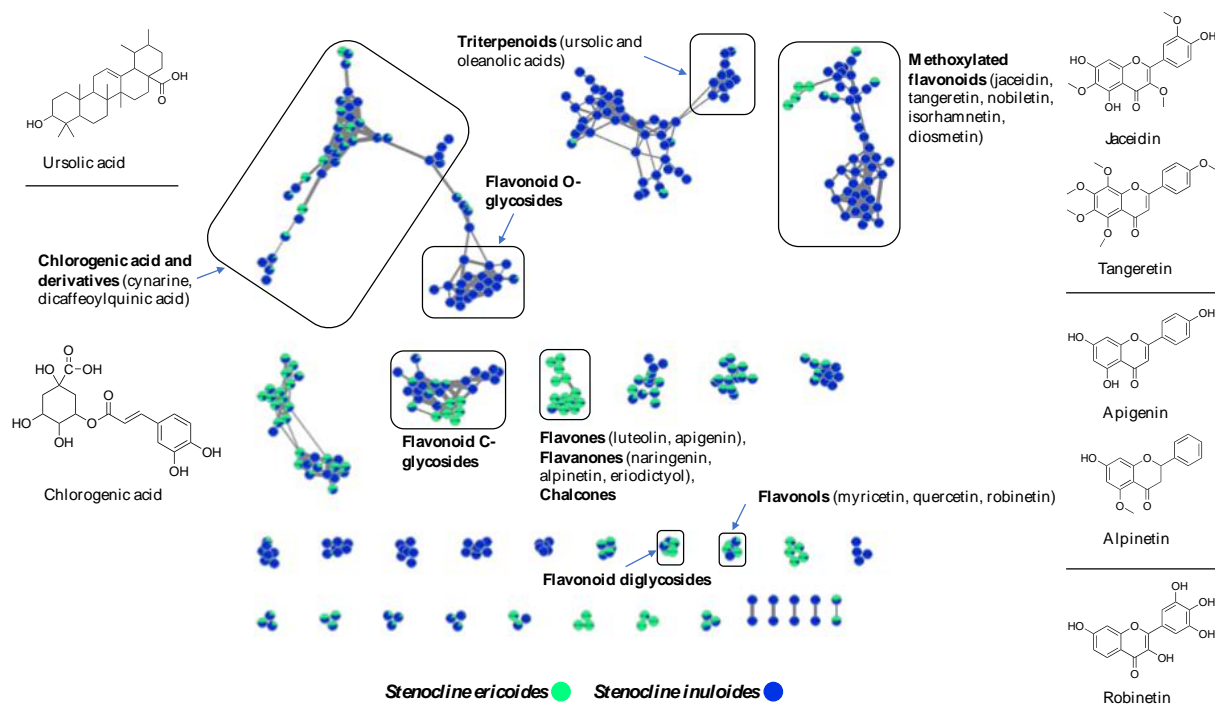


Figure 28- *S. ericoides* (vert) et *S. inuloides* (bleu) sont des espèces riches en polyphénols. Les réseaux moléculaires ont été créés par MetGem à partir du fichier spectral exporté de Progenesis QI. Les annotations correspondent à des correspondances standard ou analogiques avec les bibliothèques GNPS et ont été réalisées en utilisant un CS = 0,65.

Les extraits ont été analysés par CLUHP-SM² en mode d'acquisition positif dépendant des données et les données spectrales ont été prétraitées avec Progenesis QI. Par la suite, on a organisé les données en réseaux moléculaires à l'aide de MetGem. La figure 28 montre les réseaux moléculaires des 2 *Stenocline* représentant les liaisons des diverses molécules constituantes de chaque plante. Ces liaisons apparaissent sur le réseau moléculaire dès lors que le CS > 0,65 et qu'au moins six ions fragments sont communs entre les deux SM². Il est nécessaire de noter que la totalité de constituants chimiques des extraits ne sont pas présentés car ils ne sont pas tous ionisables ou s'ionisent en mode négatif.

Ainsi, le réseau moléculaire obtenu pour l'extrait de *S. ericoides* et *S. inuloides* a mis en évidence 6 et 8 clusters respectivement, dont les noeuds sont au minimum de 3. Par interrogation avec les bases de données spectrales en ligne, des types de molécules avec des ions fragments similaires ont été identifiés et regroupés (Tableau 28).

Tableau 28- Récapitulatif des métabolites secondaires constitutifs des extraits et à spectres de masse similaires à ceux des bases de données lors de l'analyse HRMS de *S. ericoides* et *S. inuloides*

Métabolites secondaires	<i>S. ericoides</i>	<i>S. inuloides</i>
Triterpènes	-	+
Acides phénoliques	+	+
Flavones	+	+
Flavonols	+	+
Flavones méthoxylés	+	+
Flavones C-glycosylés	+	+
Flavones O-glycosylés	-	+
Flavones diglycosylés	+	+

L'approche par le réseau moléculaire a révélé que la plupart des nœuds identifiés correspondent à des triterpènes, des polyphénols et des flavonoïdes.

Les triterpènes

Le réseau moléculaire annote la présence des triterpènes de type ursolique et oléanolique dans l'extrait de *S. inuloides*. Par contre, aucune structure triterpénique n'a été observée pour *S. ericoides*.

Les acides phénoliques

L'annotation des nœuds du réseau moléculaire a révélé que *S. ericoides* et *S. inuloides* pourront contenir de l'acide chlorogénique ainsi que ses dérivés de type cynarine et acide dicafféoyl quinique.

Les flavonoïdes

L'exploration du réseau moléculaire suppose la présence d'un cluster de flavonoïdes méthoxylés (jaceidine, tangeretine, nobiletine, isorhamnétine et disométine) plus fréquentes dans l'extrait de *S. inuloides*. Des clusters de flavonols (myricétine, quercétine, robinétine), des flavonoïdes C-glycosylés et di-glycosylés ont été également mis en évidence (Figure 27). L'extrait de *S. ericoides* était riche en composés flavonoïdique appartenant aux types flavone et dérivés de flavanone tels que la lutéoline, l'apigénine, la naringénine, l'alpinétine. Un cluster de flavonoïdes O-glycosylés a été identifiée pour l'extrait de *S. inuloides* uniquement.

En résumé, l'analyse phytochimique des deux plantes a montré la présence des clusters de flavonoïdes, des acides phénoliques. Cela peut suggérer qu'un ou plusieurs de ces composés peut ou peuvent agir via un mécanisme similaire à celui de l'EGCG qui inhibe l'infectiosité du ZIKV (Carneiro et al., 2016). De plus, il a été révélé que seulement *S. inuloides* contient les clusters de terpénoïdes et d'O-glycosides de flavonoïdes. Cette

différence explique l'action antivirale de l'extrait de *S. inuloïdes* par une prévention de la liaison virale à la surface de la cellule hôte au contraire de *S. ericoïdes*. En outre, il a été démontré que Q3G, un flavonol-*O*-glycosylé inhibe l'entrée virale (Gaudry et al., 2018). Il est possible que la présence de ces composés soit à l'origine du mécanisme d'action antivirale de *S. inuloïdes*.

V. Tentative d'identification chimique des molécules actives de *W. indica*

V-1. Fractionnement bio-guidé de l'extrait de *W. indica*

Un fractionnement bio-guidé a été mené sur l'extrait brut de *W. indica*. Les différentes étapes sont représentées sur la figure 29. Des tests de cytotoxicité et antiviraux ont été effectués sur les extraits et les fractions obtenus tout au long de l'avancement du fractionnement.

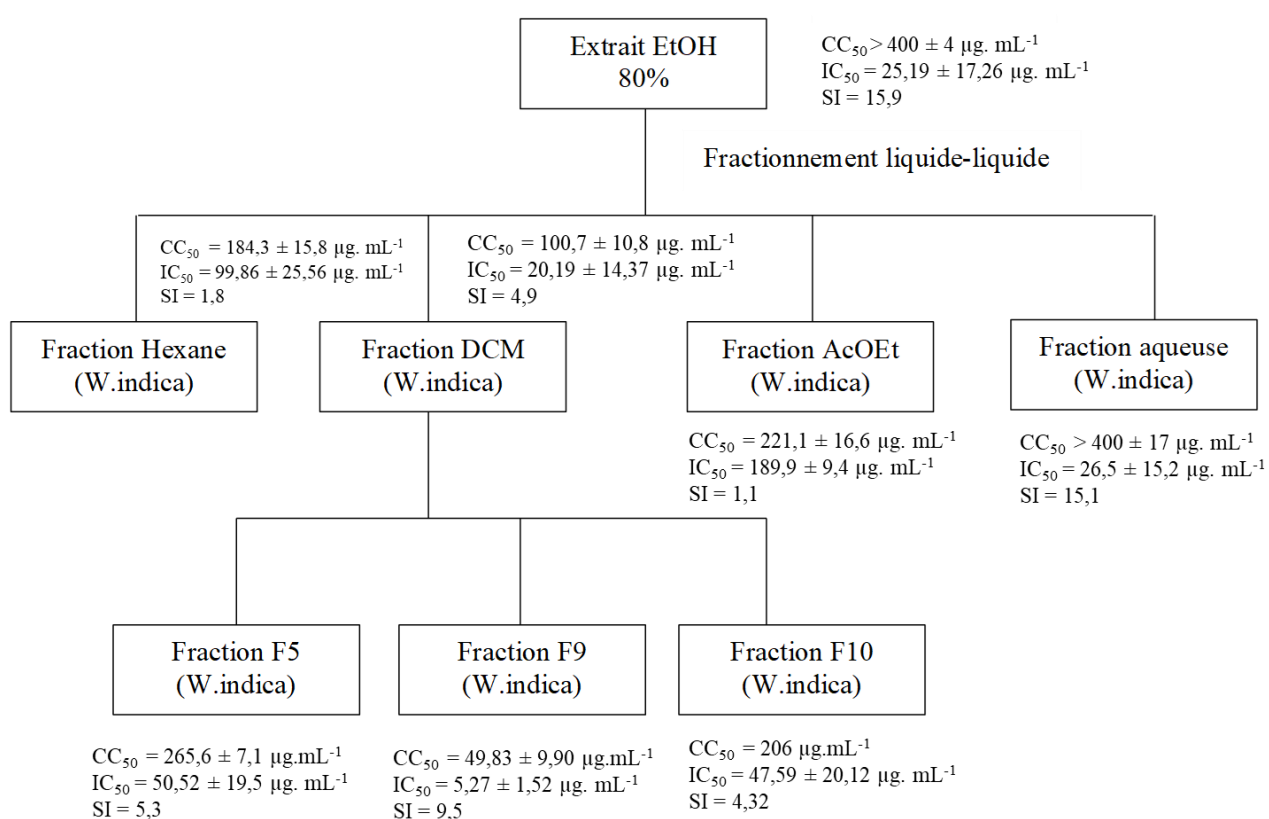


Figure 29- Différentes étapes de fractionnement bio-guidé de *W. indica*

EtOH : éthanol, Hex : hexane DCM : dichlorométhane, CC_{50} : Concentration cytotoxique à 50% ; IC_{50} : Concentration inhibitrice de l'infection à 50% ; SI : indice de sélectivité (CC_{50}/IC_{50})

L'extrait brut EtOH 80% a subi un fractionnement par partage liquide-liquide avec un gradient de solvant de polarité croissante commençant par l'hexane (le solvant le moins polaire), ensuite le dichlorométhane, puis l'acétate d'éthyle et à la fin l'eau distillée (Figure 29). Les rendements des fractions obtenues par rapport à la masse de l'extrait brut sont reportés dans l'Annexe 6. Les phases DCM et aqueuse présentent les meilleures activités avec une CI_{50} d'environ $20,19 \pm 14,37 \mu\text{g. mL}^{-1}$ et $26,5 \pm 15,2 \mu\text{g. mL}^{-1}$, respectivement. Les autres

fractions (hexane et AcOEt) possèdent une faible activité antivirale avec un $IC_{50} > 99 \mu\text{g. mL}^{-1}$ (Figure 29).

Par la suite, on a procédé à la séparation et purification de la fraction DCM qui a donné 11 sous-fractions F1 à F11 (Annexe 6). Un criblage antiviral contre ZIKV à une concentration de $100 \mu\text{g. mL}^{-1}$ a donné 3 fractions actives contre le virus (Figure 29). Les fractions F5, F9 et F10 montrent toujours une inhibition de la fluorescence ZIKV_{GFP} et l'évaluation de leur effet antiviral dose-dépendant a donné des $CI_{50} = 50,52 \pm 19,54$; $5,27 \pm 1,52$ et $47,59 \pm 20,12 \mu\text{g. mL}^{-1}$ respectivement (Figure 29).

Dans le but de sélectionner la fraction à investiguer pour la suite du travail, une étude complémentaire pour caractériser le mécanisme d'action antiviral a été réalisée (Figure 30). L'extrait brut ($100 \mu\text{g. mL}^{-1}$) et la fraction DCM ($50 \mu\text{g. mL}^{-1}$) de *W. indica* ont été utilisés comme références. L'étude mécanistique a été réalisée avec la concentration MNTC des fractions F5 ($100 \mu\text{g. mL}^{-1}$), F9 ($12,5 \mu\text{g. mL}^{-1}$) et F10 ($100 \mu\text{g. mL}^{-1}$). On a constaté que le mécanisme d'action antivirale de la fraction DCM est semblable à celui de l'extrait brut. Cette observation signifie que les molécules responsables de l'activité antivirale au niveau des phases précoces et des phases tardives du cycle viral se trouvent dans la phase DCM (Figure 30). Les fractions F5 et F10 ont agi directement au niveau de la particule virale comme l'extrait brut et la fraction DCM. Elles inhibent également l'entrée du virus dans les cellules mais n'impactent pas les phases tardives du cycle viral (Figure 30). Fait intéressant, la fraction F9 inhibe l'infection par le ZIKV par deux mécanismes d'action différents (Figure 30) en empêchant le virus d'entrer dans les cellules sans interagir avec la particule virale et en inhibant les phases tardives du cycle viral. Comme hypothèse, on peut expliquer ce mécanisme par la présence de deux ou plusieurs molécules dans la fraction F9. La suite de notre étude s'est focalisée sur la fraction F9 à cause de son activité antivirale importante et différente des deux autres fractions F5 et F10.

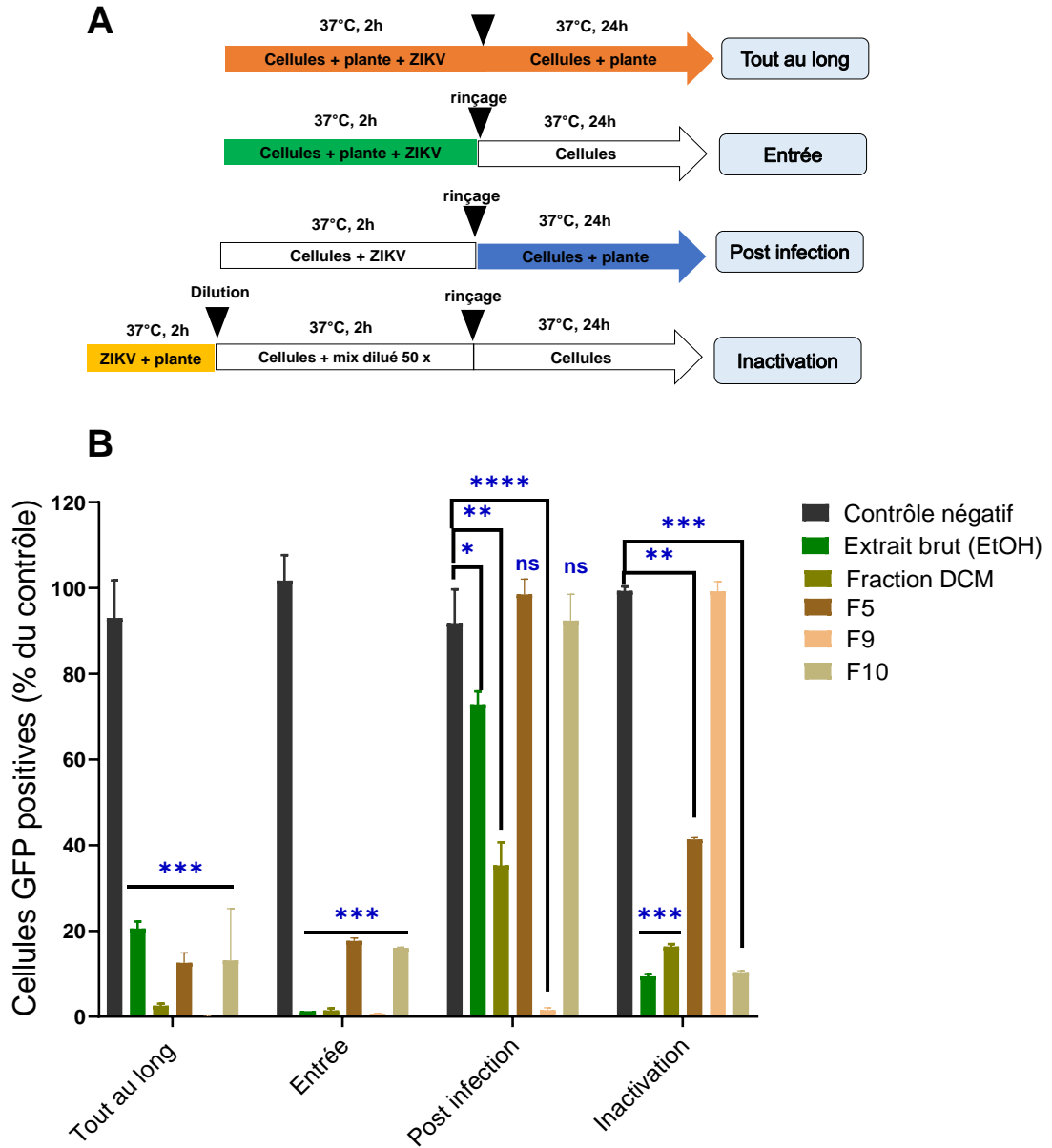


Figure 30- Mécanisme d'action des fractions F5, F9 et F10 de la fraction F_{DCM} de *W. indica* lors du cycle viral de ZIKV

La représentation schématique des différents protocoles d'addition des extraits/fractions lors de l'infection sont représentés en (A). La flèche colorée indique la présence de l'échantillon à tester (B) Analyse par cytométrie en flux 24h post infection de l'expression de la protéine GFP, sous les conditions expérimentales montrées en A. L'extrait de *Pentopetia sp* (100 µg. mL⁻¹) a été utilisé comme contrôle négatif. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM de trois expériences indépendantes (n=3). Des analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'une analyse ANOVA unidirectionnelle et du test de Dunnett pour des comparaisons multiples (**p<0,01 ; ***p<0,001 ; ****p<0,0001 ; ns = non significatif)

V-2. Analyse de la composition chimique de la fraction active de *W. indica* par CLUHP-SM²

Le fractionnement bio-guidé de *W. indica* a rapporté trois fractions actives dont la fraction F9 qui nous a semblé intéressante en termes de mécanisme d'action. Ainsi, la composition chimique de F9 a été investiguée par CLUHP-SM² pour mettre en exergue les molécules antivirales. Selon la littérature, la composition chimique de *W. indica* montre une richesse en alcaloïdes cyclopeptidiques, alcaloïdes quinoléiques, flavonoïdes (quercétine, kaempférol sous forme glycosides), polyphénols (epigallocatechine gallate), tanins, stérols, terpènes, saponines, et anthraquinones. (Zongo et al., 2013). L'analyse de la fraction F9 de *W. indica* par CLUHP-SM² en mode positif a permis de générer le réseau moléculaire affiché dans la figure 31. Ce réseau nous a permis de mettre en évidence la présence de deux clusters d'alcaloïdes quinoléiques type waltheriones A, B, C, E, J, M, N et la vanessine déjà isolés de la plante ou leurs isomères avec les mêmes masses moléculaires. Cretton et ses collaborateurs ont rapporté auparavant que les extraits de racines et de la partie aérienne de *W. indica* de Niger renferment des watheriones ainsi que d'autres alcaloïdes quinoléiques (Cretton et al., 2014, 2015, 2016, 2020).

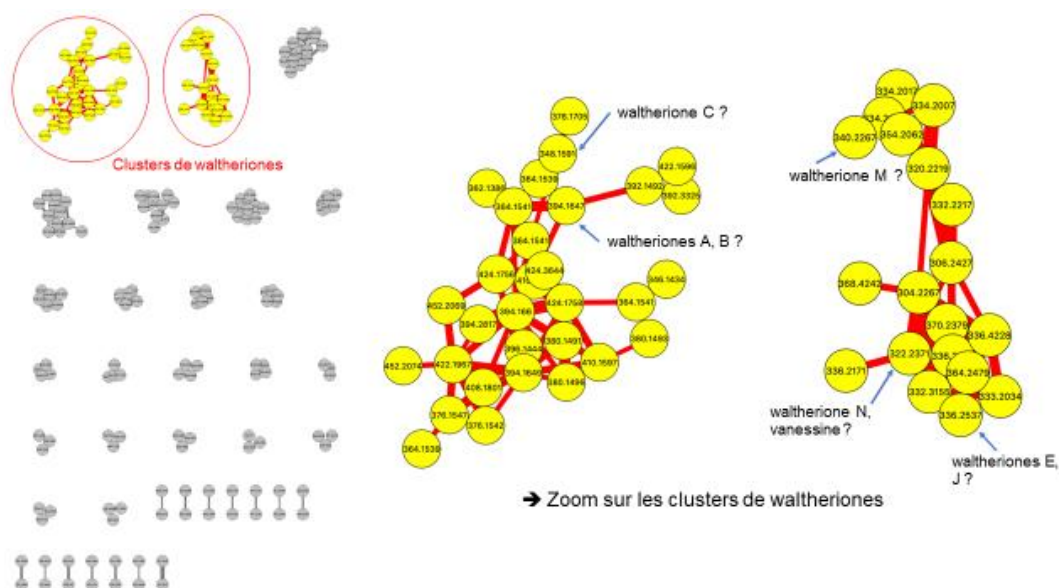


Figure 31- Représentation des clusters waltheriones présents dans la fraction F9 de *W. indica*
Les réseaux moléculaires ont été créés par MetGem à partir du fichier spectral exporté de Progenesis QI. Les annotations correspondent à des correspondances standard ou analogiques avec les bibliothèques GNPS et ont été réalisées en utilisant CS = 0,65.

V-3. Caractérisation de l'activité antivirale d'une série d'alcaloïdes quinoléiques isolés de *W. indica*

En collaboration avec l'Ecole des Sciences Pharmaceutiques de l'Université de Genève, l'activité antivirale d'une dizaine d'alcaloïdes quinoléiques isolés de *W. indica* (Niger) a été évaluée (Figure 32) (Cretton et al., 2014, 2015, 2020). Les tests antiviraux ont été réalisés sur des cellules A549 infectées avec ZIKV_{GFP} à une concentration de 12,5 µM pour chaque composé testé. La fraction F9 (12,5 µg. mL⁻¹) de *W. indica* (Madagascar) a été utilisée comme contrôle positif.

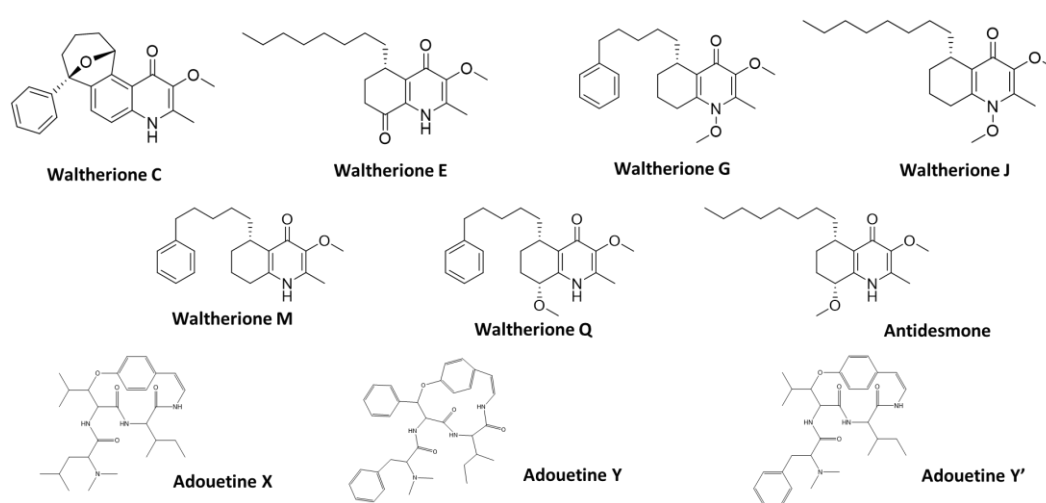


Figure 32- Liste des alcaloïdes quinoléiques isolés de *W. indica* (Niger) pour évaluation antivirale contre ZIKV et DENV

Les résultats ont montré qu'uniquement la waltherione C présente un effet antiviral en inhibant de 60% l'infection (Figure 33). En comparant avec les autres molécules, la waltherione C possède une structure cyclique assez stable et compacte avec une conformation fixe au contraire des waltheriones ouvertes (Figure 32).

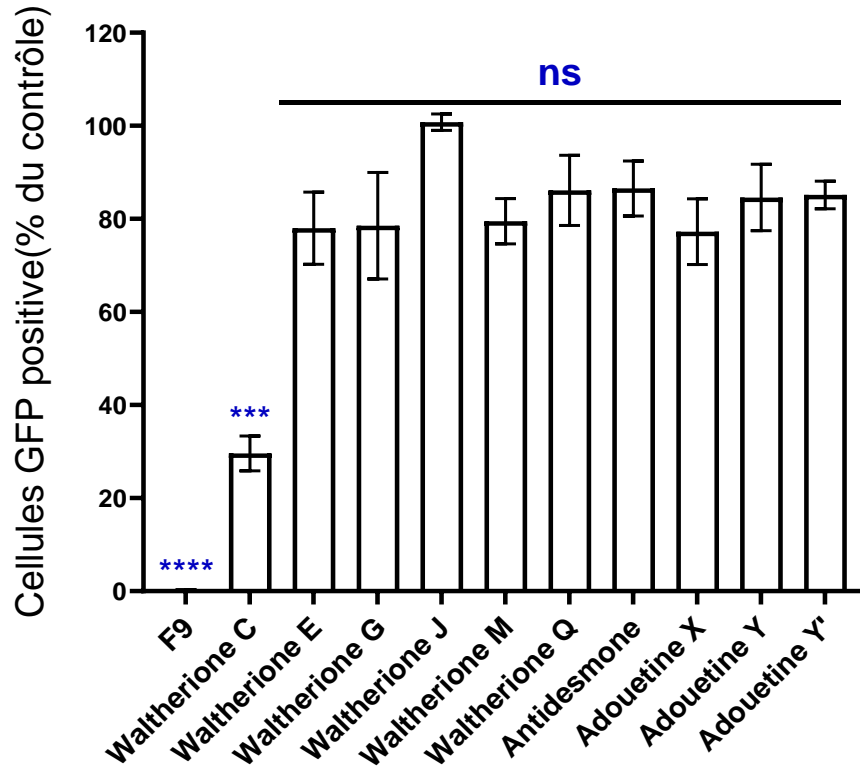


Figure 33- Criblage antiviral des alcaloïdes quinoléiques isolés de *W. indica* (Niger)

Les cellules A549 ont été infectées par ZIKV_{GFP} à une MOI =2 et traitées simultanément avec la concentration 12,5 μM de chaque composé et 12,5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ pour la fraction F9 pendant 24 heures. Le pourcentage de cellules exprimant la fluorescence de GFP est défini par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes (n=3) et en pourcentage relatif du contrôle infecté non traité par composé. Des analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'une analyse ANOVA unidirectionnelle et du test de Dunnett pour des comparaisons multiples (**p<0,001 ; ***p<0,0001 ; ns = non significatif)

V-3-1. Caractérisation de l'activité antivirale de la waltherione C

Par la suite, les évaluations de la cytotoxicité à 72h de traitement et de l'activité antivirale dose-dépendante de la waltherione C ont été réalisées avec une gamme de concentrations de 1,5 nM à 12,5 μM (Tableau 29). Les résultats ont permis de déterminer la concentration cytotoxique à 50 % de 0,54 μM après un traitement de 72 h sur les cellules A549. Cette valeur de CC_{50} est également très proche de la valeur de sa concentration inhibitrice de 50% de l'infection (CI_{50}) donnant un SI = 1,04.

Le traitement des cellules A549 avec la waltherione C a montré une inhibition de plus de 90% de l'activité mitochondriale à une concentration supérieure de 1 μM (Figure 34). Il est indispensable de noter que la waltherione C commence à perdre son potentiel antiviral au-delà de cette concentration. Ces résultats indiquent que l'activité antivirale de la waltherione C provient probablement de son effet cytotoxique.

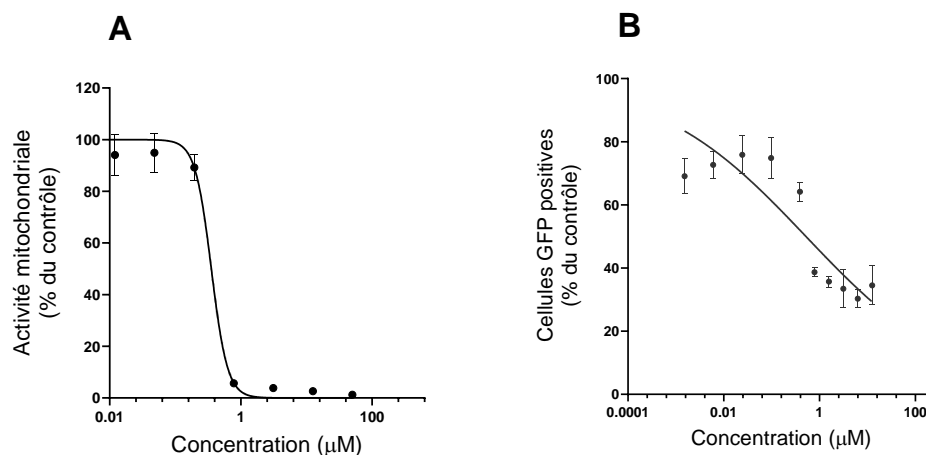


Figure 34- Evaluation de la cytotoxicité et de l'activité antivirale de la waltherione C contre ZIKV

(A) Les cellules A549 ont été incubées avec les différentes concentrations de la waltherione C pendant 72h. La viabilité cellulaire a été déterminée à l'aide de l'activité métabolique au moyen d'un essai de MTT. (B) Les cellules A549 ont été infectées par ZIKV_{GFP} (MOI = 2) et traitées avec la waltherione C pendant 24h. Le pourcentage de cellules GFP-positives a été déterminé par cytométrie en flux. Les CC₅₀ et les CI₅₀ ont été déterminées par des courbes de régression non linéaire. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM des trois expériences indépendantes (n=3)

Tableau 29- Evaluation de la cytotoxicité et de l'activité antivirale de la waltherione C contre ZIKV

	CC ₅₀ (72h)	CI ₅₀	SI (72h)
Waltherione C	0,54 ± 7,81 µM	0,52 ± 13,13 µM	1,04

Les CC₅₀ et les IC₅₀ ont été déterminées par des courbes de régression non linéaire. ^a Concentration cytotoxique à 50%, ^b Concentration inhibitrice de l'infection de 50%; ^c indice de sélectivité (CC₅₀/CI₅₀)

En résumé, la waltherione C, un alcaloïde quinoléique isolé de *W. indica* (Niger), a montré un effet modéré contre ZIKV. L'évaluation de la cytotoxicité de cette molécule sur les cellules A549 a montré que cette propriété antivirale est la conséquence de son effet cytotoxique. Ainsi, il est possible d'en déduire que les molécules responsables de l'activité anti-ZIKV et anti-DENV de *W. indica* (Madagascar) ne sont pas éventuellement ces waltheriones testées dans cette étude. Il se peut que ce soit d'autres analogues de waltheriones ou même d'autres familles de métabolites secondaires.

B. Étude de la relation entre la structure chimique des flavonols et leurs activités antivirales

Plusieurs études ont montré l'activité anti-ZIKV et anti-DENV de divers métabolites secondaires appartenant à la famille des alcaloïdes, des composés phénoliques, des triterpènes. Dans le cadre de ma thèse, je me suis focalisée uniquement sur l'étude des structures flavonoïdiques incluant les compétences et les objectifs du Laboratoire International Associé (Ranarijaona et al., 2021). D'autant plus qu'une étude antivirale contre ZIKV avec l'isoquercitrine a déjà été réalisée avec l'équipe de l'UMR PIMIT (Gaudry et al., 2018).

Gaudry et ses collaborateurs ont démontré que l'isoquercitrine exerce une activité antivirale agissant sur l'entrée du ZIKV en empêchant l'étape internalisation. Par contre, leurs études ont également mis en évidence que l'hypéroside et la quercétine (Figure 35) sont inactifs contre ZIKV (Gaudry et al., 2018).

En terme de caractère hydrophile, l'isoquercitrine s'avère être plus polaire et possède une affinité plus élevée avec l'eau que les deux autres. Ainsi, on suppose l'importance du caractère hautement hydrophile du noyau quercétine pour avoir l'activité antivirale.

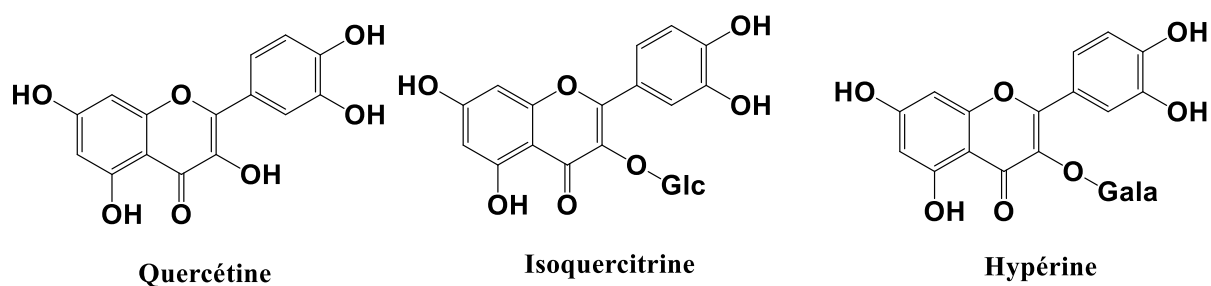


Figure 35- Structures chimiques de la quercétine, l'isoquercitrine et l'hypérine

Pour confirmer notre hypothèse sur l'influence de la polarité sur l'effet anti-flavivirus, deux méthodes ont été appliquées :

- attacher une entité hydrophobe sur la quercétine donnant de molécules peu polaires
- attacher un substituant hydrophile donnant des molécules polaires

I. Synthèse des dérivés peu polaires de la quercétine : alkylés et acétylés

Pour synthétiser des dérivés peu polaires de la quercétine, on a opté pour l'*O*-alkylation et l'*O*-acétylation.

I-1. *O*-Alkylation de la quercétine

La réaction par **catalyse acide** (Schéma 8) a été effectuée dans un tube scellé à 65°C, en présence de l'acide sulfurique concentré et du butanol comme réactif pendant 24 heures (Schéma 8). En suivant la réaction par chromatographie sur couche mince, la quercétine n'a pas réagi malgré l'optimisation des paramètres de la réaction tels que la température (jusqu'à 75°C), le taux d'acide et la durée de la réaction (jusqu'à 48 heures).

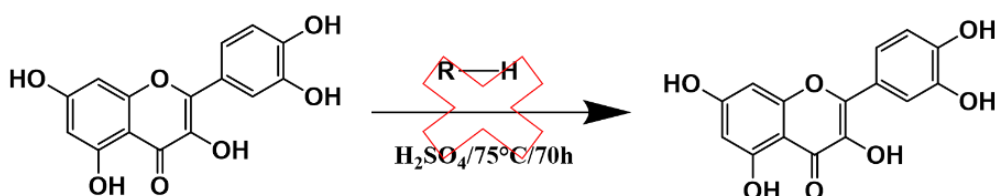


Schéma 8- Catalyse acide avec la quercétine

Pour la **catalyse par transfert de phase**, le bromure d'alkyle a été utilisé comme réactif. Elle suit le mécanisme de Williamson dans laquelle la substitution nucléophile est réalisée à partir d'un alcool et d'un halogénoalcane. La réaction a été réalisée en présence de carbonate de potassium (K₂CO₃) et du tétrabutylammonium hydrogéné-sulfate dans l'éthanol (Schéma 9).

Le premier essai de synthèse a été effectué avec le 2-bromobutane (Schéma 9). La réaction a fonctionné mais elle n'a pas été sélective et a fourni plusieurs produits. La réactivité est due à la présence de 5 groupements -OH dans la molécule.

Le mélange brut des produits de la réaction a été testé contre ZIKV. Mais il n'a pas présenté d'activité antivirale.

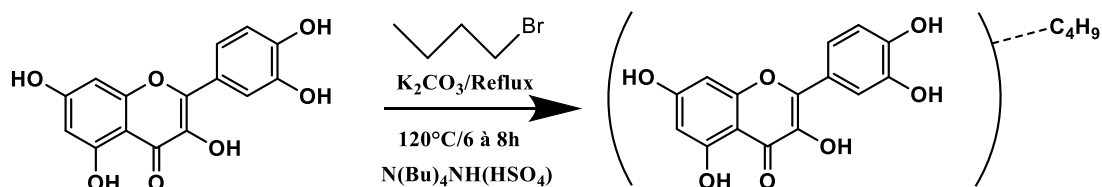


Schéma 9- Catalyse par transfert de phase avec la quercétine et le bromobutane

Pour faciliter la mise en œuvre de la réaction et afin d'avoir une bonne sélectivité, on a procédé à des réactions d'éthérisation avec les conditions de **la réaction de Mitsunobu**. Dans ce cas, la réaction a été effectuée avec un alcool (Schéma 10).

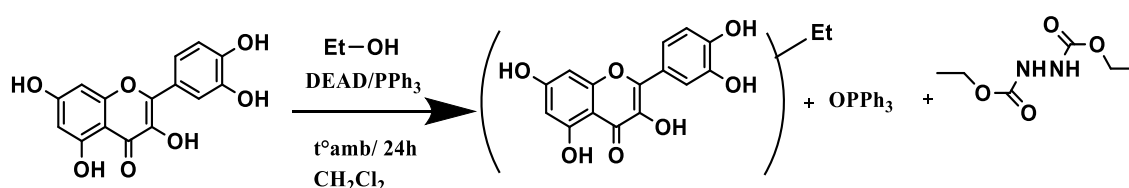


Schéma 10- O-Alkylation de la quercétine par l'éthanol selon la réaction de Mitsunobu

Le rendement obtenu est satisfaisant avec une valeur de 65%. La structure de la molécule a été confirmée par analyse des spectres RMN ^1H et ^{13}C (Annexe 7).

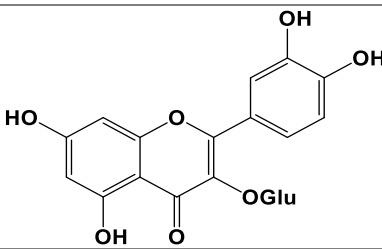
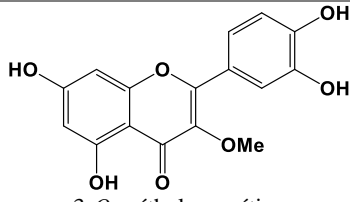
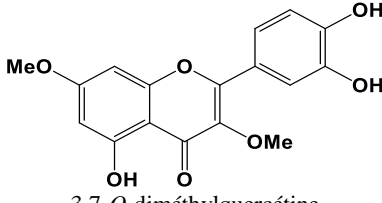
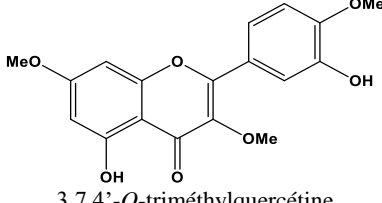
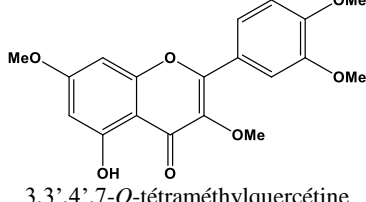
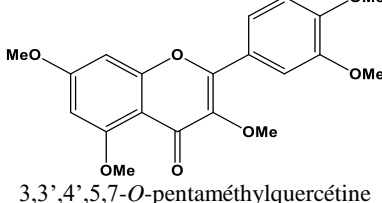
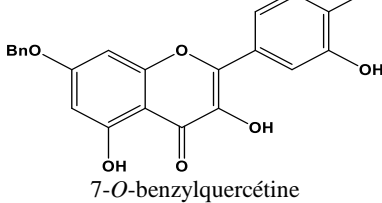
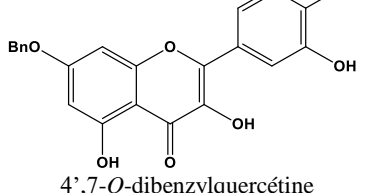
Néanmoins, l'évaluation de son activité antivirale contre ZIKV a donné des résultats négatifs (Tableau 30). Ces résultats nous ont permis de déduire que l'éther éthyloxyquercétine ne possède pas une activité antivirale. Il faut confirmer cette hypothèse en essayant de tester d'autres dérivés étherés.

Tableau 30- O-Alkylation de la quercétine par l'éthanol selon la réaction de Mitsunobu

Entrée	Ether	Rendement isolé	Test anti-ZIKV
1		65%	Inactif

En collaboration avec l'unité de recherche UMR ICBMS, quelques dérivés étherés (O-alkylés) de la quercétine ont été synthétisés (Tableau 31). Les composés ont été criblés contre ZIKV à une concentration égale à 50 μM sur des cellules A549. L'isoquercitrine est utilisée comme contrôle positif.

Tableau 31- Evaluation de l'activité antivirale des dérivés éthers de quercétine

Entrée	Ether	Test anti-ZIKV
Isoquercitrine		Positif IC ₅₀ = 8,97 ± 1,14 µM CC ₅₀ > 400 ± 10 µM SI = 44,6
2		Négatif
3		Négatif
4		Négatif
5		Négatif
6		Négatif
7		Négatif
8		Négatif

9		Négatif
10		Négatif
11		Négatif
12		Positif $IC_{50} = 4,98 \pm 8,74 \mu M$ $CC_{50} = 52,34 \pm 7,81 \mu M$ $SI = 10,5$
13		Négatif

Les tests antiviraux ont rapporté qu'aucune des dérivés alkylés seuls ne présentent une activité anti-ZIKV. Les dérivés *O*-méthylés, *O*-éthylés et *O*-benzylés de la quercétine testés n'inhibent pas l'infection des cellules A549 par le ZIKV.

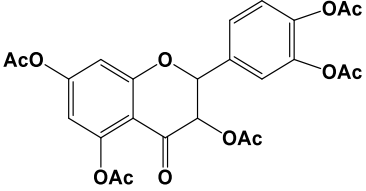
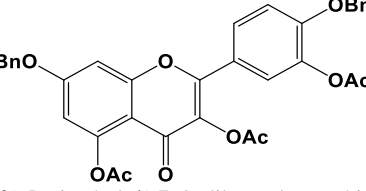
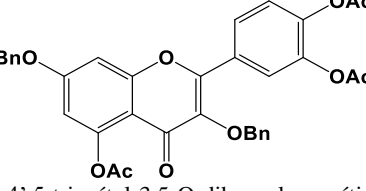
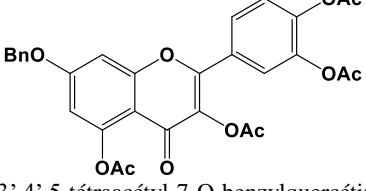
La substitution du glucose en 3 de l'isoquercitrine en méthyl a éliminé l'activité antivirale contre ZIKV (cas du composé 2). Comme il a été déjà démontré que l'isoquercitrine possède des activités contre ZIKV, les résultats obtenus permettent de confirmer le rôle du groupement OH ou des substituants portant des OH en position 3. Il en est de même pour les autres groupements OH en 7 (cas du composé 7) et en 3', 4' (cas des composés 4, 5, 6 et 8). Pour définir le rôle du groupement OH en 5, des évaluations antivirales supplémentaires avec d'autres substituants *O*-alkylés uniquement en cette position est nécessaire. En conclusion, les groupements OH libres ou des substituants portant des OH libres peuvent potentiellement être responsables de l'activité anti-ZIKV.

Néanmoins, un résultat positif contre ZIKV a été observé avec le composé 12 où tous les OH sont protégés. Il présente une valeur quatre fois moins importante (SI =10,5) par rapport à celle de l'isoquercitrine (SI = 44,6) (Tableau 31).

I-2. Dérivés *O*-acétylés de la quercétine

A part les *O*-alkylés de la quercétine, les dérivés *O*-acétylés ont été également synthétisés et testés contre ZIKV (Tableau 32).

Tableau 32- Evaluation antivirale de dérivés *O*-acétylés de quercétine contre ZIKV

Entrée	Ether	Test anti-ZIKV
14	 3,3',4',5,7- pentaacétylquercétine	Négatif
15	 3,3',5-triacétyl-4',7-O-dibenzylquercétine	Négatif
16	 3',4',5-triacétyl-3,5-O-dibenzylquercétine	Négatif
17	 3,3',4',5-tétraacétyl-7-O-benzylquercétine	Négatif

Les résultats ont montré que le dérivé acétylé seul (composé 14) et les dérivés éthers acétylés de la quercétine (composés 15, 16 et 17) ne présentent aucune activité contre ZIKV (Tableau 32). On suppose que les groupements acétyles entravent l'activité antivirale parce qu'ils ne portent pas des hydrogènes labiles pouvant participer à la formation des liaisons avec la cible.

I-3. Caractérisation de l'activité antivirale du composé (12)

En analysant la structure de la molécule (12) qui est apparue active contre ZIKV, on constate qu'elle est peu polaire et moins hydrophyle par rapport à la quercétine. Ces résultats indiquent qu'un dérivé peu polaire de la quercétine pourra également avoir un effet antiviral

contre ZIKV et contredisent notre hypothèse de départ. Toutefois, il est possible que le mécanisme d'action antiviral du composé (12) soit différent de celui de l'isoquercitrine.

Ainsi, une étude comparative du mécanisme d'action du composé 12 (6,25 μM) avec l'isoquercitrine a été menée (Figure 36). L'isoquercitrine (6,25 μM) est utilisée comme référence et contrôle positif. Les résultats ont montré que contrairement à l'isoquercitrine, ce composé inhibe les phases tardives du cycle viral. Son taux d'inhibition est identique (environ 60% d'inhibition) lorsqu'il est ajouté avant ou après l'adsorption du virus (Figure 36 B).

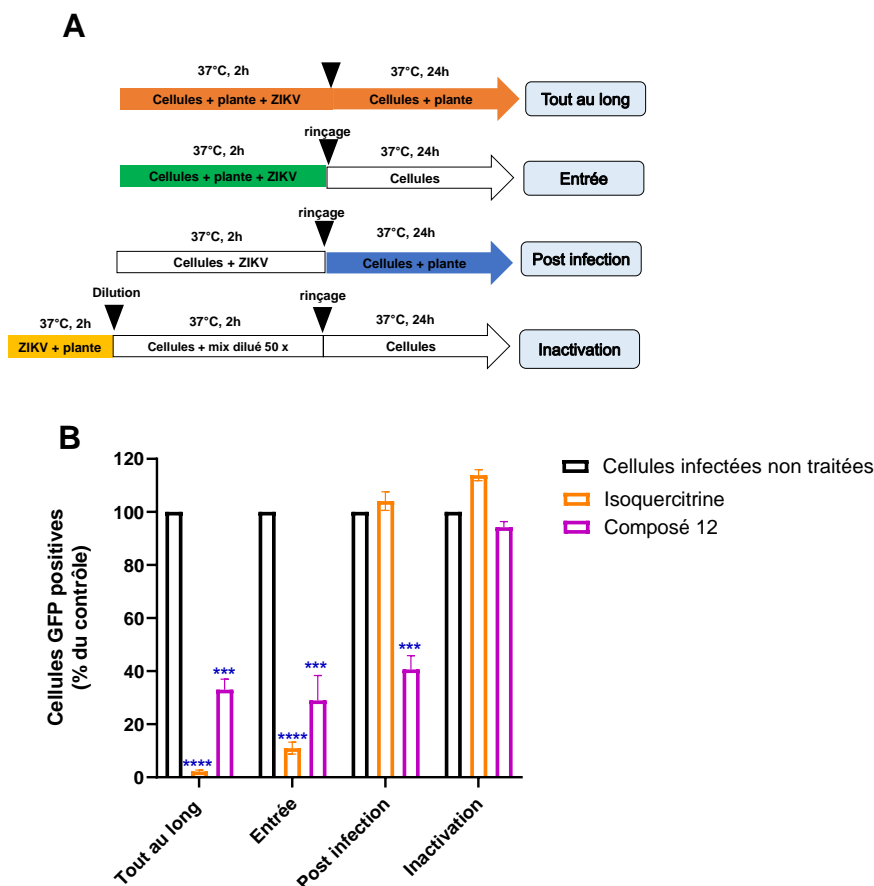


Figure 36- Mécanisme d'action antiviral du composé (12) lors du cycle de ZIKV.

La représentation schématique des différents protocoles d'addition des composés lors de l'infection sont représentés en (A). La flèche colorée indique la présence des composés (B) Analyse par cytométrie en flux 24h post infection de l'expression de la protéine GFP, sous les conditions expérimentales montrées en A. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes (n=3). Des analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'une analyse ANOVA unidirectionnelle et du test de Dunnett pour des comparaisons multiples (**p<0,001 ; ****p<0,0001)

Pour savoir si l'effet antiviral de la molécule (12) au niveau des phases tardives n'impacte pas la réplication cellulaire, une évaluation de son effet anti-prolifératif sur les cellules A549 a été réalisée pendant 72 heures de traitement. Les résultats ont démontré que le composé (12) n'influence pas la croissance cellulaire (Figure 37). Ainsi, son fonctionnement antiviral pourra cibler une protéine virale ou une protéine cellulaire spécifique qui est

indispensable au ZIKV pour entrer et se répliquer dans les cellules. Vue la structure volumineuse de la molécule, un encombrement stérique (deux noyaux benzéniques) est probablement à l'origine de ce phénomène.

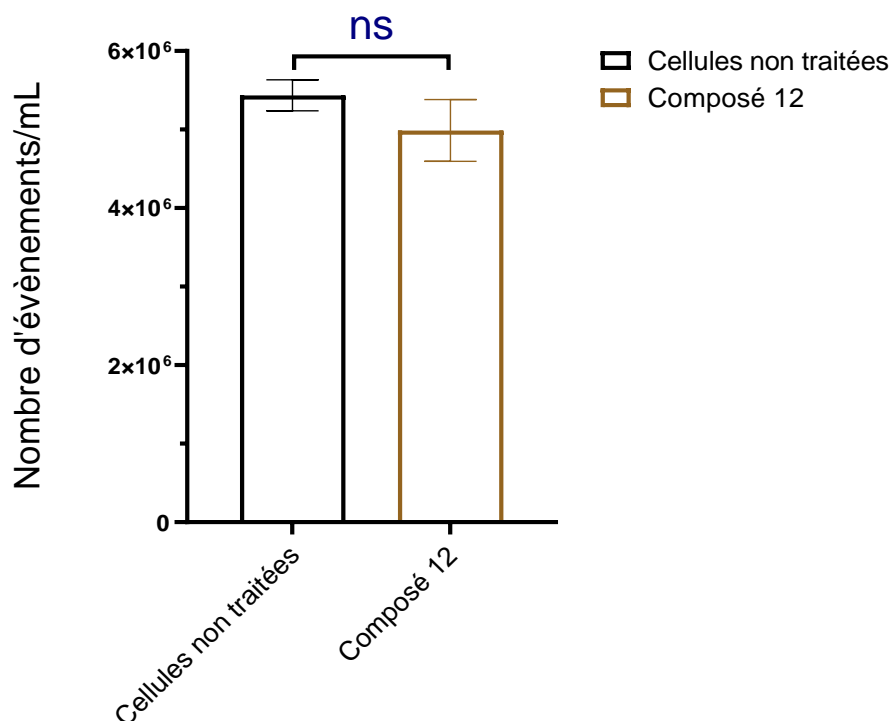


Figure 37- Evaluation de l'effet anti-prolifératif du composé (12)

Les cellules A549 ont été incubées avec le composé 12 (6,25 μM) pendant 72h. Le nombre d'évènements cellulaires a été déterminé par cytométrie en flux. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM des trois expériences indépendantes ($n=3$). Des analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'une analyse ANOVA unidirectionnelle et du test de Dunnett pour des comparaisons multiples (ns = non significatif)

L'activité antivirale du composé (12) contre le virus de la dengue a été également évaluée. Ainsi, les cellules Vero ont été infectées par DENV-1 (isolat clinique responsable de l'épidémie de dengue circulant sur l'île de La Réunion) pendant 72h et traitées simultanément par les différentes concentrations du composé (12) (6,25 μM à 50 μM). L'isoquercitrine (6,25 μM à 50 μM) a été utilisé comme contrôle positif. L'effet antiviral a été quantifié en titrant les particules infectieuses relarguées dans le surnageant par la technique de plaque de lyse. Les résultats montrent que l'isoquercitrine réduit la progénie virale de DENV de 2,5 log à 50 μM (Figure 38). Le traitement avec le composé 12 a montré une diminution significative de 2 log à la concentration non cytotoxique (25 μM) (Figure 38). Au total, ces données démontrent que ces flavonoïdes sont capables d'inhiber efficacement l'infection par le ZIKV et le DENV *in vitro* comme le cas de baicaline et baicaléine (Oo et al., 2019).

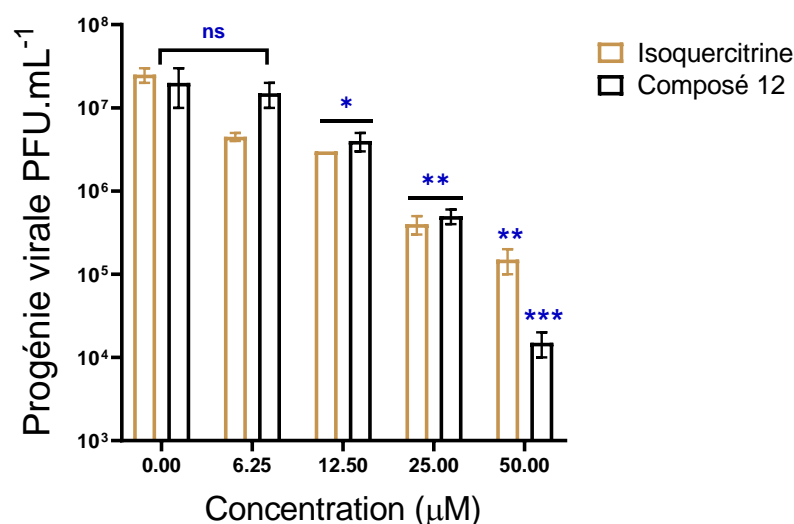


Figure 38- Activité antivirale de l'isoquercitrine et du composé (12) contre le sérotype DENV-1 isolé lors de l'épidémie à La Réunion.

Les cellules Vero ont été infectées (MOI = 2) et incubées continuellement avec différentes concentrations des composés (6,25 μM à 50 μM). La production de la progénie de DENV-1 a été quantifiée par titrage de lyse. Les données représentent en moyenne ± SEM des deux expériences indépendantes (n=2) et en pourcentage relatif du contrôle infecté non traité par un composé. Des analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'une analyse ANOVA unidirectionnelle et du test de Dunnett pour des comparaisons multiples (*p<0,1 ; **p<0,01 ; ***p<0,001; ns = non significatif)

II. Synthèse des dérivés polaires de la quercétine

II-1. Dérivé polyoxyéthyléné

La synthèse a pour objectif d'attacher une entité possédant une hydrophilie et une polarité similaire à celle du glucose. Pour ce faire, nous avons effectuée la réaction de Mitsunobu utilisant le polyéthylèneglycol comme réactif (Schéma 11) à cause de sa solubilité élevée dans l'eau (Balès, 2014). La sélectivité de la réaction nous a permis d'attacher le tétraéthylèneglycol sur un seul groupement de la quercétine. Il est fort probable que la substitution a été effectuée sur le OH en 7 compte tenu de son acidité élevé. Son emplacement lui permet également d'être le groupement OH le plus accessible. Par contre, le rendement pur est assez faible (22%).

Il s'agit d'une première réaction spécifique et sélective avec la quercétine. Toutefois, des optimisations de paramètres de réaction doivent être réalisées pour valoriser cette méthodologie.

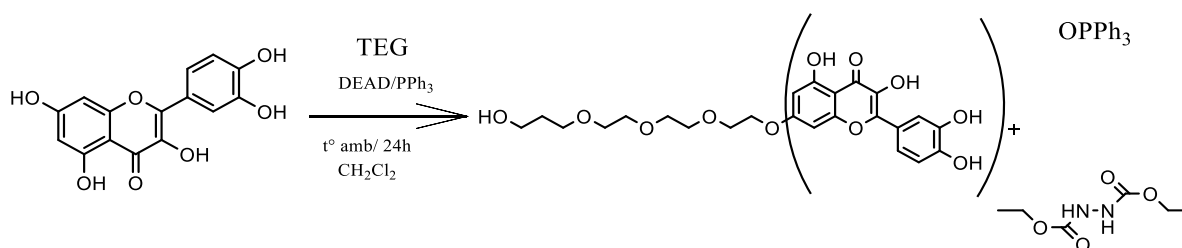


Schéma 11- Réaction de Mitsunobu avec la quercétine et le tétraéthylèneglycol

Même si nous avons espéré avoir une substitution sur la position 3, cela ne s'est pas réalisée à cause d'un encombrement stérique à cette région. Et comme la position 7 est facile d'accès, le tétraéthylèneglycol volumineux, se fixe potentiellement à cet endroit. Après purification, le produit synthétisé (50 μ M) a été testé contre ZIKV sur les cellules A549. Les résultats ont montré que cette molécule ne présente pas d'activité antivirale (Tableau 33). Ce résultat peut être potentiellement expliqué par le fait que le polyéthylène glycol est trop encombrant et ne possède pas des hydrogènes acides.

Comme indiqué auparavant, les études de Gaudry et.al montrent l'activité antivirale de l'isoquercitrine à la différence de l'hypéroside. Ainsi, l'hypothèse de cette étude concerne l'importance du caractère hydrophile du glucose sur l'effet antiviral. Effectivement, le glucose est largement hydrophile (Log P = -3,6) (Mazzobre et al., 2005; Mohan et al., 2015; FooDB, 2019b) par rapport au galactose (Log P = -2,6) (FooDB, 2019a) qui est le sucre attaché à l'hypéroside. Or, les résultats obtenus ne confirment pas cette approche posée. Néanmoins, il faut pouvoir instaurer un substituant très polaire sur la position 3 de la quercétine pour écarter définitivement cette hypothèse.

Tableau 33- Réaction de Mitsunobu avec la quercétine et le tétraéthylèneglycol

Entrée	Composé	Rendement isolé	Test anti-ZIKV
18		22%	Négatif

II-2. Dérivés glycosylés

Pour confirmer l'hypothèse sur l'importance d'un substituant polaire et hydrophile dans l'activité antivirale d'un dérivé de la quercétine, des dérivés glycosylés ont été testés contre le virus zika et le virus de la dengue.

Selon la littérature, l'isoquercitrine inhibe l'infection de ZIKV au contraire de son noyau quercétine (Figure 39) (Gaudry et al., 2018). Ainsi, une autre approche supplémentaire visant à démontrer l'importance d'un substituant sucre sur le noyau quercétine a été prise en compte avec ces types de molécules.

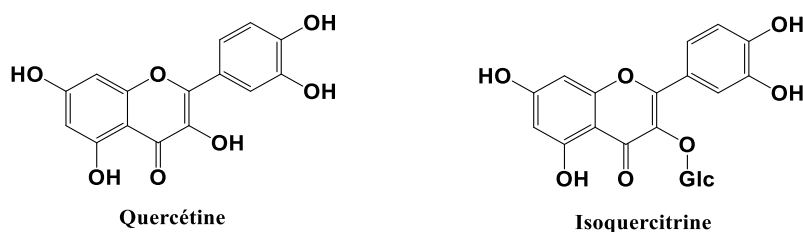


Figure 39- Structures chimiques de l'isoquercitrine et de la quercétine

II-2-1. Les dérivés C-glycosylés

Afin de confirmer et de comprendre le rôle d'un substituant sucre dans l'activité antivirale des flavonoïdes, un criblage anti-ZIKV sur les cellules A549 a été réalisé avec 20 flavones C-glycosylées (50 μM) (Figure 40) en collaboration avec le laboratoire CASYEN de l'ICBMS de l'Université de Lyon. Les résultats ont montré que ces molécules n'ont aucun effet antiviral. Cela nous a permis d'écarter les squelettes flavoniques de type C-glycosylés (Figure 40) de notre étude de relation structure-activité.

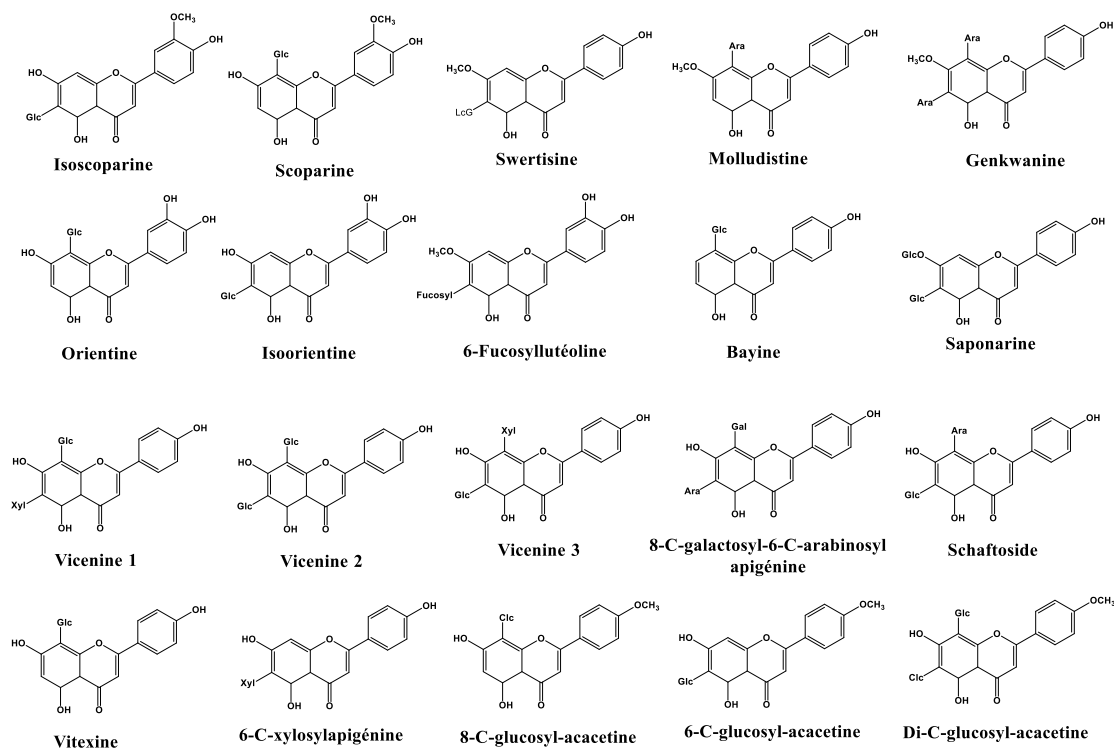


Figure 40- Liste des flavones C-glycosylés pour le criblage anti-ZIKV

Les C-glycosides testés sont des **flavones (sans OH en 3)** dont les H6 et/ou H8 sont substitués par des unités de sucres. Il sera dorénavant intéressant de faire un dépistage anti-ZIKV avec des **flavonols C-glycosylés** pour la remise en question de ces résultats négatifs

Pour la suite de mes travaux de recherche, seule l'étude sur les dérivés glycosylés de flavonols a été développée.

II-2-2. Les dérivés O-glycosylés

Dans la recherche des molécules antivirales, des flavone et flavonol O-glycosylés ont déjà été mis en évidence comme anti-ZIKV et anti-DENV en citant la baicaline (flavone, Figure 41) (Oo et al., 2019) et l'isoquercitrine (Gaudry et al., 2018). Ainsi, il est probable que le substituant sucre rattaché sur un des OH de ces flavones/flavonols favorise leur activité antivirale. Dans le but de valider cette approche, des questions ont été posées :

- Est-ce que la nature du sucre attaché pourra influencer l'effet inhibiteur du flavivirus ?
- Est-ce que la position du sucre pourra orienter l'activité antivirale ?
- Est-ce que le nombre de sucres attachés pourra impacter la propriété anti-ZIKV ou anti-DENV ?

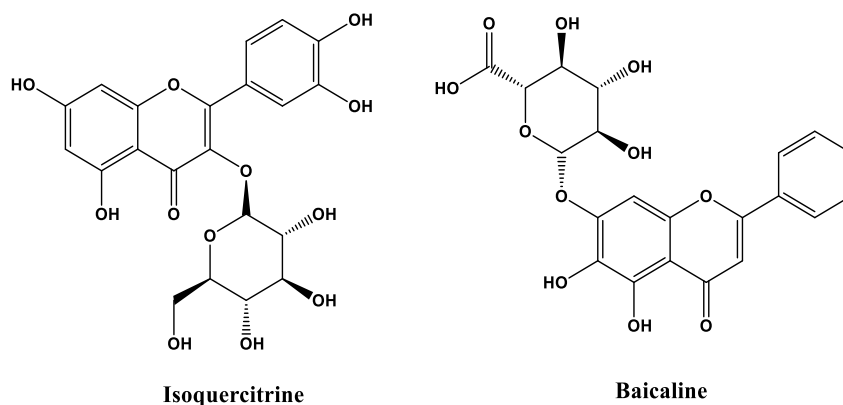


Figure 41- Structures chimiques de l'isoquercitrine et de la baicaline

Pour répondre à toutes ces questions, quelques flavonols *O*-glycosylés et des analogues de l'isoquercitrine synthétiques ont été évalués contre ZIKV. Dans cette étude, les 30 dérivés *O*-glycosylés ont été classés dans deux catégories : les *O*-glycosides avec des OH libres et les *O*-glycosides avec des OH substitués.

c) Les *O*-glycosides avec des OH libres

Les flavonols *O*-glycosylés utilisés sont listés sur le tableau 34. L'évaluation anti-ZIKV a montré que seule l'isoquercitrine bloque l'infection par le virus.

Tableau 34- Liste des flavonols *O*-glycosylés avec des OH libres pour le test anti-ZIKV

	R3	R5	R7	R3'	R4'
Isoquercitrine	O-Glc	OH	OH	OH	OH
Hypérine	O-Gala	OH	OH	OH	OH
Quercimeritrine	OH	OH	O-Glc	OH	OH
Quercétine diglucoside	O-Glc	OH	OH	OH	O-Glc
Astragaline	O-Glc	OH	OH	H	OH

Ces résultats confirment l'hypothèse posée sur :

- l'influence de la nature de sucre dans le potentiel antiviral comme le cas de l'hypéroside et de l'isoquercitrine (Tableau 34). Sur la même position 3, l'hypéroside est substituée d'un galactose tandis que l'isoquercitrine contient un glucose. La solubilité est un des paramètres liés à ce phénomène.

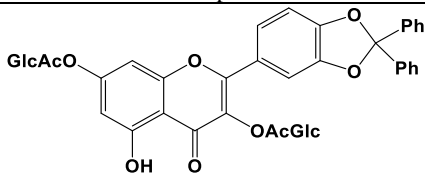
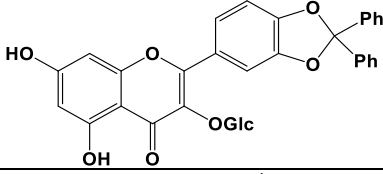
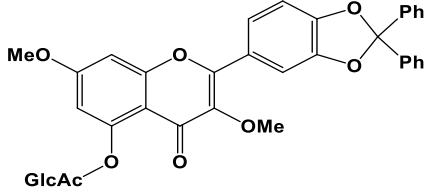
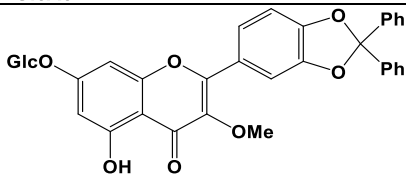
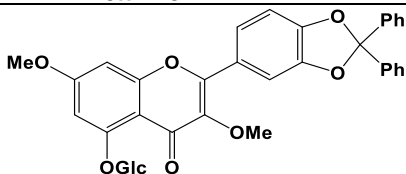
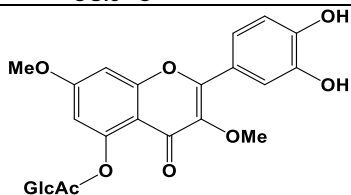
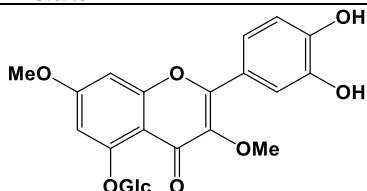
- la nécessité d'avoir des groupements OH- libres dans les positions 5 et 7. Donc l'emplacement du sucre en ces régions ne sont pas compatibles avec l'activité antivirale. C'est le cas de la quercimeritrine avec un glucose en position 7
- l'importance de l'emplacement de la liaison glucosidique en position 3 par rapport aux autres groupements hydroxyles comme le cas de la quercimeritrine avec un glucose en position 7. Cette position se différencie des autres positions à cause de la fonction carbonyle en 4. La présence de ce groupement fonctionnel C=O pourra permettre à la molécule d'interagir avec l'atome de cuivre de l'enzyme quercétine 2,3-dioxygénase. Ce qui va engendrer par la suite la rupture rapide et facile de l'*O*-hétérocyle pour une métabolisation de la molécule en dérivés esters et acides carboxyliques (Steiner et al., 2002) (Figure 46). En parallèle, la double liaison (2,3) est également spécifique en assurant la délocalisation des électrons π entre les cycles B et C (Figure 46) (van Acker et al., 1996). Toutes ces conditions réunies contribuent à apporter à la quercétine une activité antioxydante plus importante par rapport aux autres flavonoïdes (Trouillas et al., 2006). Il se peut que ce même mécanisme entre en jeu dans l'activité antivirale spécifique de l'isoquercitrine.
- l'importance de l'OH en 3' comme le cas de l'astragaline qui est dehydroxylé. La fonction catéchol constitue les deux groupements hydroxyles en position 3' et 4'. Elle est principalement associée à l'activité antioxydante de certains flavonoïdes tels que la quercétine, la taxifoline et la catéchine (Nile et al., 2017; Shubina et al., 2021). La présence d'un groupement méthoxyle en position 4' (hespérétine) ou l'absence du groupement hydroxyle en position 3' du cycle B (naringénine) entraîne une diminution significative de l'effet antioxydant (Shubina et al., 2021). Ces observations se concordent aux résultats obtenus pour mon étude, la fonction catéchol libre sur le noyau B semble partiellement être responsable de l'inhibition de l'infection.

En ce qui concerne le nombre de sucre avec la quercétine 3,4'-*O*-diglucoside, on ne peut pas tirer de conclusion généralisée puisqu'il existe deux possibilités : soit c'est le -OH en 4' non libre, soit c'est le sucre encombrant la structure qui sont à l'origine de ce résultat négatif. Par conséquent, des investigations sur d'autres structures seront nécessaires.

d) *O*-glycosides avec des OH substitués

Comme les autres dérivés étherés et acétylés, ces analogues glycosylés de la quercétine/ isoquercitrine ont été synthétisés en collaboration avec le laboratoire CASYEN de l'ICBMS de l'Université de Lyon. Les composés testés sont résumés dans le tableau 35 ainsi que les résultats de leur évaluation antivirale contre ZIKV.

Tableau 35- Evaluation de l'activité antivirale des flavonols *O*-glycosides avec des OH substitués contre ZIKV

Entrée	Composé	Test anti-ZIKV
19		Négatif
20		Négatif
21		Négatif
22		Négatif
23	 $IC_{50} = 12,21 \mu M$ $CC_{50} = 60,21 \mu M$ $SI = 4,9$	
24		Négatif
25		Négatif

26		Négatif
27		Négatif
28		$IC_{50} = 41,84 \pm 12,12 \mu M$ $CC_{50} = 66,89 \pm 24,49 \mu M$ $SI = 1,6$
29		Négatif
30		Négatif
31		Négatif

Durant l'expérience avec ces analogues, nous avons constaté que tous les composés avec le catéchol protégé ont des difficultés à se solubiliser dans le milieu de culture cellulaire. Ce phénomène a probablement perturbé les résultats des tests antiviraux. Premièrement, l'importance du groupement hydroxyle en position 3' de l'isoquercitrine est confirmée avec le résultat négatif obtenu avec le composé 20 où la fonction catéchol est protégée (Tableau 35).

Par contre, le composé 23 présente une activité anti-ZIKV (SI = 4,9) malgré que tous ses -OH sont substitués. Il est à noter que cette molécule se trouve légèrement cytotoxique avec un $CC_{50} = 66 \mu M$ (Tableau 35). En outre, son potentiel antiviral reste faible (10 fois moins) par rapport à l'isoquercitrine avec un SI = 4,9. Fait intéressant, la structure du composé 23 se différencie du composé 12 par la substitution d'un glucose en position 5-OH au lieu d'un méthyle (Figure 42). En comparant leur index de sélectivité, le composé 12 s'avère être le plus

actif. On peut en déduire que la nature du substituant en position 5-OH peut impacter l'activité antivirale de ce type de composés.

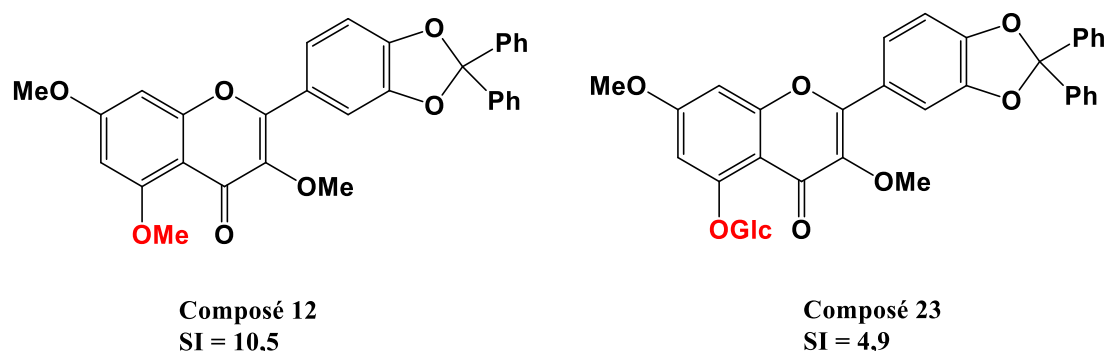


Figure 42- Comparaison des structures chimiques et de l'activité antivirale des composé 12 et 23 contre ZIKV

Le composé 25 possède la même structure de base que le composé 23 mais avec l'unité catéchol déprotégée, on observe une perte de l'activité antivirale (Tableau 35). Ce résultat indique que la protection et la déprotection de la fonction catéchol pourra impacter l'effet antiviral.

Les analogues avec du glucose ou du glucose acétylé en position 3'-OH (composés 26 et 27), en 4'-OH (composés 30 et 31) restent inactifs contre ZIKV.

Par ailleurs, le composé 28, avec un glucose acétylé en position 5 montre une faible activité anti-ZIKV (SI = 1,6) (Tableau 36). Au contraire, le composé 29 avec un glucose non acétylé en cette position 5 ne présente pas un effet antiviral (Tableau 36). Il est à noter que tous les autres OH de ces composés sont substitués par des méthoxyles. Ce qui explique que l'activité antivirale du composé (28) reste très faible et peut potentiellement provenir de son effet cytotoxique.

En résumé, ces composés testés contiennent des groupements non protiques en position 3 et/ou en 3' les rendant inactifs contre le virus. Pour le composé 23 qui a montré une activité antivirale modérée, il est encore difficile de donner des explications. Probablement, il doit avoir une unité structurale formant des liaisons non covalentes avec les protéines cellulaires et/ou virales interférant avec la réplication du virus. Avec ces résultats, le rôle de la fonction catéchol dans l'effet antiviral ne peut pas encore être défini.

Dans l'ensemble, les résultats ont mis en évidence deux nouveaux dérivés de la quercétine présentant une activité antivirale : les composés (12) et (23). En comparaison avec l'isoquercitrine, leur potentiel antiviral reste faible, ce qui est probable en tenant compte de la différence au niveau de leur structure. Une étude mécanistique a révélé que le composé (12) agit à la fois au niveau de l'entrée et de la réplication virale. En outre, les données obtenues ont permis de valider à moitié l'hypothèse indiquant l'importance d'une entité polaire sur l'effet antiviral d'un dérivé de la quercétine. Cette étude a également démontré le potentiel antiviral intéressant de l'isoquercitrine par rapport aux dérivés de la quercétine. Il a également été constaté que son effet antiviral doit obéir à quelques conditions : a) la nature du sucre ne peut pas être changée : le glucose est indispensable, b) la liaison glucosidique en position 3 est primordiale à son effet c) le groupement hydroxyle en position 3' doit être libre, accessible et non encombré par rapport aux substituants en 4'. Par conséquent, des investigations supplémentaires sont nécessaires pour bien identifier les pharmacophores responsables de l'activité antivirale de l'isoquercitrine et pour apporter plus de précision sur son mécanisme d'action antiviral.

Conclusion générale et perspectives

Mes travaux de recherche s'attachent à l'identification des antiviraux, d'origine naturelle, de structures diverses contre les flavivirus d'intérêt médical ZIKV et DENV. En l'absence de traitements spécifiques ou de vaccins contre le zika et la dengue, ces deux arbovirus sont apparus comme un grave problème de santé publique qui affecte actuellement des millions de personnes (Bos et al., 2018; Ferraris et al., 2019)

La thèse est constituée de deux parties. La première partie consiste à identifier dans la biodiversité végétale malgache des molécules bioactives capables d'inhiber l'infection virale par la dengue. La deuxième partie concerne le développement des substances antivirales à partir des dérivés de flavonoïdes qui constituent les produits naturels les plus abondants dans les sous-produits de transformation des plantes malgaches. Dans ce cadre, l'étude se focalise principalement sur les dérivés de la quercétine, connus comme potentiels agents antiviraux, afin de faire émerger une relation entre leur structure chimique et leur effet antiviral.

I. Caractérisation des plantes médicinales malgaches actives contre ZIKV et DENV

Pour mener mes travaux de recherche, 17 plantes médicinales ont été sélectionnées selon la base d'une enquête ethnobotanique. Les essais virologiques ont permis d'identifier trois plantes actives, *S. ericoides*, *S. inuloides* et *W. indica*, contre les deux souches ancestrale et épidémique ZIKV et le virus de la dengue. L'analyse approfondie de leur mécanisme d'action à des doses non cytotoxiques a montré que les trois espèces interagissent au niveau des phases précoces du cycle viral. En effet, le test d'inactivation a révélé que *S. ericoides* est capable de neutraliser l'infectivité virale. Ce mode d'action antivirale ressemble à celui observé avec les plantes testées auparavant comme *A. theiformis*, *P. mauritianum*, *D. apetalum* (Clain et al., 2018, 2019 ; Haddad et al., 2019). Par ailleurs, ce mécanisme d'action a été décrit pour certains polyphénols comme l'EGCG, la curcumine, la delphinidine qui ont un large spectre d'action contre divers virus enveloppés (Carneiro et al., 2016; Sharma et al., 2017; Vázquez-Calvo et al., 2017; Balasubramanian et al., 2019). En addition, l'analyse phytochimique de *S. ericoides* a mis en exergue une composition riche en composés phénoliques et en flavonoïdes. On peut déduire qu'un ou plusieurs de ces molécules peuvent agir en tant qu'antiviral via un mécanisme similaire à celui de l'EGCG. Concernant *S. inuloides*, l'extrait inhibe l'entrée du virus par la prévention de la liaison virale à la surface de la cellule hôte. La caractérisation chimique de cette plante a révélé la présence exclusive d'un

cluster de flavonoïdes *O*-glycosides. Il est possible que le mécanisme d'action antivirale de la plante soit associé à la présence de cette famille de molécules. Une étude *in vitro* a indiqué que l'isoquercitrine (flavonol-*O*-glycoside) inhibe l'entrée virale de ZIKV (Gaudry et al., 2018).

Pour *W. indica*, l'extrait cible à la fois l'entrée et la réplication virale. Des résultats similaires ont été rapportés avec *S. baicalensis* (Zandi et al., 2013). Au niveau de l'entrée, l'extrait inactive directement la particule virale évitant l'attachement aux récepteurs cellulaires. Plusieurs études ont montré que les substances naturelles dérivées des plantes agissent principalement sur les premières phases du cycle infectieux du ZIKV ou du DENV (Clain et al., 2018, 2019; Haddad et al., 2019a, 2019b, 2020). Différentes molécules naturelles ont déjà révélé des activités anti-flavivirus au niveau des phases tardives du cycle viral à savoir des terpénoïdes (Yao et al., 2018 ; Chavda et al., 2022), des acides phénoliques (Bourjot et al., 2012b; Lim et al., 2017) des chalcones (Kiat et al., 2006; Lim et al., 2017). De la même manière, des anticancéreux inhibant spécifiquement des protéines ou des processus cellulaires, ont révélé une activité antivirale indirecte comme le silvestrol sur les cellules A549 (Elgner et al., 2018). Une tentative de fractionnement bioguidé a été menée sur l'extrait de *W. indica* pour isoler les substances actives mais malheureusement cette étape n'est pas finalisée. Cette séparation bioguidé a mis en évidence trois fractions actives parmi les 11 obtenues : F5, F9 et F10. L'analyse HRMS de la fraction F9 présentant la meilleure activité antivirale (SI = 9,5) a permis de générer un réseau moléculaire. En comparaison avec la littérature, ce réseau moléculaire a indiqué la présence des alcaloïdes quinoléiques comme les waltheriones. En collaboration avec l'Université de Genève, l'activité antivirale des waltheriones isolés de *W. indica* de Niger a été évaluée. Seule la waltherione C a montré une activité antivirale modérée contre ZIKV (SI = 1,04) à cause de son effet cytotoxique sur les cellules A549. Ces données indiquent que les molécules bioactives dans la fraction F9 ont des structures différentes ou des structures isomères des waltheriones que j'ai testées. Il est à noter également que certains clusters du réseau moléculaire de la fraction F9 n'ont pas été identifiés avec les bases de données en ligne. Ainsi, il est également possible que les molécules bioactives de F9 appartiennent à d'autres familles de substances naturelles avec un potentiel anti-flavivirus intéressant.

L'évaluation de la toxicité *in vivo* de *S. ericoides* et *S. inuloides* à leur concentration non cytotoxique, a rapporté aucun effet nocif dans la survie, l'alimentation et le comportement locomoteur des poissons zèbres pendant 5 jours post-innoculation.

Pour conclure, selon nos connaissances, il s'agit de la première étude réalisée sur l'activité anti-arbovirus des plantes malgaches. L'isolement et l'élucidation structurale des produits bioactifs issus des trois plantes sont dans les perspectives de ce travail. A partir des molécules isolées et identifiées, la mise en place d'une étude de RSA pour comprendre et améliorer leur activité est envisageable. En outre, une étude approfondie de leur mécanisme d'action est également intéressante en particulier pour *W. indica* qui agit durant les phases tardives du cycle du virus.

II. Etude de la relation entre la structure chimique des dérivés de flavones/flavonols et leur activité antivirale

Les plantes médicinales malgaches offrent une grande variété de substances naturelles comme les composés phénoliques et les flavonoïdes pouvant être exploités dans la chimie médicinale. Ces métabolites secondaires sont largement abondants et courants dans la majorité des espèces végétales, dans les ingrédients alimentaires et même dans les sous-produits de transformation de plantes malgaches (Rasoanaivo et al., 2014; Rabemahefa et al., 2021; Ranarijaona et al., 2021). La recherche sur les flavonoïdes d'origine végétale prend un intérêt croissant en raison de leurs bienfaits polyvalents pour la santé humaine d'après les résultats de diverses recherches épidémiologiques comme les maladies virales. Plusieurs études ont souligné l'activité antivirale des flavones, flavonols et ses dérivés au niveau des premiers stades de l'infection virale, des protéines virales ou même dans la réduction de l'inflammation causée par ces pathologies (Di Petrillo et al., 2022).

Une étude au sein de l'UMR PIMIT a montré le potentiel antiviral de l'isoquercitrine contre ZIKV sur différentes lignées cellulaires (SI > 20) (Gaudry et al., 2018). Par contre, cet effet antiviral est absent avec la quercétine seule et son autre dérivé *O*-glycosylé (hypéroside). Dans le but de comprendre et d'améliorer l'effet antiviral de l'isoquercitrine et d'autres dérivés de la quercétine, un programme de synthèse a été mis en place, afin de comprendre la relation entre l'activité antivirale et la structure chimique de ces molécules. L'approche consiste à confirmer **l'importance d'un substituant polaire et hydrophile sur le noyau quercétine**. Dans ce cadre, la stratégie de recherche s'est attachée à synthétiser et à

caractériser des dérivés peu polaires de la quercétine d'une part et des analogues polaires d'autre part. En parallèle, on a défini des paramètres pour mieux comprendre **l'influence de l'entité glycosidique** dans l'activité antivirale de l'isoquercitrine.

L'évaluation antivirale des dérivés peu polaires de la quercétine (dérivés *O*-alkylés et *O*-acétylés) a montré un effet significatif avec une seule molécule qui est le composé (12) (Figure 42) avec un SI = 10,5. Ce composé (12) possède un mécanisme d'action différent de celui de l'isoquercitrine. Il agit durant les phases précoces et les phases tardives du cycle viral sans impacter la croissance cellulaire. Le résultat observé est similaire à celui obtenu avec berbérine (Ratanakomol et al., 2021). Il a été démontré que cette dernière inhibe l'infection de la dengue par deux mécanismes différentes en inhibant directement le virion mais également en agissant sur des phases tardives (Ratanakomol et al., 2021).

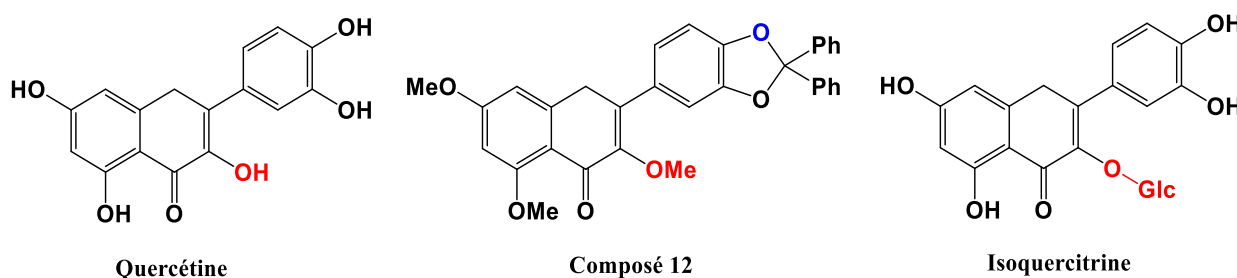


Figure 43- Structures chimiques de la quercétine, du composé 12 et de l'isoquercitrine

La majorité des dérivés *O*-alkylés et *O*-acétylés de la quercétine n'affectent pas l'infection virale. Premièrement, ces molécules restent moins polaires ainsi moins solubles dans l'eau. On a constaté que certains ont la difficulté de se solubiliser dans le diméthylsulfoxyde ou se cristallisent facilement dans le milieu de culture. Cela pourra impacter leur adsorption dans les cellules et freiner par la suite leur interaction avec l'agent pathogène. Deuxièmement, au contraire de la quercétine et de l'isoquercitrine, ces structures peu polaires ne portent pas des hydrogènes labiles enlevant ainsi la possibilité d'une liaison hydrogène avec une protéine virale ou cellulaire. L'ensemble de ces résultats indique que les groupements OH libres ou des substituants portant des OH libres sont indispensables pour un effet antiviral. Ce qui concorde avec notre hypothèse de départ sur l'impact d'une entité polaire et hydrophile dans l'activité antivirale d'une molécule.

Pour la caractérisation antivirale des dérivés polaires de la quercétine, deux types de structure ont été pris en compte : les dérivés non glycosilés et les dérivés glycosilés.

1) Dérivés non glycosilés

Les essais de synthèse semblent être compliqués en raison de la réactivité de la quercétine avec ses 5 groupements OH et de sa difficulté à se dissoudre dans des solvants organiques. Parmi les méthodes de synthèse testées, la réaction de Mitsunobu nous a donné une substitution sélective. On a pu ajouter un tétraéthylène glycol sur un seul groupement hydroxyle avec un rendement assez faible. En raison de l'acidité élevée de 7-OH (Jurd, 1958), il est fort probable que l'étherification s'effectue sur cette position. Par contre, l'évaluation antivirale de ce composé synthétisé n'a montré aucun effet. Certes, ce résultat contredit l'hypothèse fixée sur l'implication d'un substituant hydrophile dans l'effet antiviral. Il est à remarquer que le tétraéthylèneglycol constitue un groupement volumineux encombrant la structure chimique. En plus, il ne porte pas des groupements OH libres.

2) Les dérivés glycosilés

Les glycosides de flavonoïdes peuvent se trouver sous deux formes : C-glycoside et O-glycoside. En collaboration avec le laboratoire ICBMS, une évaluation de l'activité antivirale d'une vingtaine de flavones C-glycosydes a été entreprise et a mis en exergue l'absence d'inhibition. Dans ce cas, mon travail s'est concentré particulièrement sur les quercétines O-glycosides. Une trentaine de dérivés O-glycosylés et analogues de l'isoquercitrine ont été testés. Les résultats obtenus ont montré une molécule (composé 23) avec une activité antivirale modérée (SI =4,9). Ce composé possède une structure de base similaire au composé (12) sauf par la présence du glucose en position 5 (Figure 44). Son effet antiviral peut provenir de la protection de la fonction catéchol en tenant compte des résultats observés (Figure 44). Toutefois, on ne peut pas tirer de conclusion sur l'impact de cette fonction catéchol dans la conservation de l'effet antiviral des dérivés de la quercétine en raison des résultats contradictoires observés.

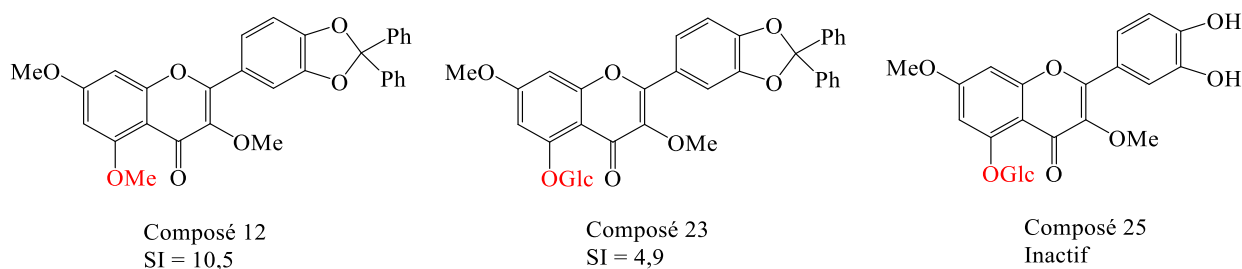


Figure 44- Comparaison des structures chimiques et de l'activité antivirale des composés 12, 23 et 25

Les études avec les flavonols *O*-glycosides a permis également de sortir quatre points essentiels au sujet des rôles de certains substituants chimiques de l'isoquercitrine dans son effet antiviral contre le zika et la dengue.

- Le glucose est primordial à l'activité antivirale

Gaudry et ses collaborateurs ont montré que l'hypéroside (quercétin-3-*O*-galactose) ne possède pas une activité antivirale contre ZIKV (Gaudry et al., 2018). Les résultats que j'ai obtenus ont également révélé que la substitution du glucose par un autre groupement chimique ou un autre sucre annule le potentiel antiviral de l'isoquercitrine. Ainsi, le glucose pourra jouer un rôle important par une possible interaction spécifique durant le cycle viral (Figure 45).

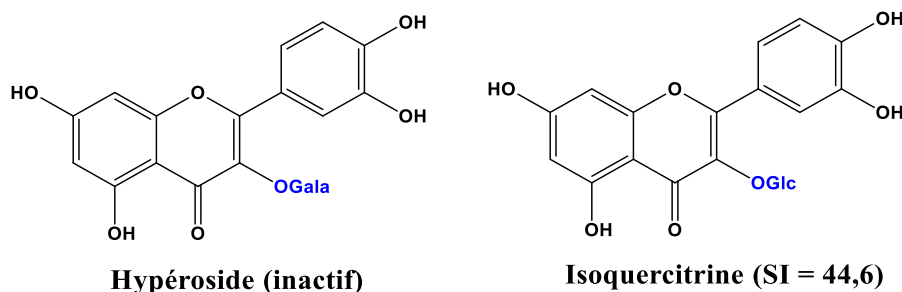


Figure 45- Comparaison des stuctures chimiques et de l'activité antivirale de l'hypéroside et de l'isoquercitrine

Des travaux de recherches ont montré que l'isoquercitrine est plus biodisponible que la quercétine et d'autres dérivés *O*-glycosylés chez des mammifères (rats et chiens). Sa biodisponibilité est similaire à celui du polyphénol EGCG qui a la capacité de passer à travers plusieurs types de tissus organiques (Moon et al., 2008; Reinboth et al., 2010; Valentová et al., 2014; Čvorović et al., 2018). Ce qui pourrait être à l'origine de son effet anti-ZIKV. D'autres résultats ont mis en évidence l'activité de la quercétine et de l'isoquercitrine contre des herpèsvirus comme le VZV (Varicella-zoster virus) et HCMV (Human cytomegalovirus) sur des fibroblastes du prépuce humains (HFF) (Kim et al., 2020). Des investigations de l'activité de la quercétine contre le DENV-2 de la Nouvelle Guinée sur des cellules Vero,

BHK-21 et sur les cellules U937 d'une part (Zandi et al., 2011b; Jasso-Miranda et al., 2019) et contre ZIKV (souche virale de Guangzhou) sur des cellules Vero (Zou et al., 2020) d'autre part, ont donné des résultats positifs. Par conséquent, il n'est pas à exclure que l'activité antivirale de ces molécules dépendent des paramètres et conditions des expériences *in vitro* mais également des types de virus testés.

- L'emplacement du glucose sur le OH en 3 est essentiel

L'évaluation antivirale a montré un résultat négatif avec la quercimeritrine portant un glucose sur la position 7-OH (Figure 46). En déduction, la présence d'un *O*-glucoside en position 3 de la quercétine est spécifique et nécessaire pour inhiber l'infection *in vitro*. On peut en déduire que la présence du groupement carbonyle en 4, la double liaison (2,3) ainsi que la liaison glucosidique en 3 pourront contribuer à apporter à l'isoquercitrine son effet antiviral.

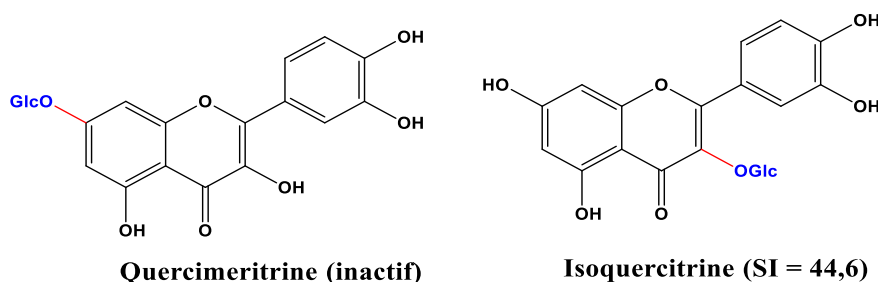


Figure 46- Comparaison des structures chimiques et de l'activité antivirale de la quercimeritrine et de l'isoquercitrine

- Le nombre de sucres rattachés peut-il avoir un impact sur l'activité anti-ZIKV ?

Les résultats obtenus ont montré que la présence d'un autre glucose en position 4' sur le noyau B a supprimé l'effet antiviral observé avec l'isoquercitrine (Figure 47). Cela pourra s'expliquer par un souci d'encombrement au niveau du noyau B ou par la polarité élevée de la molécule (Nile et al., 2017) empêchant son passage des barrières cellulaires. Une étude a montré que la biodisponibilité de la quercétine diglucoside est approximativement similaire à celle de la quercétine aglycone (Kashino et al., 2015) et inférieure à celle de l'isoquercitrine. Avec ces résultats, on ne peut pas tirer une conclusion sur l'impact de nombre de sucres attachés sur l'activité antivirale de la quercétine.

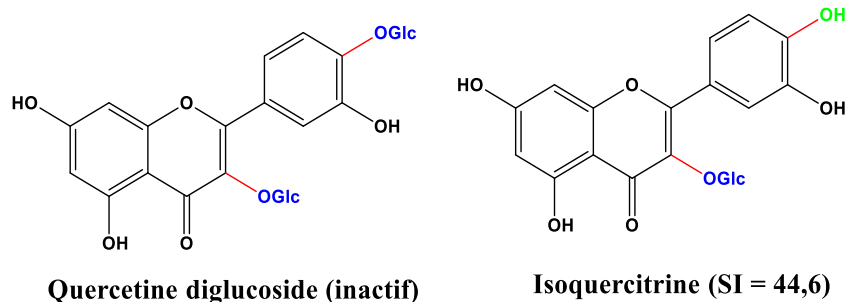


Figure 47- Comparaison des structures chimiques et de l'activité antivirale de la quercétine diglucoside et de l'isoquercitrine

- Le groupement –OH en position 3' du noyau B est indispensable pour l'activité antivirale

L'absence de l'hydroxyle en 3' (cas de l'astragaline) et l'ajout d'un substituant au niveau de la fonction catéchol (cas du composé 20) ont éliminé le potentiel antiviral (Figure 48). L'importance de la fonction catechol a déjà été montré dans l'effet antioxydant des flavonoïdes (Nile et al., 2017; Shubina et al., 2021). Selon les résultats observés, le même mécanisme est approximativement possible dans leur effet antiviral (Figure 48).

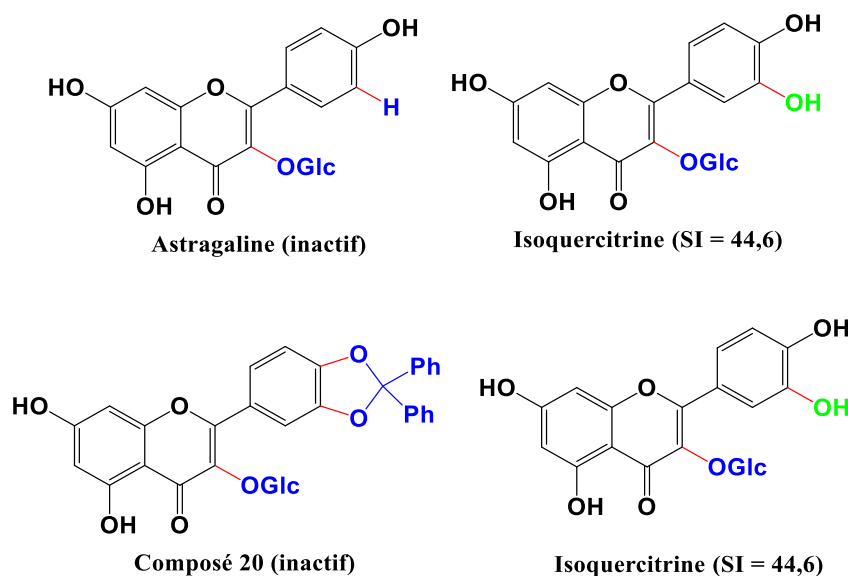


Figure 48- Comparaison des structures chimiques et de l'activité antivirale de l'astragaline, du composé 20 et de l'isoquercitrine

Il est également à noter que les analogues de l'isoquercitrine avec la fonction catéchol protégée ou un substituant de glucose acétylé ont des difficultés à se dissoudre dans le DMSO comme le cas des dérivés *O*-alkylés et *O*-acétylés.

Pour conclure, l'hypothèse de départ affirme qu'un substituant polaire et hydrophile sur le noyau quercétine influence l'effet antiviral de l'isoquercitrine. De ce fait, un programme de synthèse chimique menant à étudier la relation entre l'activité antivirale (RSA) et la structure chimique a été réalisé sur une cinquantaine de flavones et/ou flavonols (dérivés peu polaires et dérivés polaires). Les résultats ont mis en évidence l'activité antivirale d'un dérivé *O*-alkylé de la quercétine (composé 12) avec un effet 4 fois moins élevé et un mode d'action différent par rapport à l'isoquercitrine. Un dérivé *O*-glycoside (composé 23) avec des OH substitués par des méthyles a présenté également un effet antiviral modéré. L'étude de RSA avec ces exemples a permis de confirmer à moitié l'hypothèse de départ basée sur l'importance des groupements OH libres et labiles en particulier sur les positions 3 et 3' pour avoir un effet antiviral. Toutefois, il a été constaté que le glucose sur le 3-OH de l'isoquercitrine joue un rôle spécifique autre qu'un apport de solubilité et d'hydrophilie dans son activité antivirale. Ces données forgent la propriété antivirale intéressante et spécifique de l'isoquercitrine par rapport aux autres flavonols.

Comme perspectives, une étude antivirale avec d'autres analogues de structures proches de l'isoquercitrine reste importante pour faire sortir le pharmacophore responsable de son effet antiviral. Dans ce contexte, il faut étudier d'autres dérivés polaires de la quercétine avec des substituants amines ou acides pour estimer l'hypothèse de solubilité. Un emplacement exact des substituants polaires sur la position 3 est également nécessaire pour imiter l'isoquercitrine. Des évaluations antivirales avec d'autres quercétine-3-*O*-glycosides sont à envisager pour confirmer l'influence de la nature du sucre. Par ailleurs, il faut évaluer d'autres dérivés substitués en di, tri, tétra et pentaglycosylés afin de compléter l'étude de RSA.

Concernant les composés (12) et (23), des tests supplémentaires sont à envisager pour caractériser son mécanisme d'action antivirale.

Quant aux essais de synthèse des dérivés de la quercétine, des optimisations sur les paramètres de réaction sont à envisager pour une meilleure conversion avec la réaction de Mitsunobu. En outre, des analyses RMN 2D (HMBS, COSY, NOESY) sont dans les perspectives pour confirmer l'emplacement spécifique au niveau du groupement OH.

Pour finir, il est très intéressant d'élaborer des essais virologiques plus approfondis au niveau du mécanisme d'action antivirale de l'isoquercitrine durant l'étape internalisation pour identifier la protéine et/ou le processus ciblé

Matériels et méthodes

Matériel végétal

Les parties utilisées de chaque plante (feuilles, tiges, racines ou partie aérienne) ont été récoltées dans les régions du centre et Moyen-Ouest de Madagascar. Les parties aériennes de *S. inuloides* ainsi que les feuilles de *S. ericoides* ont été récoltées en 2017 à Beronono dans la région de Vakinankaratra. Les coordonnées géographiques de la collecte de *S. ericoides* sont 19°53,771' Sud et 47°32,812' Est. Tandis que la collecte de *S. inuloides* a été effectuée exactement sur les coordonnées : 19°53,493' Sud et une longitude de 47°31,867' Est. Les parties aériennes de *W. indica* sont collectées à Majunga. Deux collectes ont été effectuées, la première récolte a eu lieu en septembre 2020 et la deuxième en novembre 2020. L'identification taxonomique de ces espèces végétales a été authentifiée par les botanistes du Parc National Botanique et Zoologique de Tsimbazaza. Le séchage de la plante a été effectué par la suite pendant une semaine à l'abri de la lumière dans une chambre sèche et aérée. Une fois séchées, les plantes ont été broyées puis conservées dans des sachets plastiques opaques et hermétiques.

Préparation des extraits de plantes

La méthode d'extraction utilisée a été la macération à froid. Les poudres de plantes ont été macérées dans le solvant choisi pendant 72 heures à température ambiante sans chauffage. Cinq à six lavages successifs ont été réalisés pour récupérer le maximum de produits naturels dans les plantes. Le solvant d'extraction a été ensuite éliminé en moyen d'un évaporateur rotatif à 40°C. Les extraits secs sont conservés dans un flacon en verre bien fermé à -20°C. Enfin, un stock d'échantillon de 100 mg. mL⁻¹ dans du diméthylsulfoxyde pour chaque extrait a été préparé pour les tests biologiques.

Tableau 36- Extraction des plantes sélectionnées

Nom botanique	Masse du MV sec (g)	Volume des solvants utilisés (mL)		Rendements (%)	
		Solvant peu polaire	Solvant polaire	Solvant peu polaire	Solvant polaire
<i>Artocarpus heterophylla</i>				2,6	11,7
<i>Bidens pilosa</i>				3,2	22
<i>Cassia occidentalis</i>				2,4	18,9
<i>Cajanus cajan</i>				6,8	11,1
<i>Cajanus indicus</i>				7,7	11,5
<i>Cinnamomum camphora</i>				1,6	3,4
<i>Melia azedarach</i>				1,8	17,1
<i>Morinda citrifolia</i>				1,2	28,8
<i>Musa paradisiaca</i>				2,6	19,8
<i>Ocimum canum</i>				5,2	10,1
<i>Psiadia altissima</i>				17,6	34,2
<i>Pentopetia sp</i>				5,1	10
<i>Stenocline ericoides</i>				9,2	25,3
<i>Stenocline inuloides</i>				8,3	22,9
<i>Waltheria indica</i>				1,7	10,7

Fractionnement bioguidé

Le fractionnement bioguidé a été réalisé uniquement avec *W. indica*. La première étape s'agissait de l'extraction liquide-liquide de polarité croissante de solvant. 11g d'extrait EtOH sec ont été dissouts dans un volume de 250 mL d'eau distillé. La solution aqueuse a été lavée successivement par l'hexane puis le DCM, après l'acétate d'éthyle. Les substances polaires restant dans la solution aqueuse constituaient la fraction aqueuse. Les solvants de chaque fraction ont été éliminés au moyen d'un évaporateur rotatif à 40°C.

La deuxième étape consiste à séparer la fraction avec la meilleure activité antivirale. 1 g de la fraction DCM sec a été purifié en moyen d'une chromatographie sur colonne ouverte. Une colonne de diamètre intérieur de 5 cm, remplie avec un gel de silice normale (Macherey-Nagel MN Kieselgel 60, 0,063-0,2 µm) a été utilisée. Le remplissage de la colonne a été réalisé selon la voie humide dans l'éluant choisi. La fraction DCM sèche a été ensuite mélangée avec de la silice pour faire un dépôt solide. L'élution a été effectuée au moyen d'un mélange binaire de deux solvants (hexane et acétate d'éthyle) de polarité croissante. Le suivi de chaque étape de fractionnement a été réalisé par chromatographie sur couche mince. Les fractions de profils CCM similaires ont été regroupées dans un même récipient. Ainsi, 11 fractions ont été obtenues.

Comme l'extrait brut des plantes, les fractions sont conservées dans des flacons en verre à -20°C et des échantillons de 100mg.mL⁻¹ dans du DMSO ont été réservés pour les tests biologiques.

Produits chimiques

Les flavones commerciales (quercétine, kaempférol, isoquercitrine, astragaline, quercimeritrine, quercétine diglucoside), le contrôle (PLA2), les réactifs de synthèse (butan-2-ol, 2-bromobutane, tétraéthylène glycol, diéthylazodicarboxylate ou DEAD, triphénylphosphine ou PPh₃) ont été achetés auprès de Sigma Aldrich.

Synthèses de dérivés de quercétine

Trois voies de synthèse ont été utilisées pour obtenir des dérivés de quercétine : catalyse acide, catalyse par transfert de phase et réaction de Mitsunobu.

Catalyse acide

100 mg de quercétine (0,33 mmol, 1 equiv) ont été dissous dans 0,2 mL de 2-butanol (6 equiv), puis on a ajouté 0,5 mL de H₂SO₄ concentré. Le mélange a été chauffé à 65 °C à 75

°C pendant 65 à 96 h avant d'être neutralisé avec la solution NaOH (1N). Une analyse chromatographique sur couche mince a montré que la réaction n'a pas eu lieu.

Catalyse par transfert de phase

100 mg de quercétine (0,33 mmol, 1 équiv) ont été mélangés avec du 2-bromobutane (36 mmol) dans 5 mL d'éthanol. K_2CO_3 (6 équiv) et le sulfate d'hydrogène de tétrabutylammonium (0,05 équiv) ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a été mis en reflux à 120°C pendant 6 h. Après, le mélange a été filtré et évaporé. Une analyse chromatographique sur couche mince a montré que la réaction a engendré plusieurs produits. Le mélange brut des produits de réaction a été évalué directement contre ZIKV.

Réaction de Mitsunobu

100 mg de quercétine (0,33 mmol, 1 équiv) et 173mg de triphénylphosphine (0,66 mmol, 2 équiv) ont été dissous dans du dichlorométhane (5 mL). L'alcool ou réactif correspondant (2 équivalents) a été ajouté. Ensuite, le diéthylazodicarboxylate (DEAD, 114,9 mg, 2 équiv) a été introduit goutte à goutte à température ambiante. Le mélange réactionnel a été agité à température ambiante pendant 24 heures, filtré et évaporé. Le filtrat concentré a été séparé par chromatographie sur colonne ouverte par gel de silice à l'aide d'un éluant binaire hexane/AcOEt de polarité croissante.

Ethyloxyquercétine, solide jaune ; rendement : 90%, point de fusion = 90,4 à 97,4°C.

Tétraéthylèneglycoxyquercétine, huile jaune ; rendement 22 %

Préparation des échantillons pour les tests biologiques

Tous les extraits, les fractions et les composés ont d'abord été dissouts dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) pour préparer l'échantillon stock à tester. Les échantillons ont été conservés à -20 °C. Pour préparer les différentes concentrations de chaque échantillon, la solution stock mère a été diluée en série dans le milieu de culture cellulaire à une concentration maximale de 2 % de DMSO pour éviter l'agrégation des cellules.

Cellules, Virus

Des cellules A549 épithéliales pulmonaires humaines (ATCC, CCL-185, Manassas, VA, USA), des cellules épithéliales rénales de singe Vero (ATCC, CCL-81) et des cellules hépatiques humaines HuH7.5 (ATCC, PTA-8561) ont été utilisées pour l'expérience. Le maintien des cellules s'effectue dans du milieu de culture (Modified Eagle's medium ou MEM) complété par 5% (cellules Vero) ou 10% de sérum de veau foetal (SVF) inactivé par la

chaleur, 2 mM. L⁻¹Glutamine, 1 mM de pyruvate de sodium, 100 U. mL⁻¹ de pénicilline, 0,1 mg. mL⁻¹ de streptomycine et 0,5 µg. mL⁻¹ de fungizone. La culture cellulaire doit être réalisée dans une atmosphère à 5% de CO₂ à 37 °C.

Le clone moléculaire ZIKV_{GFP} de la souche ancestrale ZIKV-MR766 a été utilisé pour les criblages antiviraux (Gadea et coll., 2016). Le clone moléculaire ZIKV-BR15, une souche épidémique du Brésil, a été utilisé pour l'évaluation antivirale par titrage par plages de lyse. Des tests ont été également réalisés avec le virus de la dengue. L'isolat clinique DENV-2 (souche UVE/DENV-2/2018/RE/47099) de l'île de la Réunion en 2018 a été fourni en lyophilisation par le projet H2020 « European Virus Archive goes global » (EVAg). Tous les virus ont par la suite été amplifiés dans les cellules Vero E6. La titration DENV et ZIKV a été effectuée par dosage de formation de plaque et pressée en PFU. mL⁻¹.

En collaboration avec l'Institut Fiocruz du Brésil, des tests ont été réalisés avec les souches virales suivantes : a) DENV-1/FGA/89 isolé en 1989 chez un patient sud-américain (GenBank : AF226687) ; b) DENV-2/ICC-265 isolé en 2009 chez une patient brésilien (GenBank : HG235027) ; c) DENV-3/5532 isolé en 2007 chez un patient de dengue hémorragique en Paraguay (GenBank : HG235027°) ; d) DENV-4/TVP360, un clone moléculaire fournit par le Dr Ricardo Galler de la Fondation Oswaldo Cruz en Brésil (GenBank : KU513442). Tous les virus ont été amplifié sur des cellules C6-36 et titrés par immunodétection « foci-forming ».

L'anticorps monoclonal anti-pan flavivirus E 4G2-Alexa Fluor 594 a été acheté auprès de RD Biotech (RD-Biotech, Besançon, France). Un milieu de culture contenant 0,1 % de diméthylsulfoxyde (DMSO) a été utilisé comme véhicule.

Evaluation cytotoxique par MTT

Le test colorimétrique MTT a été utilisé pour quantifier la viabilité cellulaire. Les cellules A549 ont étéensemencées dans une plaque de 96 puits à une densité de 2×10⁴ cellules par puits et traitées avec des dilutions doubles ou quarts des échantillons. Après incubation pendant 24 heures à 37 °C, les cellules ont été lavées avec du tampon phosphate salin (PBS). Ensuite, 100 µL du mélange de culture moyenne et de la solution de tétrazolium MTT (1mg. mL⁻¹) ont été ajoutés à chaque puit. Après 2 heures d'incubation, les cristaux de formazan ont été solubilisés avec 50 à 100 µL de DMSO. Ensuite, l'absorbance a été mesurée au moyen d'un spectrophotomètre à 570 nm (et une correction à 690 nm). La concentration de

cytotoxicité CC_{50} et la concentration maximale non toxique MNTC ont été déterminées à l'aide d'une régression non linéaire sur le logiciel de GraphPad Prism.

Evaluation de l'activité antivirale

Les cellules A549 ont étéensemencées dans une plaque de 96 puits à une densité de 2×10^4 cellules par puits la veille du traitement. Les cellules ont été traitées avec les mêmes concentrations d'échantillons utilisées pendant le test MTT. Pour l'infection, le ZIKV_{GFP} a été utilisé avec une multiplicité d'infection égale à 2. L'incubation dure 24 heures avant l'analyse par cytométrie en flux décrit ci-après.

Test d'inactivation viral

Les cellules A549 ont étéensemencées dans une plaque de 24 puits à une densité de 10^5 cellules par puit la veille du traitement. Les échantillons (concentration MNTC) ont été incubés avec ZIKV_{GFP} (MOI = 2) pendant 1 à 1h30 à 37°C. Le mélange a été ensuite dilué 50 fois dans le MEM 5% puis ajouté sur les cellules avec un temps d'incubation de 2h à 37°C. Après, l'inoculum a été retiré, les cellules ont été rincées avec du PBS et incubées à nouveau avec du MEM 5% jusqu'à 24h à 37°C avant l'analyse par cytométrie en flux décrit ci-après.

Test de l'entrée virale

Les cellules A549 ont étéensemencées dans une plaque de 96 puits à une densité de 2×10^4 cellules par puit la veille du traitement. Les cellules ont été ensuite infectées par ZIKV_{GFP} (MOI = 2) en présence ou sans les échantillons (MNTC) puis incubées à 37°C. 2h post infection, l'inoculum a été retiré, les cellules ont été rincées avec du PBS et incubées à nouveau avec du MEM 5% jusqu'à 24h à 37°C avant l'analyse par cytométrie en flux décrit ci-après.

Test de la réplication virale

Les cellules A549 ont étéensemencées dans une plaque de 96 puits à une densité de 2×10^4 cellules par puit la veille du traitement. Les cellules ont été ensuite infectées par ZIKV_{GFP} (MOI = 2) pendant 2h d'incubation. Après, l'inoculum a été retiré, les cellules ont été rincées avec du PBS et traitées avec les échantillons (MNTC) jusqu'à 24h à 37°C avant l'analyse par cytométrie en flux décrit ci-après.

Test d'attachement viral

Les cellules A549 ont étéensemencées dans une plaque de 96 puits à une densité de 2×10^4 cellules par puit la veille du traitement. Les cellules ont été ensuite déposées à 4°C pendant 30 min. Elles ont été infectées après avec ZIKV_{GFP} en présence ou sans les échantillons (MNTC). Après 1h d'incubation à 37°C , l'inoculum viral a été enlevé et remplacé par du MEM 5%. La technique d'analyse par cytométrie en flux a été appliquée comme décrit ci-après.

Cytométrie en flux

Après le temps d'incubation de 24 h, les cellules ont été rincées, trypsinisées puis fixées dans du mélange paraformaldéhyde (PFA) / MEM (5% SVF) 3,7% pendant 10 minutes. Les analyses ont été réalisées au moyen des cytomètres FACSan ou Cyto FLEX par l'utilisation des logiciels Flowjo et CytExpert respectivement.

Titrage par plages de lyse

Les cellules Vero ont étéensemencées dans des plaques de 24 puits à une densité de 8×10^4 cellules par puit la veille du traitement. Les cellules ont été incubées avec 200 μL de surnageant contenant des dilutions en série de 10 en 10 de suspension virale pendant 2h d'incubation à 37°C . Ensuite, 300 μL de solution MEM 5% SVF / carboxyméthylcellulose (CMC) (0,8%) ont été ajoutés. Après 4 jours d'incubation à 37°C , les cellules ont été lavées 2 à 3 fois avec du PBS pour enlever les cristaux du CMC. Puis, elles ont été fixées avec du PFA (3,7%) pendant 10 minutes. Les cellules ont été colorées par une solution de cristal violet (0,5%) diluée dans l'éthanol 20%. Les plages de lyse ont été comptées dans chaque puit et le titre est exprimé en PFU.mL⁻¹.

Toxicité aigüe *in vivo* avec les poissons zèbres

Les poissons-zèbres sauvages adultes (*Danio rerio*; mâle de 6 mois) ont été maintenus dans des conditions de température (28°C), de photopériode (14/10h de lumière/d'obscurité) et de conductivité (400 μS). Les poissons étaient nourris trois fois en une journée.

Après avoir anesthésié les poissons avec 0,02 % de tricaine (MS-222 ; REF : A5040, Sigma-Aldrich), des injections intrapéritonéales ont été effectuées pour les témoins respectifs (MEM, DMSO), *S. ericoides* (100 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de poids corporel) et *S. inuloides* (100 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de poids corporel) (n=5 pour chaque groupe).

Après l'injection, les poissons ont été remis dans leur réservoir. Ils ont été soigneusement contrôlés pour déceler tout signe frappant de stress, d'activité locomotrice et de problèmes de comportement alimentaire (Colwill and Creton, 2011). Un jour après l'injection (jpi), tous les poissons ont été surveillés pour leur activité locomotrice à l'aide de l'équipement ZebraCube (Viewpoint) décrit précédemment. Brièvement, chaque poisson a été placé dans des réservoirs séparés contenant 750 mL d'eau, ce qui correspond à une hauteur de colonne de 7 cm. Ensuite, les réservoirs ont été placés dans le ZebraCube. Une séparation a été placée entre les réservoirs témoins et les réservoirs d'échantillonnage pour éviter l'interaction visuelle entre les poissons de chaque groupe. Les poissons ont été brièvement adaptés à leur nouveau réservoir pendant 10 minutes. Puis, l'activité locomotrice a été enregistrée pendant 10 minutes définissant les états d'inactivité ($<4 \text{ mm.s}^{-1}$), de petites activités ($4-8 \text{ mm.s}^{-1}$) ou de grandes activités ($>8 \text{ mm.s}^{-1}$). Toutes les expériences sur des animaux ont été menées conformément aux lignes directrices françaises et européennes pour l'utilisation des animaux dans la recherche (86/609/CEE et 2010/63/UE) et approuvées par le comité d'éthique local pour l'expérimentation animale de CYROI (APAFIS #2019052910002738_v4). À la fin de la procédure, les animaux ont été sacrifiés avec surdosage de tricaine.

Analyse HRMS

Les analyses HRMS ont été réalisées avec une chaîne ACQUITY UPLC I-Class PLUS couplée à un spectromètre Vion IMS QToF, Waters. Les échantillons sont dissous à $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ dans MeOH/DMSO 90/10. On a injecté un volume de $10 \mu\text{L}$ pour chaque échantillon avec un débit de $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$. La température de l'injecteur est de $10 \text{ }^\circ\text{C}$. Le gradient d'éluion a été un mélange acétonitrile/eau 0/100 v/v (+ 0.1 % acide formique) pendant 1 min, puis 50/50 en 6 min jusqu'à 100/0 en 3 min puis 1 min à 100/0.

La colonne utilisée s'agit de la colonne HSS T3 $2.1 \times 100 \text{ mm}$, $1.8 \mu\text{m}$. A l'intérieur de la colonne, la température est de $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

L'analyse est réalisée selon DDA (Data Dependant Acquisition) en mode positif, sur gamme m/z 50-1400 avec fragmentation des 5 ions les plus intenses au-delà du seuil 500. Le temps de scan MS2 est 0,1s avec une rampe d'énergie de collision : 20 à 40V (molécules de faible m/z) et 30 à 60 V.

Les données sont pré-traitées par Progenesis QI, Waters. Les réseaux moléculaires sont générés au moyen de MetGem 1.3.6 avec un indice de cosine score minimum à 0.65.

Analyses statistiques

Les valeurs sont exprimées comme moyenne \pm SEM d'au moins deux expériences indépendantes. Les analyses des données et statistiques ont été réalisées au moyen du logiciel Graph-Pad Prism version 8.0. L'analyse ANOVA (one-way) a été effectuée pour comparer les différentes doses des échantillons ou les différents protocoles expérimentaux. 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 bibliographiques

Abd Kadir, S. L., Yaakob, H., and Mohamed Zulkifli, R. (2013). Potential anti-dengue medicinal plants: a review. *J Nat Med* 67, 677–689. doi: 10.1007/s11418-013-0767-y.

Abdul Ahmad, S. A., Palanisamy, U. D., Tejo, B. A., Chew, M. F., Tham, H. W., and Syed Hassan, S. (2017). Geraniin extracted from the rind of *Nephelium lappaceum* binds to dengue virus type-2 envelope protein and inhibits early stage of virus replication. *Virology Journal* 14, 229. doi: 10.1186/s12985-017-0895-1.

Adou, E., Miller, J. S., Ratovoson, F., Birkinshaw, C., Andriantsiferana, R., Rasamison, V. E., et al. (2010). Antiproliferative cardenolides from *Pentopetia androsaemifolia* from the Madagascar rain forest. *Indian J Exp Biol* 48, 248–257.

Agati, G., and Tattini, M. (2010). Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *The New Phytologist* 186, 786–793.

Ahn, C., Correia, R., and DeShong, P. (2002). Mechanistic study of the Mitsunobu reaction. *The Journal of Organic Chemistry* 67, 1751–1753. doi: 10.1021/jo001590m.

Akhtar, I. N. (2020). “Chapter 6 - Viral genetics and structure,” in *Dengue Virus Disease From Origin to Outbreak*, eds. A. I. Qureshi and O. Saeed (Academic Press), 85–113. doi: 10.1016/B978-0-12-818270-3.00006-0.

Albanese, D., Landini, D., Maia, A., and Penso, M. (1999). Phase transfer catalysis: some recent applications in organic synthesis. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 150, 113–131. doi: 10.1016/S1381-1169(99)00219-8.

Alen, M. M. F., Burghgraeve, T. D., Kaptein, S. J. F., Balzarini, J., Neyts, J., and Schols, D. (2011). Broad Antiviral Activity of Carbohydrate-Binding Agents against the Four Serotypes of Dengue Virus in Monocyte-Derived Dendritic Cells. *PLoS ONE* 6, e21658. doi: 10.1371/journal.pone.0021658.

Ali, F., Chorsiya, A., Anjum, V., Khasimbi, S., and Ali, A. (2021). A systematic review on phytochemicals for the treatment of dengue. *Phytotherapy Research* 35, 1782–1816. doi: 10.1002/ptr.6917.

Allard, P.-M., Dau, E. T. H., Eydoux, C., Guillemot, J.-C., Dumontet, V., Poullain, C., et al. (2011). Alkylated Flavanones from the Bark of *Cryptocarya chartacea* As Dengue Virus NS5 Polymerase Inhibitors. *J. Nat. Prod.* 74, 2446–2453. doi: 10.1021/np200715v.

Allard, P.-M., Leyssen, P., Martin, M.-T., Bourjot, M., Dumontet, V., Eydoux, C., et al. (2012). Antiviral chlorinated daphnane diterpenoid orthoesters from the bark and wood of

Trigonostemon cherrieri. *Phytochemistry* 84, 160–168. doi: 10.1016/j.phytochem.2012.07.023.

Alshammari, S. A., Alamri, Y. S., Rabhan, F. S., Alabdullah, A. A., Alsanie, N. A., Almarshad, F. A., et al. (2018). Overview of dengue and Zika virus similarity, what can we learn from the Saudi experience with dengue fever? *Int J Health Sci (Qassim)* 12, 77–82.

Amiot, M. J., Aubert, S., Gonnet, M., and Tacchini, M. (1989). Les composés phénoliques des miels : étude préliminaire sur l'identification et la quantification par familles. *Apidologie* 20, 115–125.

Andrianarisoa, A. C. F., Rakotoson, J., Randretsa, M., Rakotondravelo, S., Rakotoarimanana, R. D., Rakotomizao, J., et al. (2007). Madagascar : la situation sanitaire dans la grande Ile au début du XXIème siècle. *Médecine Tropicale* 67, 19–29.

Atif, M., Azharuddin, M., Rahman, S., and Mahmood, S. (2014). Evaluation of anticataract potential of *Waltheria indica* in albino rats. *Asian Journal of plant sciences and research* 2014, 52–58.

Badshah, S. L., Faisal, S., Muhammad, A., Poulson, B. G., Emwas, A. H., and Jaremko, M. (2021). Antiviral activities of flavonoids. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 140, 111596. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111596.

Balasubramanian, A., Pilankatta, R., Teramoto, T., Sajith, A. M., Nwulia, E., Kulkarni, A., et al. (2019). Inhibition of dengue virus by curcuminoids. *Antiviral Res* 162, 71–78. doi: 10.1016/j.antiviral.2018.12.002.

Balès, N. (2014). Les-PEGs. Université de Québec Available at: <http://www.uqac.ca/cosmetologie/wp-content/uploads/2015/09/Les-PEG-Nina-2014.pdf> [Accessed September 30, 2022].

Barbi, L., Coelho, A. V. C., Alencar, L. C. A. de, and Crovella, S. (2018). Prevalence of Guillain-Barré syndrome among Zika virus infected cases: a systematic review and meta-analysis. *Braz J Infect Dis* 22, 137–141. doi: 10.1016/j.bjid.2018.02.005.

Barnett, R. (2017). Dengue. *Lancet* 390, 10106. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32651-X.

Barrett, A. D. T., and Weaver, S. C. (2012). “51 - Arboviruses: alphaviruses, flaviviruses and bunyaviruses: Encephalitis; yellow fever; dengue; haemorrhagic fever; miscellaneous tropical fevers; undifferentiated fever,” in *Medical Microbiology (Eighteenth*

Edition), eds. D. Greenwood, M. Barer, R. Slack, and W. Irving (Edinburgh: Churchill Livingstone), 520–536. doi: 10.1016/B978-0-7020-4089-4.00066-4.

Barzon, L., Pacenti, M., Berto, A., Sinigaglia, A., Franchin, E., Lavezzo, E., et al. (2016). Isolation of infectious Zika virus from saliva and prolonged viral RNA shedding in a traveller returning from the Dominican Republic to Italy, January 2016. *Eurosurveillance* 21, 30159. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.10.30159.

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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 453, 539–544. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.09.113.

Basiru, A., and Olayemi, F. O. (2014). Effects of aqueous extract of *Waltheria indica* leaves on blood profile of male albino rats. *Journal of Medicinal Plant Research* 8, 1223–1229. doi: DOI: 10.5897/JMPR2014.5477.

Batchelor, P., and Petersen, K. (2015). Japanese encephalitis: a review of clinical guidelines and vaccine availability in Asia. *Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines* 1, 11. doi: 10.1186/s40794-015-0013-6.

Batista, M. N., Braga, A. C. S., Campos, G. R. F., Souza, M. M., de Matos, R. P. A., Lopes, T. Z., et al. (2019). Natural Products Isolated from Oriental Medicinal Herbs Inactivate Zika Virus. *Viruses* 11, 49. doi: 10.3390/v11010049.

Bawin, T., Seye, F., Boukraa, S., Zimmer, J.-Y., Delvigne, F., and Francis, F. (2015). La lutte contre les moustiques (Diptera: Culicidae): diversité des approches et application du contrôle biologique. *The Canadian Entomologist* 147, 476–500. doi: 10.4039/tce.2014.56.

Bean, W. B. (1983). Walter Reed and Yellow Fever. *JAMA* 250, 659–662. doi: 10.1001/jama.1983.03340050071035.

Benavente-García, O., Castillo, J., Del Baño, M. J., and Lorente, J. (2001). Improved water solubility of neohesperidin dihydrochalcone in sweetener blends. *J Agric Food Chem* 49, 189–191. doi: 10.1021/jf000186l.

Bernatchez, J. A., Tran, L. T., Li, J., Luan, Y., Siqueira-Neto, J. L., and Li, R. (2020). Drugs for the Treatment of Zika Virus Infection. *J Med Chem* 63, 470–489. doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b00775.

Besnard, M., Eyrolle-Guignot, D., Guillemette-Artur, P., Lastère, S., Bost-Bezeaud, F., Marcelis, L., 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. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.13.30181.

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. doi: 10.2807/1560-7917.ES2014.19.13.20751.

Bhakat, S., Delang, L., Kaptein, S., Neyts, J., Leyssen, P., and Jayaprakash, V. (2015). Reaching beyond HIV/HCV: nelfinavir as a potential starting point for broad-spectrum protease inhibitors against dengue and chikungunya virus. *RSC Advances* 5, 85938–85949. doi: 10.1039/C5RA14469H.

Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., et al. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496, 504–507. doi: 10.1038/nature12060.

Blahove, M. R., and Carter, J. R. (2021). Flavivirus Persistence in Wildlife Populations. *Viruses* 13, 2099. doi: 10.3390/v13102099.

Blanchard, J.-M. (2007). Cinnamomum camphora à cinéole (ravintsara), une plante au service de la prévention des infections nosocomiales en milieu hospitalier? *Phytothérapie* 5, 15–20. doi: 10.1007/s10298-007-0202-1.

Blanpin, O., Pais, M., and Quevauviller, M. A. (1963). Pharmacodynamic study of adouetin Z, alkaloid of *Waltheria americana* L. (*Sterculia*). *Annales Pharmaceutiques Francaises* 21, 147–150.

Bonaldo, M. C., Ribeiro, I. P., Lima, N. S., Santos, A. A. C. dos, Menezes, L. S. R., Cruz, S. O. D. da, et al. (2016). Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of Patients in Brazil. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 10, e0004816. doi: 10.1371/journal.pntd.0004816.

Borokini, T. I., and Omotayo, F. O. (2012). Phytochemical and ethnobotanical study of some selected medicinal plants from Nigeria. *JMPR* 6, 1106–1118. doi: 10.5897/JMPR09.430.

Bos, S., Gadea, G., and Despres, P. (2018). Dengue: a growing threat requiring vaccine development for disease prevention. *Pathogens and Global Health* 112, 294–305. doi: 10.1080/20477724.2018.1514136.

Bouree, P. (2016). A new pandemic: Zika Virus Infection. *La Revue Du Praticien* 66, 641–647.

Bourjot, M., Leyssen, P., Eydoux, C., Guillemot, J.-C., Canard, B., Rasoanaivo, P., et al. (2012a). Chemical constituents of *Anacolosa pervilleana* and their antiviral activities. *Fitoterapia* 83, 1076–1080. doi: 10.1016/j.fitote.2012.05.004.

Bourjot, M., Leyssen, P., Eydoux, C., Guillemot, J.-C., Canard, B., Rasoanaivo, P., et al. (2012b). Flacourtosides A–F, Phenolic Glycosides Isolated from *Flacourtia ramontchi*. *J. Nat. Prod.* 75, 752–758. doi: 10.1021/np300059n.

Brandão, G. C., Kroon, E. G., Souza, D. E. R., Filho, J. D. S., and Oliveira, A. B. (2013). Chemistry and Antiviral Activity of *Arrabidaea pulchra* (Bignoniaceae). *Molecules* 18, 9919–9932. doi: 10.3390/molecules18089919.

Brecher, M., Zhang, J., and Li, H. (2013). The flavivirus protease as a target for drug discovery. *Virology* 28, 326–336. doi: 10.1007/s12250-013-3390-x.

Bresson, R. D., Mariotte, A. M., Boumendjel, A., and Perrier, E. (1999). Nouveaux esters de flavonoides, leur utilisation en cosmétique, dermatopharmacie, en pharmacie et en agro-alimentaire. Available at: <https://patents.google.com/patent/FR2778663A1/fr> [Accessed September 11, 2022].

Bullard-Feibelman, K. M., Govero, J., Zhu, Z., Salazar, V., Veselinovic, M., Diamond, M. S., et al. (2017). The FDA-approved drug sofosbuvir inhibits Zika virus infection. *Antiviral Research* 137, 134–140. doi: 10.1016/j.antiviral.2016.11.023.

Burrell, C. J., Howard, C. R., and Murphy, F. A. (2017). “Chapter 36 - Flaviviruses,” in *Fenner and White’s Medical Virology (Fifth Edition)*, eds. C. J. Burrell, C. R. Howard, and F. A. Murphy (London: Academic Press), 493–518. doi: 10.1016/B978-0-12-375156-0.00036-9.

But, T. Y. S., and Toy, P. H. (2007). The Mitsunobu Reaction: Origin, Mechanism, Improvements, and Applications. *Chemistry – An Asian Journal* 2, 1340–1355. doi: 10.1002/asia.200700182.

Cabral-Castro, M. J., Cavalcanti, M. G., Peralta, R. H. S., and Peralta, J. M. (2016). Molecular and serological techniques to detect co-circulation of DENV, ZIKV and CHIKV in suspected dengue-like syndrome patients. *J Clin Virol* 82, 108–111. doi: 10.1016/j.jcv.2016.07.017.

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. doi: 10.1002/jmv.20786.

Calvet, G., Aguiar, R. S., Melo, A. S. O., Sampaio, S. A., de Filippis, I., Fabri, A., 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. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00095-5.

Cao-Lormeau, V.-M., Blake, A., Mons, S., Lastère, S., Roche, C., Vanhomwegen, J., et al. (2016). Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *The Lancet* 387, 1531–1539. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00562-6.

Cao-Lormeau, V.-M., Roche, C., Teissier, A., Robin, E., Berry, A.-L., Mallet, H.-P., et al. (2014). Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerg Infect Dis* 20, 1085–1086. doi: 10.3201/eid2006.140138.

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. doi: 10.1016/j.virol.2016.06.012.

Carnevale, P., Trari, B., Izri, A., and Manguin, S. (2012). The Five Pillars of Family and Individual Protection against Mosquitoes, Vectors of Pathogenic Agents. *Médecine et Santé Tropicales* 22, 13–21. doi: 10.1684/mst.2012.0004.

Caron, G., Vallaro, M., and Ermondi, G. (2018). Log P as a tool in intramolecular hydrogen bond considerations. *Drug Discovery Today: Technologies* 27, 65–70. doi: 10.1016/j.ddtec.2018.03.001.

Castilla, V., Barquero, A. A., Mersich, S. E., and Coto, C. E. (1998). In vitro anti-junin virus activity of a peptide isolated from *Melia azedarach* L. leaves. *International Journal of Antimicrobial Agents* 10, 67–75. doi: 10.1016/S0924-8579(98)00011-9.

Cataneo, A. H. D., Ávila, E. P., Mendes, L. A. de O., de Oliveira, V. G., Ferraz, C. R., de Almeida, M. V., et al. (2021). Flavonoids as Molecules With Anti-Zika virus Activity. *Frontiers in Microbiology* 12. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.710359>.

Cataneo, A. H. D., Kuczera, D., Koishi, A. C., Zanluca, C., Silveira, G. F., Arruda, T. B. de, et al. (2019). The citrus flavonoid naringenin impairs the in vitro infection of human cells by Zika virus. *Sci Rep* 9, 16348. doi: [10.1038/s41598-019-52626-3](https://doi.org/10.1038/s41598-019-52626-3).

Cazorla, C., Pfordt, É., Duclos, M.-C., Méta y, E., and Lemaire, M. (2011). O-Alkylation of phenol derivatives via a nucleophilic substitution. *Green Chemistry* 13, 2482–2488. doi: [10.1039/C1GC15481H](https://doi.org/10.1039/C1GC15481H).

CDC (2016). Faits concernant la microcéphalie. *Centers for Disease Control and Prevention*. Available at: <https://www.cdc.gov/ncbddd/birthdefects/french/microcephaly.html> [Accessed August 11, 2022].

CDC (2022). Dengue Vaccination: What Everyone Should Know | CDC. *Centers for Disease Control and Prevention*. Available at: <https://www.cdc.gov/vaccines/vpd/dengue/public/index.html> [Accessed September 20, 2022].

Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R., and Rice, C. M. (1990). Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual Review of Microbiology* 44, 649–688. doi: [10.1146/annurev.mi.44.100190.003245](https://doi.org/10.1146/annurev.mi.44.100190.003245).

Chan, J. F.-W., Chik, K. K.-H., Yuan, S., Yip, C. C.-Y., Zhu, Z., Tee, K.-M., et al. (2017). Novel antiviral activity and mechanism of bromocriptine as a Zika virus NS2B-NS3 protease inhibitor. *Antiviral Research* 141, 29–37. doi: [10.1016/j.antiviral.2017.02.002](https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.02.002).

Chandra, F., Lee, W. L., Armas, F., Leifels, M., Gu, X., Chen, H., et al. (2021). Persistence of Dengue (Serotypes 2 and 3), Zika, Yellow Fever, and Murine Hepatitis Virus RNA in Untreated Wastewater. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 8, 785–791. doi: [10.1021/acs.estlett.1c00517](https://doi.org/10.1021/acs.estlett.1c00517).

Chattopadhyay, D. (2008). “Ethnopharmacology: A new engine for the development of antivirals from naturaceuticals,” in *Handbook of Ethnopharmacology* (37/ 661 (2), Fort P.O., Trivandrum -695 023, Kerala, India: Mohamed Eddouks), 129–197. Available at: https://www.academia.edu/8113147/Ethnopharmacology_A_new_engine_for_the_development_of_antivirals_from_naturaceuticals [Accessed August 17, 2022].

Chattopadhyay, D., and Khan, M. T. H. (2008). “Ethnomedicines and ethnomedicinal phytophores against herpesviruses,” in *Biotechnology Annual Review*, ed. M. R. El-Gewely (Elsevier), 297–348. doi: 10.1016/S1387-2656(08)00012-4.

Chattopadhyay, D., and Naik, T. N. (2007). Antivirals of ethnomedicinal origin: structure-activity relationship and scope. *Mini Rev Med Chem* 7, 275–301. doi: 10.2174/138955707780059844.

Chattopadhyay, D., Ojha, D., Mondal, S., and Goswami, D. (2015). “Chapter 8 - Validation of Antiviral Potential of Herbal Ethnomedicine,” in *Evidence-Based Validation of Herbal Medicine*, ed. P. K. Mukherjee (Boston: Elsevier), 175–200. doi: 10.1016/B978-0-12-800874-4.00008-8.

Chavda, V. P., Kumar, A., Banerjee, R., and Das, N. (2022). Ayurvedic and Other Herbal Remedies for Dengue: an Update. *Clinical Complementary Medicine and Pharmacology* 2, 100024. doi: 10.1016/j.ccmp.2022.100024.

Chebil, L. (2006). Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et *Pseudomonas cepacia*: études cinétique, structurale et conformationnelle. Available at: <https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752787> [Accessed September 2, 2022].

Chebil, L., Chipot, C., Archambault, F., Humeau, C., Engasser, J. M., Ghoul, M., et al. (2010). Solubilities inferred from the combination of experiment and simulation. Case study of quercetin in a variety of solvents. *J Phys Chem B* 114, 12308–12313. doi: 10.1021/jp104569k.

Chebil, L., Humeau, C., Anthoni, J., Dehez, F., Engasser, J.-M., and Ghoul, M. (2007). Solubility of Flavonoids in Organic Solvents. *J. Chem. Eng. Data* 52, 1552–1556. doi: 10.1021/je7001094.

Chebil, L., Humeau, C., Falcimaigne, A., Engasser, J.-M., and Ghoul, M. (2006). Enzymatic acylation of flavonoids. *Process Biochemistry* 41, 2237–2251. doi: 10.1016/j.procbio.2006.05.027.

Chen, J., Liang, Y., Yi, P., Xu, L., Hawkins, H. K., Rossi, S. L., et al. (2017). Outcomes of Congenital Zika Disease Depend on Timing of Infection and Maternal-Fetal Interferon Action. *Cell Reports* 21, 1588–1599. doi: 10.1016/j.celrep.2017.10.059.

Chen, Y., Chen, R., Gao, J., Li, C., Liu, J., Zhou, Z., et al. (2021). Effects of Overwintering on the Survival and Vector Competence of *Aedes albopictus* in the Urban Life

Cycle of Dengue Virus in Guangzhou, China. *Viol. Sin.* 36, 755–761. doi: 10.1007/s12250-021-00356-0.

Chen, Y., Gao, J., Yang, L., Li, C., Chen, R., Xie, Z., et al. (2019). A predominant dengue virus-1 endemic strain and the vector competence of *Aedes albopictus* from Guangzhou City, China. *Acta Tropica* 199, 104975. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.03.029.

Chen, Y.-L., Abdul Ghafar, N., Karuna, R., Fu, Y., Lim, S. P., Schul, W., et al. (2014). Activation of Peripheral Blood Mononuclear Cells by Dengue Virus Infection Depotentiates Balapiravir. *Journal of Virology* 88, 1740–1747. doi: 10.1128/JVI.02841-13.

Chesneau, P., Mehdaoui, H., Drault, J. N., de Heaulmes, O., Flament, F., and Elisabeth, L. (1998). Dengue hémorragique chez un patient traité au long cours par un antiagrégant plaquettaire À propos d'un cas mortel en Martinique. *Réanimation Urgences* 7, 665–667. doi: 10.1016/S1164-6756(99)80069-3.

Chiew, K. H., Phoon, M. C., Putti, T., Tan, B. K. H., and Chow, V. T. (2016). Evaluation of antiviral activities of *Houttuynia cordata* Thunb. extract, quercetin, quercetrin and cinanserin on murine coronavirus and dengue virus infection. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 9, 1–7. doi: 10.1016/j.apjtm.2015.12.002.

Chippaux, A. (2003). Généralités sur arbovirus et arboviroses. *Médecine et Maladies Infectieuses* 33, 377–384. doi: 10.1016/S0399-077X(03)00204-X.

Chong, H. Y., Leow, C. Y., Abdul Majeed, A. B., and Leow, C. H. (2019). Flavivirus infection—A review of immunopathogenesis, immunological response, and immunodiagnosis. *Virus Research* 274, 197770. doi: 10.1016/j.virusres.2019.197770.

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. doi: 10.1074/jbc.M410208200.

Cirne-Santos, C. C., de S Barros, C., Rabelo, V. W., Esteves, P. O., Gomes, M. W. L., Teixeira, V. L., et al. (2021). In vitro antiviral activity against Zika virus from a natural product of the Brazilian red seaweed *Bryothamnion triquetrum*. *Acta Virol* 65, 402–410. doi: 10.4149/av_2021_406.

Clain, E., Haddad, J. G., Koishi, A. C., Sinigaglia, L., Rachidi, W., Desprès, P., et al. (2019). The Polyphenol-Rich Extract from *Psiloxylon mauritianum*, an Endemic Medicinal

Plant from Reunion Island, Inhibits the Early Stages of Dengue and Zika Virus Infection. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 1860. doi: 10.3390/ijms20081860.

Clain, E., Sinigaglia, L., Koishi, A. C., Gorgette, O., Gadea, G., Viranaicken, W., et al. (2018). Extract from *Aphloia theiformis*, an edible indigenous plant from Reunion Island, impairs Zika virus attachment to the host cell surface. *Sci Rep* 8, 10856. doi: 10.1038/s41598-018-29183-2.

Collins, M. H., and Metz, S. W. (2017). Progress and Works in Progress: Update on Flavivirus Vaccine Development. *Clinical Therapeutics* 39, 1519–1536. doi: 10.1016/j.clinthera.2017.07.001.

Collins, N. D., and Barrett, A. D. T. (2017). Live Attenuated Yellow Fever 17D Vaccine: A Legacy Vaccine Still Controlling Outbreaks In Modern Day. *Curr Infect Dis Rep* 19, 14. doi: 10.1007/s11908-017-0566-9.

Cologna, R., Armstrong, P. M., and Rico-Hesse, R. (2005). Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol* 79, 853–859. doi: 10.1128/JVI.79.2.853-859.2005.

Colwill, R. M., and Creton, R. (2011). Locomotor behaviors in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Behav Processes* 86, 222–229. doi: 10.1016/j.beproc.2010.12.003.

Cook, N. C., and Samman, S. (1996). Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 7, 66–76. doi: 10.1016/S0955-2863(95)00168-9.

Coppen, J. J. W. (2002). *Eucalyptus: The Genus Eucalyptus*. Taylor&Francis. 11 New Fetter Lane, London EC4P-4EE: CRC Press.

Costin, J. M., Jenwitheesuk, E., Lok, S.-M., Hunsperger, E., Conrads, K. A., Fontaine, K. A., et al. (2010). Structural Optimization and De Novo Design of Dengue Virus Entry Inhibitory Peptides. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 4, e721. doi: 10.1371/journal.pntd.0000721.

Couillard, M. (2002). Le virus du Nil occidental à la conquête de l'Amérique. *Le médecin du Québec* 37. Available at: <https://lemedecinduquebec.org/Media/74292/079-085Couillard0502.pdf> [Accessed November 5, 2022].

Cretton, S., Breant, L., Pourrez, L., Ambuehl, C., Marcourt, L., Ebrahimi, S. N., et al. (2014). Antitrypanosomal Quinoline Alkaloids from the Roots of *Waltheria indica*. *J. Nat. Prod.* 77, 2304–2311. doi: 10.1021/np5006554.

Cretton, S., Bréant, L., Pourrez, L., Ambuehl, C., Perozzo, R., Marcourt, L., et al. (2015). Chemical constituents from *Waltheria indica* exert in vitro activity against *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Fitoterapia* 105, 55–60. doi: 10.1016/j.fitote.2015.06.007.

Cretton, S., Dorsaz, S., Azzollini, A., Favre-Godal, Q., Marcourt, L., Ebrahimi, S. N., et al. (2016). Antifungal Quinoline Alkaloids from *Waltheria indica*. *J. Nat. Prod.* 79, 300–307. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b00896.

Cretton, S., Kaiser, M., Karimou, S., Ebrahimi, S. N., Mäser, P., Cuendet, M., et al. (2020). Pyridine-4(1H)-one Alkaloids from *Waltheria indica* as Antitrypanosomatid Agents. *J. Nat. Prod.* 83, 3363–3371. doi: 10.1021/acs.jnatprod.0c00671.

C. Veitch, N., and J. Grayer, R. (2008). Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. *Natural Product Reports* 25, 555–611. doi: 10.1039/B718040N.

Čvorović, J., Ziberna, L., Fornasaro, S., Tramer, F., and Passamonti, S. (2018). “Chapter 22 - Bioavailability of Flavonoids: The Role of Cell Membrane Transporters,” in *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease (Second Edition)*, eds. R. R. Watson, V. R. Preedy, and S. Zibadi (Academic Press), 295–320. doi: 10.1016/B978-0-12-813006-3.00022-2.

da Silva-Júnior, E. F., and de Araújo-Júnior, J. X. (2019). Peptide derivatives as inhibitors of NS2B-NS3 protease from Dengue, West Nile, and Zika flaviviruses. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 27, 3963–3978. doi: 10.1016/j.bmc.2019.07.038.

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, 1290–1301. doi: 10.1128/JVI.80.3.1290-1301.2006.

de Freitas Queiroz Barros, H. D., and Maróstica Junior, M. R. (2019). “Chapter 6 - Phenolic Compound Bioavailability Using In Vitro and In Vivo Models,” in *Bioactive Compounds*, ed. M. R. S. Campos (Woodhead Publishing), 113–126. doi: 10.1016/B978-0-12-814774-0.00006-2.

de Wispelaere, M., LaCroix, A. J., and Yang, P. L. (2013). The Small Molecules AZD0530 and Dasatinib Inhibit Dengue Virus RNA Replication via Fyn Kinase. *Journal of Virology* 87, 7367–7381. doi: 10.1128/JVI.00632-13.

Debray, M. (1975). Médecine et pharmacopée traditionnelles à Madagascar. Antananarivo Madagascar: ORSTOM Available at: <http://www.ethnopharmacologia.org/prelude2020/pdf/biblio-hd-28-debray.pdf> [Accessed September 22, 2022].

Dejnirattisai, W., Webb, A. I., Chan, V., Jumnainsong, A., Davidson, A., Mongkolsapaya, J., et al. (2011). Lectin switching during dengue virus infection. *J Infect Dis* 203, 1775–1783. doi: 10.1093/infdis/jir173.

Delatte, H., Dehecq, J. S., Thiria, J., Domerg, C., Paupy, C., and Fontenille, D. (2008a). Geographic distribution and developmental sites of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) during a Chikungunya epidemic event. *Vector Borne Zoonotic Dis* 8, 25–34. doi: 10.1089/vbz.2007.0649.

Delatte, H., Paupy, C., Dehecq, J. S., Thiria, J., Failloux, A. B., and Fontenille, D. (2008b). [*Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue viruses in Reunion Island: biology and control]. *Parasite* 15, 3–13. doi: 10.1051/parasite/2008151003.

Dellamonica, P. (2009). La dengue : aspects cliniques. *Archives de Pédiatrie* 16, S80–S84. doi: 10.1016/S0929-693X(09)75306-0.

Desideri, N., Conti, C., Sestili, I., Tomao, P., Stein, M. L., and Orsi, N. (1995). In vitro Evaluation of the Anti-Picornavirus Activities of New Synthetic Flavonoids. *Antivir Chem Chemother* 6, 298–306. doi: 10.1177/095632029500600503.

Dey, D., Poudyal, S., Rehman, A., and Hasan, S. S. (2021). Structural and biochemical insights into flavivirus proteins. *Virus Res* 296, 198343. doi: 10.1016/j.virusres.2021.198343.

Dey, P. M., and Harborne, J. B. (1997). *Plant Biochemistry*. Elsevier.

Dhar, M. L., Dhar, M. M., Dhawan, B. N., Mehrotra, B. N., Srimal, R. C., and Tandon, J. S. (1973). Screening of Indian plants for biological activity. IV. *Indian J Exp Biol* 11, 43–54.

Di Petrillo, A., Orrù, G., Fais, A., and Fantini, M. C. (2022). Quercetin and its derivatives as antiviral potentials: A comprehensive review. *Phytotherapy Research* 36, 266–278. doi: 10.1002/ptr.7309.

Dick, G. W. A., Kitchen, S. F., and Haddow, A. J. (1952). Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 46, 509–520. doi: 10.1016/0035-9203(52)90042-4.

Dimayuga, R. E., Murillo, R. F., and Pantoja, M. L. (1987). Traditional medicine of Baja California Sur (Mexico) II. *Journal of Ethnopharmacology* 20, 209–222. doi: 10.1016/0378-8741(87)90049-3.

Ding, F., Fu, J., Jiang, D., Hao, M., and Lin, G. (2018). Mapping the spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Acta Tropica* 178, 155–162. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.11.020.

do Rosário, M. S., de Jesus, P. A. P., Vasilakis, N., Farias, D. S., Novaes, M. A. C., Rodrigues, S. G., et al. (2016). Guillain–Barré Syndrome after Zika Virus Infection in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 95, 1157–1160. doi: 10.4269/ajtmh.16-0306.

Douglass, C. D., Howard, W. L., and Wender, S. H. (1949). The Isolation of Isoquercitrin from the Seed Pods of *Cercis canadensis*. *J. Am. Chem. Soc.* 71, 2658–2659. doi: 10.1021/ja01176a016.

Ducheyne, E., Tran Minh, N. N., Haddad, N., Bryssinckx, W., Buliva, E., Simard, F., et al. (2018). Current and future distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in WHO Eastern Mediterranean Region. *International Journal of Health Geographics* 17, 4. doi: 10.1186/s12942-018-0125-0.

Duffy, M. R., Chen, T.-H., Hancock, W. T., Powers, A. M., Kool, J. L., Lanciotti, R. S., et al. (2009). Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *New England Journal of Medicine* 360, 2536–2543. doi: 10.1056/NEJMoa0805715.

Eka Prasetya, T. A., Devi, R. M., Fitrahanjani, C., Wahyuningtyas, T., and Muna, S. (2022). Systematic assessment of the warming trend in Madagascar’s mainland daytime land surface temperature from 2000 to 2019. *Journal of African Earth Sciences* 189, 104502. doi: 10.1016/j.jafrearsci.2022.104502.

Elgner, F., Sabino, C., Basic, M., Ploen, D., Grünweller, A., and Hildt, E. (2018). Inhibition of Zika Virus Replication by Silvestrol. *Viruses* 10, 149. doi: 10.3390/v10040149.

Fanunza, E., Iampietro, M., Distinto, S., Corona, A., Quartu, M., Maccioni, E., et al. (2020). Quercetin Blocks Ebola Virus Infection by Counteracting the VP24 Interferon-

Inhibitory Function. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 64, e00530-20. doi: 10.1128/AAC.00530-20.

Fargeix, G. (2000). Étude des mécanismes d'oxydation de flavonoïdes en relation avec leur activité antioxydante : effets anti- et pro-oxydants dans l'inhibition de la peroxydation lipidique par les flavonoïdes. Available at: <https://www.theses.fr/2000LYO10281> [Accessed October 4, 2022].

Farrar, J., Focks, D., Gubler, D., Barrera, R., Guzman, M. G., Simmons, C., et al. (2007). Towards a global dengue research agenda. *Trop Med Int Health* 12, 695–699. doi: 10.1111/j.1365-3156.2007.01838.x.

Faustino, A. F., Guerra, G. M., Huber, R. G., Hollmann, A., Domingues, M. M., Barbosa, G. M., et al. (2015). Understanding Dengue Virus Capsid Protein Disordered N-Terminus and pep14-23-Based Inhibition. *ACS Chem. Biol.* 10, 517–526. doi: 10.1021/cb500640t.

FDA (2020). DENVAXIA. *FDA Food Drug and Administration*. Available at: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/dengvaxia> [Accessed September 20, 2022].

Ferraris, P., Yssel, H., and Missé, D. (2019). Zika virus infection: an update. *Microbes Infect* 21, 353–360. doi: 10.1016/j.micinf.2019.04.005.

Fletcher, S. (2015). The Mitsunobu reaction in the 21 st century. *Organic Chemistry Frontiers* 2, 739–752. doi: 10.1039/C5QO00016E.

Flore de La Réunion (2002). *Waltheria indica* L, Guimauve, Mauve-gris, espèce envahissante à La Réunion, Famille : Malvaceae - Malvacées. *Flore de La Réunion*. Available at: https://www.mi-aime-a-ou.com/waltheria_indica.php [Accessed September 25, 2022].

FooDB (2019a). Affichage du composé bêta-D-galactose (FDB021788) - FooDB. Available at: <https://foodb.ca/compounds/FDB021788> [Accessed September 29, 2022].

FooDB (2019b). Affichage du composé D-Glucose (FDB012530) - FooDB. Available at: <https://foodb.ca/compounds/FDB012530> [Accessed September 29, 2022].

Foy, B. D., Kobylinski, K. C., Foy, J. L. C., Blitvich, B. J., Travassos da Rosa, A., Haddow, A. D., et al. (2011). Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis* 17, 880–882. doi: 10.3201/eid1705.101939.

Frank, A. M., Monroe, M. E., Shah, A. R., Carver, J. J., Bandeira, N., Moore, R. J., et al. (2011). Spectral archives: extending spectral libraries to analyze both identified and unidentified spectra. *Nat Methods* 8, 587–591. doi: 10.1038/nmeth.1609.

Freedman, H. H. (1986). Industrial applications of phase transfer catalysis (PTC): past, present and future. *Pure Appl. Chem.* 58, 857–868. doi: 10.1351/pac198658060857.

Freedman, H. H., and Dubois, R. A. (1975). An improved Williamson ether synthesis using phase transfer catalysis. *Tetrahedron Letters* 16, 3251–3254. doi: 10.1016/S0040-4039(00)91417-5.

Friedman, M., and Jürgens, H. S. (2000). Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 48, 2101–2110. doi: 10.1021/jf990489j.

Frumence, E., Roche, M., Krejbich-Trotot, P., El-Kalamouni, C., Nativel, B., Rondeau, P., et al. (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. doi: 10.1016/j.virol.2016.03.006.

Fuhrmann, E., and Talbiersky, J. (2005). Synthesis of Alkyl Aryl Ethers by Catalytic Williamson Ether Synthesis with Weak Alkylation Agents. *Org. Process Res. Dev.* 9, 206–211. doi: 10.1021/op050001h.

Gadea, G., Bos, S., Krejbich-Trotot, P., Clain, E., Viranaicken, W., El-Kalamouni, C., et al. (2016). A robust method for the rapid generation of recombinant Zika virus expressing the GFP reporter gene. *Virology* 497, 157–162. doi: 10.1016/j.virol.2016.07.015.

Galochkina, A. V., Anikin, V. B., Babkin, V. A., Ostrouhova, L. A., and Zarubaev, V. V. (2016). Virus-inhibiting activity of dihydroquercetin, a flavonoid from *Larix sibirica*, against coxsackievirus B4 in a model of viral pancreatitis. *Arch Virol* 161, 929–938. doi: 10.1007/s00705-016-2749-3.

Gan, C. S., Lim, S. K., Chee, C. F., Yusof, R., and Heh, C. H. (2018). Sofosbuvir as treatment against dengue? *Chemical Biology & Drug Design* 91, 448–455. doi: 10.1111/cbdd.13091.

Ganesan, S., Faris, A. N., Comstock, A. T., Wang, Q., Nanua, S., Hershenson, M. B., et al. (2012). Quercetin inhibits rhinovirus replication in vitro and in vivo. *Antiviral Research* 94, 258–271. doi: 10.1016/j.antiviral.2012.03.005.

Gao, Y., Tai, W., Wang, N., Li, X., Jiang, S., Debnath, A. K., et al. (2019). Identification of Novel Natural Products as Effective and Broad-Spectrum Anti-Zika Virus Inhibitors. *Viruses* 11, 1019. doi: 10.3390/v11111019.

Gao, Y., Tai, W., Wang, X., Jiang, S., Debnath, A. K., Du, L., et al. (2022). A gossypol derivative effectively protects against Zika and dengue virus infection without toxicity. *BMC Biology* 20, 143. doi: 10.1186/s12915-022-01344-w.

García, C. C., Acosta, E. G., Carro, A. C., Belmonte, M. C. F., Bomben, R., Duschatzky, C. B., et al. (2010). Activité virucide et composition chimique des huiles essentielles de plantes aromatiques du centre-ouest de l'Argentine. *Natural Product Communications* 5, 1934578X1000500834. doi: 10.1177/1934578X1000500834.

García, C. C., Talarico, L., Almeida, N., Colombres, S., Duschatzky, C., and Damonte, E. B. (2003). Virucidal activity of essential oils from aromatic plants of San Luis, Argentina. *Phytotherapy Research* 17, 1073–1075. doi: 10.1002/ptr.1305.

Gaudry, A., Bos, S., Viranaicken, W., Roche, M., Krejbich-Trotot, P., Gadea, G., et al. (2018). The Flavonoid Isoquercitrin Precludes Initiation of Zika Virus Infection in Human Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 1093. doi: 10.3390/ijms19041093.

Gaunt, M. W., Sall, A. A., Lamballerie, X. de, Falconar, A. K. I., Dzhivanian, T. I., and Gould, E. A. Y. 2001 (2001). Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *Journal of General Virology* 82, 1867–1876. doi: 10.1099/0022-1317-82-8-1867.

Gbadamosi, I. T., Moody, J. O., and Yekini, A. O. (2012). Nutritional Composition of Ten Ethnobotanicals Used for the Treatment of Anaemia in Southwest Nigeria. *European Journal of Medicinal Plants*, 140–150. doi: 10.9734/EJMP/2012/1025.

Go, Y. Y., Balasuriya, U. B. R., and Lee, C. (2013). Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clin Exp Vaccine Res* 3, 58–77. doi: 10.7774/cevr.2014.3.1.58.

Goh, V. S. L., Mok, C.-K., and Chu, J. J. H. (2020). Antiviral Natural Products for Arbovirus Infections. *Molecules* 25, E2796. doi: 10.3390/molecules25122796.

González, M. E., Martínez-Abarca, F., and Carrasco, L. (1990). Flavonoids: Potent Inhibitors of Poliovirus RNA Synthesis. *Antivir Chem Chemother* 1, 203–209. doi: 10.1177/095632029000100304.

Good, S. S., Shannon, A., Lin, K., Moussa, A., Julander, J. G., La Colla, P., et al. (2021). Evaluation of AT-752, a Double Prodrug of a Guanosine Nucleotide Analog with In Vitro and In Vivo Activity against Dengue and Other Flaviviruses. *Antimicrob Agents Chemother* 65, e00988-21. doi: 10.1128/AAC.00988-21.

Grinand, C., Rakotomalala, F., Gond, V., Vaudry, R., Bernoux, M., and Vieilledent, G. (2013). Estimating deforestation in tropical humid and dry forests in Madagascar from 2000 to 2010 using multi-date Landsat satellite images and the random forests classifier. *Remote Sensing of Environment* 139, 68–80. doi: 10.1016/j.rse.2013.07.008.

Gubler, D. J. (1989). *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-borne disease control in the 1990s: top down or bottom up. Charles Franklin Craig Lecture. *Am J Trop Med Hyg* 40, 571–578. doi: 10.4269/ajtmh.1989.40.571.

Gubler, D. J. (1998a). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews* 11, 480–496. doi: 10.1128/CMR.11.3.480.

Gubler, D. J. (1998b). The global pandemic of dengue/dengue haemorrhagic fever: current status and prospects for the future. *Ann Acad Med Singap* 27, 227–234.

Gubler, D. J. (2004). COMMENTARY: Ashburn PM, Craig CF. Experimental Investigations Regarding the Etiology of Dengue. *J Infect Dis* 1907; 4:440–75. *The Journal of Infectious Diseases* 189, 1744–1783. doi: 10.1086/383418.

Gupta, N., Kodan, P., Baruah, K., Soneja, M., and Biswas, A. (2019). Zika virus in India: past, present and future. *QJM*, 1–6. doi: 10.1093/qjmed/hcz273.

Guy, B., Barrere, B., Malinowski, C., Saville, M., Teyssou, R., and Lang, J. (2011). From research to phase III: Preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Vaccine* 29, 7229–7241. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.06.094.

Guzmán, M. G., Alvarez, M., Rodríguez, R., Rosario, D., Vázquez, S., Vald s, L., et al. (1999). Fatal dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1997. *Int J Infect Dis* 3, 130–135. doi: 10.1016/s1201-9712(99)90033-4.

Guzman, M. G., Fuentes, O., Martinez, E., and Perez, A. B. (2017). “Dengue,” in *International Encyclopedia of Public Health (Second Edition)*, ed. S. R. Quah (Oxford: Academic Press), 233–257. doi: 10.1016/B978-0-12-803678-5.00103-X.

Haddad, J. G., Gadea, G., Desprès, P., and El Kalamouni, C. (2021). “Chapter 38 - Medicinal plants as promising source of natural antiviral substances against Zika virus,” in *Zika Virus Impact, Diagnosis, Control, and Models*, eds. C. R. Martin, C. J. Hollins Martin, V. R. Preedy, and R. Rajendram (Academic Press), 397–407. doi: 10.1016/B978-0-12-820267-8.00038-8.

Haddad, J. G., Grauzdytė, D., Koishi, A. C., Viranaicken, W., Venskutonis, P. R., Nunes Duarte dos Santos, C., et al. (2020). The Geraniin-Rich Extract from Reunion Island Endemic Medicinal Plant *Phyllanthus phillyreifolius* Inhibits Zika and Dengue Virus Infection at Non-Toxic Effect Doses in Zebrafish. *Molecules* 25, 2316. doi: 10.3390/molecules25102316.

Haddad, J. G., Koishi, A. C., Gaudry, A., Nunes Duarte dos Santos, C., Viranaicken, W., Desprès, P., et al. (2019a). Doratoxylon apetalum, an Indigenous Medicinal Plant from Mascarene Islands, Is a Potent Inhibitor of Zika and Dengue Virus Infection in Human Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 2382. doi: 10.3390/ijms20102382.

Haddad, J., Picard, M., Bénard, S., Desvignes, C., Desprès, P., Diotel, N., et al. (2019b). Ayapana triplinervis Essential Oil and Its Main Component Thymohydroquinone Dimethyl Ether Inhibit Zika Virus at Doses Devoid of Toxicity in Zebrafish. *Molecules* 24, 3447. doi: 10.3390/molecules24193447.

Haddow, A. D., Schuh, A. J., Yasuda, C. Y., Kasper, M. R., Heang, V., Huy, R., et al. (2012). Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 6, e1477. doi: 10.1371/journal.pntd.0001477.

Hafsia, S., Haramboure, M., Wilkinson, D. A., Baldet, T., Yemadje-Menudier, L., Vincent, M., et al. (2022). Overview of dengue outbreaks in the southwestern Indian Ocean and analysis of factors involved in the shift toward endemicity in Reunion Island: A systematic review. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 16, e0010547. doi: 10.1371/journal.pntd.0010547.

Hahlbrock, K., and Grisebach, H. (1975). “Biosynthesis of Flavonoids,” in *The Flavonoids*, eds. J. B. Harborne, T. J. Mabry, and H. Mabry (Boston, MA: Springer US), 866–915. doi: 10.1007/978-1-4899-2909-9_16.

Hallouët, P., and Borry, A. (2009). “3 - Électronégativité et polarité,” in *Mémo-guide de biologie et de physiologie humaines*, eds. P. Hallouët and A. Borry (Paris: Elsevier Masson), 24–25. doi: 10.1016/B978-2-294-70403-1.50004-3.

Halstead, S. (2019). Recent advances in understanding dengue. *F1000Res* 8, F1000 Faculty Rev-1279. doi: 10.12688/f1000research.19197.1.

Hamidu, L. J., J. O. Ayo, A. B. Adelaiye, and M. S. Abubakar (2008). Sedative and Anticonvulsant Effects of Ethyl Acetate Fraction of *Waltheria indica* in Mice. *Journal of Pharmacology and Toxicology* 3, 261–266. doi: 10.3923/jpt.2008.261.266.

Harborne, J. B., and Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481–504. doi: 10.1016/S0031-9422(00)00235-1.

Haudecoeur, R. (2011). Pharmacochimie des aurones pour la modulation d'enzymes.

He, W. (2011). Epigallocatechin gallate inhibits HBV DNA synthesis in a viral replication - inducible cell line. *WJG* 17, 1507. doi: 10.3748/wjg.v17.i11.1507.

Heinz, F. X., and Stiasny, K. (2017). The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 81, e00055-16. doi: 10.1128/MMBR.00055-16.

Hidari, K. I. P. J., Takahashi, N., Arihara, M., Nagaoka, M., Morita, K., and Suzuki, T. (2008). Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 376, 91–95. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.08.100.

Hinderer, W., and Seitz, H. U. (1988). "CHAPTER 2 - Flavonoids," in *Phytochemicals in Plant Cell Cultures*, eds. F. Constabel and I. K. Vasil (Academic Press), 23–48. doi: 10.1016/B978-0-12-715005-5.50009-1.

Holmes, E. C., and Burch, S. S. (2000). The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. *Trends in Microbiology* 8, 74–77. doi: 10.1016/S0966-842X(99)01669-8.

Holmes, E. C., Worobey, M., and Rambaut, A. (1999). Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. *Molecular Biology and Evolution* 16, 405–409. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026121.

Hotta, S. (1952). Experimental Studies on Dengue: I. Isolation, Identification and Modification of the Virus. *The Journal of Infectious Diseases* 90, 1–9. doi: 10.1093/infdis/90.1.1.

Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., et al. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498–503. doi: 10.1038/nature12111.

Hu, Y., and Sun, L. (2019). Systematic Analysis of Structure Similarity between Zika Virus and Other Flaviviruses. *ACS Infect. Dis.* 5, 1070–1080. doi: 10.1021/acsinfecdis.9b00047.

Huang, N.-C., Hung, W.-T., Tsai, W.-L., Lai, F.-Y., Lin, Y.-S., Huang, M.-S., et al. (2017). Ficus septica plant extracts for treating Dengue virus in vitro. *PeerJ* 5, e3448. doi: 10.7717/peerj.3448.

Huang, Y.-J. S., Higgs, S., and Vanlandingham, D. L. (2019). Emergence and re-emergence of mosquito-borne arboviruses. *Curr Opin Virol* 34, 104–109. doi: 10.1016/j.coviro.2019.01.001.

Hulse, J. H. (1980). Polyphenols in cereals and legumes: proceedings of a Symposium. IDRC, Ottawa, ON, CA Available at: <http://hdl.handle.net/10625/2749> [Accessed October 3, 2022].

Humbert, H. (1967). *Flore de Madagascar et des Comores: plantes vasculaires - Asteraceae*. Muséum national d'histoire naturelle, Laboratoire de phanérogamie. Paris. , ed. J.-F. Leroy Available at: <https://doi.org/10.5962/bhl.title.6600> [Accessed April 25, 2022].

Hutt, N., and Lavaud, F. (2022). Prévention des piqûres et morsures de diptères. *Revue Française d'Allergologie* 62, 85–90. doi: 10.1016/j.reval.2021.10.008.

Ichiyama, K., Reddy, S. B. G., Zhang, L. F., Chin, W. X., Muschin, T., Heinig, L., et al. (2013). Sulfated Polysaccharide, Curdlan Sulfate, Efficiently Prevents Entry/Fusion and Restricts Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection In Vitro: A Possible Candidate for Clinical Application. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 7, e2188. doi: 10.1371/journal.pntd.0002188.

Ichiyanagi, T., Shida, Y., Rahman, M. M., Hatano, Y., and Konishi, T. (2006). Bioavailability and tissue distribution of anthocyanins in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract in rats. *J Agric Food Chem* 54, 6578–6587. doi: 10.1021/jf0602370.

Ichsyani, M., Ridhanya, A., Risanti, M., Desti, H., Ceria, R., Putri, D. H., et al. (2017). Antiviral effects of *Curcuma longa* L. against dengue virus in vitro and in vivo. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 101, 012005. doi: 10.1088/1755-1315/101/1/012005.

Imanishi, N., Tuji, Y., Katada, Y., Maruhashi, M., Konosu, S., Mantani, N., et al. (2002). Additional Inhibitory Effect of Tea Extract on the Growth of Influenza A and B Viruses in MDCK Cells. *Microbiology and Immunology* 46, 491–494. doi: 10.1111/j.1348-0421.2002.tb02724.x.

Ishihara, K., and Nakajima, N. (2003). Structural aspects of acylated plant pigments: Stabilization of flavonoid glucosides and interpretation of their functions. *Journal of Molecular Catalysis B-enzymatic - J MOL CATAL B-ENZYM* 23, 411–417. doi: 10.1016/S1381-1177(03)00106-1.

Jacobs, S., Delang, L., Verbeken, E., Neyts, J., and Kaptein, S. J. F. (2019). A Viral Polymerase Inhibitor Reduces Zika Virus Replication in the Reproductive Organs of Male Mice. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 2122. doi: 10.3390/ijms20092122.

Jaenisch, T., Rosenberger, K. D., Brito, C., Brady, O., Brasil, P., and Marques, E. T. (2017). Risk of microcephaly after Zika virus infection in Brazil, 2015 to 2016. *Bull World Health Organ* 95, 191–198. doi: 10.2471/BLT.16.178608.

Jafari, S., Saeidnia, S., Hajimehdipoor, H., Ardekani, M. R. S., Faramarzi, M. A., Hadjiakhoondi, A., et al. (2013). Cytotoxic evaluation of *Melia azedarach* in comparison with *Azadirachta indica* and its phytochemical investigation. *DARU J Pharm Sci* 21, 1–7. doi: 10.1186/2008-2231-21-37.

Jang, M., Park, Y.-I., Cha, Y.-E., Park, R., Namkoong, S., Lee, J. I., et al. (2020). Tea Polyphenols EGCG and Theaflavin Inhibit the Activity of SARS-CoV-2 3CL-Protease In Vitro. *Evid Based Complement Alternat Med* 2020, 5630838. doi: 10.1155/2020/5630838.

Jansen, O., Angenot, L., Tits, M., Nicolas, J. P., Mol, P. D., Sacré, P. Y., et al. (2008). In vitro antiplasmodial activity of ethnobotanically selected plants from Burkina Faso. *Planta Med* 74, PF14. doi: 10.1055/s-0028-1084742.

Jasso-Miranda, C., Herrera-Camacho, I., Flores-Mendoza, L. K., Dominguez, F., Vallejo-Ruiz, V., Sanchez-Burgos, G. G., et al. (2019). Antiviral and immunomodulatory effects of polyphenols on macrophages infected with dengue virus serotypes 2 and 3 enhanced or not with antibodies. *Infect Drug Resist* 12, 1833–1852. doi: 10.2147/IDR.S210890.

Jaziri, M. E. (2010). Conservation et valorisation de la biodiversité: flore médicinale de Madagascar. *Bull. Séanc. Acad. R. Sci. Outre-Mer* 56, 279–291.

Jennings, M. R., and Parks, R. J. (2020). Curcumin as an Antiviral Agent. *Viruses* 12, 1242. doi: 10.3390/v12111242.

Jia, F., Zou, G., Fan, J., and Yuan, Z. (2010). Identification of palmatine as an inhibitor of West Nile virus. *Arch Virol* 155, 1325–1329. doi: 10.1007/s00705-010-0702-4.

Jiang, W.-L., Luo, X.-L., and Kuang, S.-J. (2005). Effects of *Alternanthera philoxeroides* Griseb against dengue virus in vitro. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 25, 454–456.

Johari, J., Kianmehr, A., Mustafa, M. R., Abubakar, S., and Zandi, K. (2012). Antiviral Activity of Baicalein and Quercetin against the Japanese Encephalitis Virus. *International Journal of Molecular Sciences* 13, 16785–16795. doi: 10.3390/ijms131216785.

Josseran, L., Paquet, C., Zehgnoun, A., Caillere, N., Le Tertre, A., Solet, J.-L., et al. (2006). Chikungunya Disease Outbreak, Reunion Island. *Emerg Infect Dis* 12, 1994–1995. doi: 10.3201/eid1212.060710.

Jurd, L. (1958). Plant Polyphenols. V. Selective Alkylation of the 7-Hydroxyl Group in Polyhydroxyflavones. *Journal de l'American Chemical Society* 80, 5531–5536. doi: <https://doi.org/10.1021/ja01553a054>.

Kajjout, M., and Rolando, C. (2011). Regiospecific synthesis of quercetin O- β -d-glucosylated and O- β -d-glucuronidated isomers. *Tetrahedron* 25, 4731–4741. doi: 10.1016/j.tet.2011.03.110.

Kalayanarooj, S. (2011). Clinical Manifestations and Management of Dengue/DHF/DSS. *Trop Med Health* 39, 83–87. doi: 10.2149/tmh.2011-S10.

Kamal, M., Kenawy, M., H. Rady, M., Khaled, A., and Samy, A. (2018). Mapping the global potential distributions of two arboviral vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* under changing climate. *PLoS ONE* 13, e0210122. doi: 10.1371/journal.pone.0210122.

Kannan, M., Senthil Kumar, T., and Rao, M. (2016). Antidiabetic and Antioxidant Properties of *Waltheria indica* L., an Ethnomedicinal Plant. *International Journal of Pharma Research and Health Sciences* 4, 1376–84. doi: 10.21276/ijprhs.2016.05.07.

Kaptein, S. J. F., Goethals, O., Kiemel, D., Marchand, A., Kesteleyn, B., Bonfanti, J.-F., et al. (2021). A pan-serotype dengue virus inhibitor targeting the NS3–NS4B interaction. *Nature* 598, 504–509. doi: 10.1038/s41586-021-03990-6.

Kashino, Y., Murota, K., Matsuda, N., Tomotake, M., Hamano, T., Mukai, R., et al. (2015). Effect of Processed Onions on the Plasma Concentration of Quercetin in Rats and Humans. *Journal of Food Science* 80, H2597–H2602. doi: 10.1111/1750-3841.13079.

Ketkar, H., Yang, L., Wormser, G. P., and Wang, P. (2019). Lack of efficacy of ivermectin for prevention of a lethal Zika virus infection in a murine system. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 95, 38–40. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2019.03.012.

Khalid, M., Saeed-ur-Rahman, Bilal, M., and Huang, D. (2019). Role of flavonoids in plant interactions with the environment and against human pathogens — A review. *Journal of Integrative Agriculture* 18, 211–230. doi: 10.1016/S2095-3119(19)62555-4.

Kheraro, J., and Adam, J. G. (1974). La Pharmacopée sénégalaise traditionnelle. Plantes médicinales et toxiques. *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée* 21, 76–77.

Khetarpal, N., and Khanna, I. (2016). Dengue Fever: Causes, Complications, and Vaccine Strategies. *J Immunol Res* 2016, 6803098. doi: 10.1155/2016/6803098.

Kiat, T. S., Phippen, R., Yusof, R., Ibrahim, H., Khalid, N., and Rahman, N. A. (2006). Inhibitory activity of cyclohexenyl chalcone derivatives and flavonoids of fingerroot, *Boesenbergia rotunda* (L.), towards dengue-2 virus NS3 protease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 16, 3337–3340. doi: 10.1016/j.bmcl.2005.12.075.

Kim, C. H., Kim, J.-E., and Song, Y.-J. (2020). Antiviral Activities of Quercetin and Isoquercitrin Against Human Herpesviruses. *Molecules* 25, E2379. doi: 10.3390/molecules25102379.

Klawikkan, N., Nukoolkarn, V., Jirakanjanakit, N., Yoksan, S., Wiwat, C., and Thirapanmethee, K. (2011). Effect of Thai Medicinal Plant Extracts against Dengue Virus in vitro. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Science* 38, 13–18.

Kles, V., Michault, A., Rodhain, F., Mevel, F., and Chastel, C. (1994). [A serological survey regarding Flaviviridae infections on the island of Réunion (1971-1989)]. *Bull Soc Pathol Exot* 87, 71–76.

Koehn, F. E., and Carter, G. T. (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 4, 206–220. doi: 10.1038/nrd1657.

Kokwaro, J. O. (1976). *Medicinal plants of East Africa*. Nairobi: East African Literature Bureau. Nairobi: East African Literature Bureau Available at: <http://erepository.uonbi.ac.ke/handle/11295/34820> [Accessed September 25, 2022].

Kootstra, A. (1994). Protection from UV-B-induced DNA damage by flavonoids. *Plant Mol Biol* 26, 771–774. doi: 10.1007/BF00013762.

Kubo, I., Nihei, K., and Shimizu, K. (2004). Oxidation products of quercetin catalyzed by mushroom tyrosinase. *Bioorg Med Chem* 12, 5343–5347. doi: 10.1016/j.bmc.2004.07.050.

Kumar, S., and Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal* 2013, 162750. doi: 10.1155/2013/162750.

Kumari, S., Anmol, Bhatt, V., Suresh, P. S., and Sharma, U. (2021). *Cissampelos pareira* L.: A review of its traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 274, 113850. doi: 10.1016/j.jep.2021.113850.

Kumazawa, T., Minatogawa, T., Matsuba, S., Sato, S., and Onodera, J. (2000). An effective synthesis of isoorientin: the regioselective synthesis of a 6-C-glucosylflavone. *Carbohydr Res* 329, 507–513. doi: 10.1016/s0008-6215(00)00226-3.

Kuno, G., Chang, G.-J. J., Tsuchiya, K. R., Karabatsos, N., and Cropp, C. B. (1998a). Phylogeny of the Genus Flavivirus. *Journal of Virology* 72, 73–83. doi: 10.1128/JVI.72.1.73-83.1998.

Kuno, G., Chang, G.-J. J., Tsuchiya, K. R., Karabatsos, N., and Cropp, C. B. (1998b). Phylogeny of the Genus Flavivirus. *Journal of Virology* 72, 73–83. doi: 10.1128/JVI.72.1.73-83.1998.

Lambrechts, L., Scott, T. W., and Gubler, D. J. (2010). Consequences of the Expanding Global Distribution of *Aedes albopictus* for Dengue Virus Transmission. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 4, e646. doi: 10.1371/journal.pntd.0000646.

Lanciotti, R. S., Lambert, A. J., Holodniy, M., Saavedra, S., and Signor, L. del C. C. (2016). Phylogeny of Zika Virus in Western Hemisphere, 2015. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 933–935. doi: 10.3201/eid2205.160065.

Lani, R., Hassandarvish, P., Shu, M.-H., Phoon, W. H., Chu, J. J. H., Higgs, S., et al. (2016). Antiviral activity of selected flavonoids against Chikungunya virus. *Antiviral Research* 133, 50–61. doi: 10.1016/j.antiviral.2016.07.009.

Larcher, L. (2020). Contre le Covid-19, Madagascar parie sur l'artémisia. Available at: <https://www.la-croix.com/Monde/Afrique/Contre-Covid-19-Madagascar-parie-lartemisia-2020-04-22-1201090597>.

Lee, J. L., Loe, M. W. C., Lee, R. C. H., and Chu, J. J. H. (2019a). Antiviral activity of pinocembrin against Zika virus replication. *Antiviral Research* 167, 13–24. doi: 10.1016/j.antiviral.2019.04.003.

Lee, J. L., Loe, M. W. C., Lee, R. C. H., and Chu, J. J. H. (2019b). Antiviral activity of pinocembrin against Zika virus replication. *Antiviral Research* 167, 13–24. doi: 10.1016/j.antiviral.2019.04.003.

Lee, J.-C., Tseng, C.-K., Wu, Y.-H., Kaushik-Basu, N., Lin, C.-K., Chen, W.-C., et al. (2015). Characterization of the activity of 2'-C-methylcytidine against dengue virus replication. *Antiviral Research* 116, 1–9. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.01.002.

Lee, S. H., Tang, Y. Q., Rathkrishnan, A., Wang, S. M., Ong, K. C., Manikam, R., et al. (2013). Effects of cocktail of four local Malaysian medicinal plants (*Phyllanthus* spp.) against dengue virus 2. *BMC Complement Altern Med* 13, 192. doi: 10.1186/1472-6882-13-192.

Lee, S. J., Kim, J. C., Kim, M. J., Kitaoka, M., Park, C. S., Lee, S. Y., et al. (1999). Transglycosylation of naringin by *Bacillus stearothermophilus* Maltogenic amylase to give glycosylated naringin. *J Agric Food Chem* 47, 3669–3674. doi: 10.1021/jf990034u.

Lefevre, C., and Apaire-Marchais, V. (2021). Dengue, chikungunya et Zika, des arboviroses émergentes en France métropolitaine. *Actualités Pharmaceutiques* 60, 21–27. doi: 10.1016/j.actpha.2021.06.008.

Lestremau, F. (2014). Amélioration des opérations d'analyses physico-chimiques. Available at: https://professionnels.ofb.fr/sites/default/files/pdf/Aquaref_2013_D1c_INERIS_comp_polaire.pdf [Accessed September 29, 2022].

Li, B. Q., Fu, T., Dongyan, Y., Mikovits, J. A., Ruscetti, F. W., and Wang, J. M. (2000). Flavonoid Baicalin Inhibits HIV-1 Infection at the Level of Viral Entry. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 276, 534–538. doi: 10.1006/bbrc.2000.3485.

Li, C., Deng, Y.-Q., Wang, S., Ma, F., Aliyari, R., Huang, X.-Y., et al. (2017). 25-Hydroxycholesterol Protects Host against Zika Virus Infection and Its Associated Microcephaly in a Mouse Model. *Immunity* 46, 446–456. doi: 10.1016/j.immuni.2017.02.012.

Li, H., Saucedo-Cuevas, L., Regla-Nava, J. A., Chai, G., Sheets, N., Tang, W., et al. (2016). Zika Virus Infects Neural Progenitors in the Adult Mouse Brain and Alters Proliferation. *Cell Stem Cell* 19, 593–598. doi: 10.1016/j.stem.2016.08.005.

Li, J. W.-H., and Vederas, J. C. (2009). Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science* 325, 161–165. doi: 10.1126/science.1168243.

Li, N.-G., Shi, Z.-H., Tang, Y.-P., Yang, J.-P., and Duan, J.-A. (2009). An efficient partial synthesis of 4'-O-methylquercetin via regioselective protection and alkylation of quercetin. *Beilstein J. Org. Chem.* 5, 60. doi: 10.3762/bjoc.5.60.

Li, S., Lo, C.-Y., and Ho, C.-T. (2006). Hydroxylated polymethoxyflavones and methylated flavonoids in sweet orange (*Citrus sinensis*) peel. *J Agric Food Chem* 54, 4176–4185. doi: 10.1021/jf060234n.

Li, X., Liu, Y., Wu, T., Jin, Y., Cheng, J., Wan, C., et al. (2015). The Antiviral Effect of Baicalin on Enterovirus 71 In Vitro. *Viruses* 7, 4756–4771. doi: 10.3390/v7082841.

Lieutier, F. (1985). Influence des Nématodes parasites sur l'hémolymphe des adultes d'*Ips sexdentatus* Boern. (Coleoptera : Scolytidae). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 60, 195–204. doi: 10.1051/parasite/1985602195.

Lim, H.-J., Nguyen, T. T. H., Kim, N. M., Park, J.-S., Jang, T.-S., and Kim, D. (2017). Inhibitory effect of flavonoids against NS2B-NS3 protease of ZIKA virus and their structure activity relationship. *Biotechnol Lett* 39, 415–421. doi: 10.1007/s10529-016-2261-6.

Lim, S. P. (2019). Dengue drug discovery: Progress, challenges and outlook. *Antiviral Research* 163, 156–178. doi: 10.1016/j.antiviral.2018.12.016.

Lim, S. Y. M., Chieng, J. Y., and Pan, Y. (2021a). Recent insights on anti-dengue virus (DENV) medicinal plants: review on in vitro, in vivo and in silico discoveries. *All Life* 14, 1–33. doi: 10.1080/26895293.2020.1856192.

Lim, S. Y. M., Chieng, J. Y., and Pan, Y. (2021b). Recent insights on anti-dengue virus (DENV) medicinal plants: review on in vitro, in vivo and in silico discoveries. *All Life* 14, 1–33. doi: 10.1080/26895293.2020.1856192.

Lin, H.-H., Yip, B.-S., Huang, L.-M., and Wu, S.-C. (2018). Zika virus structural biology and progress in vaccine development. *Biotechnol Adv* 36, 47–53. doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.09.004.

Lin, S.-C., Chen, M.-C., Liu, S., Callahan, V. M., Bracci, N. R., Lehman, C. W., et al. (2019). Phloretin inhibits Zika virus infection by interfering with cellular glucose utilisation. *International Journal of Antimicrobial Agents* 54, 80–84. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2019.03.017.

Ling, A., KHOO, B., SEAH, C., FOO, K., CHEAH, R., Soi Moi, C., et al. (2014). Inhibitory activities of methanol extracts of *Andrographis paniculata* and *Ocimum sanctum* against Dengue-1 virus. doi: 10.15242/IICBE.C814013.

Liu, S., DeLalio, L. J., Isakson, B. E., and Wang, T. T. (2016). AXL-Mediated Productive Infection of Human Endothelial Cells by Zika Virus. *Circ Res* 119, 1183–1189. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309866.

Liu, Y., Lillepold, K., Semenza, J. C., Tozan, Y., Quam, M. B. M., and Rocklöv, J. (2020). Reviewing estimates of the basic reproduction number for dengue, Zika and chikungunya across global climate zones. *Environmental Research* 182, 109114. doi: 10.1016/j.envres.2020.109114.

Loaiza-Cano, V., Monsalve-Escudero, L. M., Filho, C. da S. M. B., Martinez-Gutierrez, M., and Sousa, D. P. de (2020). Antiviral Role of Phenolic Compounds against Dengue Virus: A Review. *Biomolecules* 11, E11. doi: 10.3390/biom11010011.

Low, J. G., Gatsinga, R., Vasudevan, S. G., and Sampath, A. (2018). “Dengue Antiviral Development: A Continuing Journey,” in *Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies* Advances in Experimental Medicine and Biology., eds. R. Hilgenfeld and S. G. Vasudevan (Singapore: Springer), 319–332. doi: 10.1007/978-981-10-8727-1_22.

Lu, Z. (2012). Degradation of Rutin into Isoquercitrin by *Bacillus litoralis* strain C44. *IOSRJEN* 02, 1154–1161. doi: 10.9790/3021-020511541161.

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. doi: 10.1007/BF02978215.

MacRae, C. A., and Peterson, R. T. (2015). Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 14, 721–731. doi: 10.1038/nrd4627.

Magill, A. J., Hill, D. R., Solomon, T., and Ryan, E. T. eds. (2013). “32 - Viral Febrile Illnesses,” in *Hunter’s Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease (Ninth Edition)* (London: W.B. Saunders), 306–322. doi: 10.1016/B978-1-4160-4390-4.00184-3.

Maheswara, M., Koteswara Rao, Y., Madhava Rao, V., and Venkata Rao, C. (2006). Antibacterial activity of acylated flavonol glycoside from *Waltheria indica*. *Asian Journal of Chemistry* 18, 2761–2765.

Makosza, M. (2000). Phase-transfer catalysis. A general green methodology in organic synthesis. *Pure and Applied Chemistry* 72, 1399–1403. doi: 10.1351/pac200072071399.

Makris, D., and Rossiter, J. (2002a). An investigation on structural aspects influencing product formation in enzymic and chemical oxidation of quercetin and related flavonols. *Food Chemistry* 77, 177–185. doi: 10.1016/S0308-8146(01)00333-8.

Makris, D., and Rossiter, J. (2002b). Hydroxyl Free Radical-Mediated Oxidative Degradation of Quercetin and Morin: A Preliminary Investigation. *Journal of Food Composition and Analysis - J FOOD COMPOS ANAL* 15, 103–113. doi: 10.1006/jfca.2001.1030.

Malavige, G. N., Fernando, S., Fernando, D. J., and Seneviratne, S. L. (2004). Dengue viral infections. *Postgraduate Medical Journal* 80, 588–601. doi: 10.1136/pgmj.2004.019638.

Mallet, H.-P., Vial, A., and Musso, D. (2016). Bilan de l’épidémie à virus Zika survenue en Polynésie française entre octobre 2013 et mars 2014. *Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire*, 367–73.

Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., and Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81, 230S–242S. doi: 10.1093/ajcn/81.1.230S.

Mansard, M., Laurain-Mattar, D., and Couic-Marinier, F. (2019). Huile essentielle de Ravintsara. *Actualités Pharmaceutiques* 58, 57–59. doi: 10.1016/j.actpha.2019.02.012.

Maregesi, S., Miert, S. V., Pannecouque, C., Haddad, M. H. F., Hermans, N., Wright, C. W., et al. (2010). Screening of Tanzanian Medicinal Plants against *Plasmodium falciparum* and Human Immunodeficiency Virus. *Planta Med* 76, 195–201. doi: 10.1055/s-0029-1186024.

Markham, K. R. (1989). “6 - Flavones, Flavonols and their Glycosides,” in *Methods in Plant Biochemistry Plant Phenolics.*, ed. J. B. Harborne (Academic Press), 197–235. doi: 10.1016/B978-0-12-461011-8.50012-3.

Marmier, E., Llavador, V., Malato, L., Roncin, L., and Fleury, H. J. (2010). La résistance du virus de la grippe aux antiviraux: méthodes d'identification. *Revue Francophone des Laboratoires* 2010, 63–68. doi: 10.1016/S1773-035X(10)70511-6.

Massah, A. R., Mosharafian, M., Momeni, A. R., Aliyan, H., Naghash, H. J., and Adibnejad, M. (2007). Solvent-Free Williamson Synthesis: An Efficient, Simple, and Convenient Method for Chemoselective Etherification of Phenols and Bisphenols. *Synthetic Communications* 37, 1807–1815. doi: 10.1080/00397910701316268.

Massiot, G. (1994). *Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes Médicinales.*: By J. Bruneton, 2nd Edn, Tec Doc, Paris, 1993. 928pp. 780F ISBN 2-85206-911-3. *Phytochemistry* 36, 258. doi: 10.1016/S0031-9422(00)97054-7.

Mazzobre, M. F., Román, M. V., Mourelle, A. F., and Corti, H. R. (2005). Octanol–water partition coefficient of glucose, sucrose, and trehalose. *Carbohydrate Research* 340, 1207–1211. doi: 10.1016/j.carres.2004.12.038.

Mccarthy, D. D., and Brent, R. H. (1943). An Account of an Outbreak of Dengue Fever in Dzaoudzi, Comoro Islands, January 1943. *East African Medical Journal* 20, 293–8.

Messer, W. B., Gubler, D. J., Harris, E., Sivananthan, K., and de Silva, A. M. (2003). Emergence and Global Spread of a Dengue Serotype 3, Subtype III Virus. *Emerg Infect Dis* 9, 800–809. doi: 10.3201/eid0907.030038.

Messina, J. P., Brady, O. J., Golding, N., Kraemer, M. U. G., Wint, G. R. W., Ray, S. E., et al. (2019). The current and future global distribution and population at risk of dengue. *Nat Microbiol* 4, 1508–1515. doi: 10.1038/s41564-019-0476-8.

Messina, J. P., Brady, O. J., Scott, T. W., Zou, C., Pigott, D. M., Duda, K. A., et al. (2014). Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol* 22, 138–146. doi: 10.1016/j.tim.2013.12.011.

Metselaar, D., Grainger, C. R., Oei, K. G., Reynolds, D. G., Pudney, M., Leake, C. J., et al. (1980). An outbreak of type 2 dengue fever in the Seychelles, probably transmitted by *Aedes albopictus* (Skuse). *Bull World Health Organ* 58, 937–943.

Mitsunobu, O., and Yamada, M. (1967). Preparation of Esters of Carboxylic and Phosphoric Acid via Quaternary Phosphonium Salts. *BCSJ* 40, 2380–2382. doi: 10.1246/bcsj.40.2380.

Mittal, R., Nguyen, D., Debs, L. H., Patel, A. P., Liu, G., Jhaveri, V. M., et al. (2017). Zika Virus: An Emerging Global Health Threat. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 486. doi: 10.3389/fcimb.2017.00486.

Mittermeier, R. A., Gil, P. R., Hoffman, M., Pilgrim, J., Brooks, T., Mittermeier, C. G., et al. (2005). *Hotspots Revisited: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions.*, eds. P. A. Seligmann and a F. by H. Ford Conservation International Available at: <https://press.uchicago.edu/ucp/books/book/distributed/H/bo3707156.html> [Accessed October 18, 2022].

Mochizuki, M., Yamazaki, S., Kano, K., and Ikeda, T. (2002). Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins. *Biochim Biophys Acta* 1569, 35–44. doi: 10.1016/s0304-4165(01)00230-6.

Moghaddam, E., Teoh, B.-T., Sam, S.-S., Lani, R., Hassandarvish, P., Chik, Z., et al. (2014). Baicalin, a metabolite of baicalein with antiviral activity against dengue virus. *Sci Rep* 4, 5452. doi: 10.1038/srep05452.

Mohammed, Z., Shok, M., Ilyas, N., Musa Yusuf, K., and Yaro, A. (2007). Analgesic activity of *Waltheria indica* Linn. *European Journal of Scientific Research* 16, 6–9.

Mohan, M., Goud, V. V., and Banerjee, T. (2015). Solubility of glucose, xylose, fructose and galactose in ionic liquids: Experimental and theoretical studies using a continuum solvation model. *Fluid Phase Equilibria* 395, 33–43. doi: 10.1016/j.fluid.2015.03.020.

Molinari, G. (2009). Natural products in drug discovery: present status and perspectives. *Adv Exp Med Biol* 655, 13–27. doi: 10.1007/978-1-4419-1132-2_2.

Mongalo, N. I., Opoku, A. R., and Zobolo, A. M. (2012a). Antibacterial and antioxidant activity of the extracts of *Waltheria indica* Linn. collected from Capricorn District, Limpopo Province, South Africa. *Journal of Medicinal Plants Research* 6, 5593–5598. doi: DOI: 10.5897/JMPR12-275.

Mongalo, N. I., Opoku, A. R., and Zobolo, A. M. (2013). Antibacterial and antioxidant activity of extracts from *Waltheria indica* L. *South African Journal of Botany* 86, 146. doi: 10.1016/j.sajb.2013.02.032.

Mongalo, N., Opoku, A. R., and Zobolo, A. M. (2012b). Antibacterial and antioxidant activity of the extracts of *Waltheria indica* Linn. collected from Capricorn District, Limpopo Province, South Africa. *Journal of Medicinal Plants Research* 6, 5593–5598.

Monteillier, A., Cretton, S., Ciclet, O., Marcourt, L., Ebrahimi, S. N., Christen, P., et al. (2017). Cancer chemopreventive activity of compounds isolated from *Waltheria indica*. *Journal of Ethnopharmacology* 203, 214–225. doi: 10.1016/j.jep.2017.03.048.

Moon, Y. J., Wang, L., DiCenzo, R., and Morris, M. E. (2008). Quercetin pharmacokinetics in humans. *Biopharm Drug Dispos* 29, 205–217. doi: 10.1002/bdd.605.

Moscona, A. (2005). Oseltamivir resistance--disabling our influenza defenses. *N Engl J Med* 353, 2633–2636. doi: 10.1056/NEJMp058291.

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 Research* 142, 148–157. doi: 10.1016/j.antiviral.2017.03.014.

Mourya, D. T., Shil, P., Sapkal, G. N., and Yadav, P. D. (2016). Zika virus: Indian perspectives. *Indian Journal of Medical Research* 143, 553–564.

Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., and Rossmann, M. G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* 3, 13–22. doi: 10.1038/nrmicro1067.

Muliawan, S. Y., Kit, L. S., Devi, S., Hashim, O., and Yusof, R. (2006). Inhibitory potential of *Quercus lusitanica* extract on dengue virus type 2 replication. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 37 Suppl 3, 132–135.

Muller, V., Soares, R., Santos-Junior, N., Trabuco, A., Cintra, A., Figueiredo, L., et al. (2014). Phospholipase A2 Isolated from the Venom of *Crotalus durissus terrificus* Inactivates Dengue virus and Other Enveloped Viruses by Disrupting the Viral Envelope. *PloS one* 9, e112351. doi: 10.1371/journal.pone.0112351.

Musso, D., and Gubler, D. J. (2016). Zika Virus. *Clin Microbiol Rev* 29, 487–524. doi: 10.1128/CMR.00072-15.

Musso, D., Nilles, E. J., and Cao-Lormeau, V.-M. (2014). Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clinical Microbiology and Infection* 20, O595–O596. doi: 10.1111/1469-0691.12707.

Musso, D., Roche, C., Robin, E., Nhan, T., Teissier, A., and Cao-Lormeau, V.-M. (2015). Potential Sexual Transmission of Zika Virus. *Emerg Infect Dis* 21, 359–361. doi: 10.3201/eid2102.141363.

Musso, D., Rodriguez-Morales, A. J., Levi, J. E., Cao-Lormeau, V.-M., and Gubler, D. J. (2018). Unexpected outbreaks of arbovirus infections: lessons learned from the Pacific and tropical America. *The Lancet Infectious Diseases* 18, e355–e361. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30269-X.

Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., da Fonseca, G. A. B., and Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853–858. doi: 10.1038/35002501.

Nahmias, Y., Goldwasser, J., Casali, M., van Poll, D., Wakita, T., Chung, R. T., et al. (2008). Apolipoprotein B–dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology* 47, 1437–1445. doi: 10.1002/hep.22197.

Naithani, R., Huma, L. C., Holland, L. E., Shukla, D., McCormick, D. L., Mehta, R. G., et al. (2008). Antiviral activity of phytochemicals: a comprehensive review. *Mini Rev Med Chem* 8, 1106–1133. doi: 10.2174/138955708785909943.

Navarro-Sanchez, E., Altmeyer, R., Amara, A., Schwartz, O., Fieschi, F., Virelizier, J.-L., et al. (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, 723–728. doi: 10.1038/sj.embor.embor866.

Ndjele, J., Lisingo, J., Ndjele, L., Nshimba, H., and Lituka, G. (2022). Potentiel cosmétique et usages traditionnels des plantes dans les soins et la beauté du corps à Kisangani, République Démocratique du Congo. *Afrique SCIENCE* 20, 49–63.

Newman, D. J., and Cragg, G. M. (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 79, 629–661. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b01055.

Nhan, T.-X., Cao-Lormeau, V.-M., and Musso, D. (2014). Les infections à virus Zika. *Revue Francophone des Laboratoires* 2014, 45–52. doi: 10.1016/S1773-035X(14)72748-0.

Nicolas, J.-P. (2012). *Plantes médicinales du Nord de Madagascar*. Jardins du monde. 15, rue saint Michel - 29 190 Brasparts.

Nile, S. H., Nile, A. S., Keum, Y. S., and Sharma, K. (2017). Utilization of quercetin and quercetin glycosides from onion (*Allium cepa* L.) solid waste as an antioxidant, urease and xanthine oxidase inhibitors. *Food Chemistry* 235, 119–126. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.05.043.

Ninfali, P., Antonelli, A., Magnani, M., and Scarpa, E. S. (2020). Antiviral Properties of Flavonoids and Delivery Strategies. *Nutrients* 12, E2534. doi: 10.3390/nu12092534.

Nirmala, C., and Sridevi, M. (2021). Ethnobotanical, phytochemistry, and pharmacological property of *Waltheria Indica* Linn. *Futur J Pharm Sci* 7, 14. doi: 10.1186/s43094-020-00174-3.

Nogueira Sobrinho, A. C., de Moraes, S. M., Marinho, M. M., de Souza, N. V., and Lima, D. M. (2021). Antiviral activity on the Zika virus and larvicidal activity on the *Aedes* spp. of *Lippia alba* essential oil and β -caryophyllene. *Industrial Crops and Products* 162, 113281. doi: 10.1016/j.indcrop.2021.113281.

Norman, M. (2003). Biodiversity Hotspots Revisited. *BioScience* 53, 916–917. doi: 10.1641/0006-3568(2003)053[0916:BHR]2.0.CO;2.

Nothias, L.-F., Esposito, M., Costa, J., Paolini, J., Touboul, D., and Litaudon, M. (2015). Les réseaux moléculaires, une approche bio-informatique globale pour interpréter les données de spectrométrie de masse tandem. *Spectra analyse*, 65–70.

Novy, J. W. (1997). Medicinal plants of the eastern region of Madagascar. *Journal of Ethnopharmacology* 55, 119–126. doi: 10.1016/S0378-8741(96)01489-4.

Nozzolillo, C., and McNeill, J. (1985). Anthocyanin pigmentation in seedlings of selected species of *Phaseolus* and *Vigna* (Fabaceae). *Can. J. Bot.* 63, 1066–1071. doi: 10.1139/b85-146.

O. O. Olajuyigbe (2011). Antibacterial and phytochemical screening of crude ethanolic extracts of *Waltheria indica* Linn. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5. doi: 10.5897/AJMR11.627.

Ocazonez, R. E., Meneses, R., Torres, F. Á., and Stashenko, E. (2010). Virucidal activity of Colombian *Lippia* essential oils on dengue virus replication in vitro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105, 304–309. doi: 10.1590/S0074-02762010000300010.

Olakunle, F. A., Koma, O. S., and Theophilus, O. A. (2017). Phytochemical Screening and *in vitro* Antimicrobial Activity of *Waltheria indica* Linn Root Extracts. *International Journal of Biochemistry, Biophysics & Molecular Biology* 2, 71. doi: 10.11648/j.ijbbmb.20170206.13.

Oliva, C. F. (2012). Études biologiques et comportementales de deux espèces de moustiques (*Aedes albopictus* et *Anopheles arabiensis*) vectrices de maladies en vue du développement de la Technique de l’Insecte Stérile (TIS) contre ces vecteurs à l’île de la Réunion. Available at: <https://agritrop.cirad.fr/573960/> [Accessed November 5, 2022].

Oliveira, A. F. C. da S., Teixeira, R. R., Oliveira, A. S. de, Souza, A. P. M. de, Silva, M. L. da, and Paula, S. O. de (2017). Potential Antivirals: Natural Products Targeting Replication Enzymes of Dengue and Chikungunya Viruses. *Molecules* 22, E505. doi: 10.3390/molecules22030505.

OMS (2021). Maladie à virus Zika – Inde. Available at: <https://www.who.int/fr/emergencies/disease-outbreak-news/zika-virus-disease-india> [Accessed August 11, 2022].

Ono, L., Wollinger, W., Rocco, I. M., Coimbra, T. L. M., Gorin, P. A. J., and Sierakowski, M.-R. (2003). *In vitro* and *in vivo* antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). *Antiviral Research* 60, 201–208. doi: 10.1016/S0166-3542(03)00175-X.

Oo, A., Teoh, B. T., Sam, S. S., Bakar, S. A., and Zandi, K. (2019). Baicalein and baicalin as Zika virus inhibitors. *Arch Virol* 164, 585–593. doi: 10.1007/s00705-018-4083-4.

Osman, R. E., Elnima, E. I., and Omer, M. E. A. (2013). Biological Activity of Methanolic Extract of *Waltheria indica* Roots. *Journal of Medical Sciences* 13, 471–476. doi: 10.3923/jms.2013.471.476.

Owemidu, I., Olubori, M., Faborode, O., Oloyede, O., and Onasanwo, S. (2018). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the methanol extract of *Waltheria americana* leaf in experimental animals. *J Complement Med Res* 9, 47. doi: 10.5455/jcmr.20180118112751.

Padilla-S, L., Rodríguez, A., Gonzales, M. M., Gallego-G, J. C., and Castaño-O, J. C. (2014). Inhibitory effects of curcumin on dengue virus type 2-infected cells *in vitro*. *Arch Virol* 159, 573–579. doi: 10.1007/s00705-013-1849-6.

Panraksa, P., Ramphan, S., Khongwichit, S., and Smith, D. R. (2017). Activity of andrographolide against dengue virus. *Antiviral Research* 139, 69–78. doi: 10.1016/j.antiviral.2016.12.014.

Panya, A., Yongpitakwattana, P., Budchart, P., Sawasdee, N., Krobthong, S., Paemane, A., et al. (2019). Novel bioactive peptides demonstrating anti-dengue virus activity isolated from the Asian medicinal plant *Acacia Catechu*. *Chemical Biology & Drug Design* 93, 100–109. doi: 10.1111/cbdd.13400.

Parida, M. M., Upadhyay, C., Pandya, G., and Jana, A. M. (2002). Inhibitory potential of neem (*Azadirachta indica* Juss) leaves on Dengue virus type-2 replication. *Journal of Ethnopharmacology* 79, 273–278. doi: 10.1016/S0378-8741(01)00395-6.

Pascalis, H., Turpin, J., Roche, M., Krejbich, P., Gadea, G., Nten, C. A., et al. (2019). The epidemic of Dengue virus type-2 Cosmopolitan genotype on Reunion Island relates to its active circulation in the Southwestern Indian Ocean neighboring islands. *Heliyon* 5, e01455. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01455.

Pastorino, B., Nougairède, A., Wurtz, N., Gould, E., and de Lamballerie, X. (2010). Role of host cell factors in flavivirus infection: Implications for pathogenesis and development of antiviral drugs. *Antiviral Research* 87, 281–294. doi: 10.1016/j.antiviral.2010.04.014.

Patridge, E., Gareiss, P., Kinch, M. S., and Hoyer, D. (2016). An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discov Today* 21, 204–207. doi: 10.1016/j.drudis.2015.01.009.

Paty, M.-C. (2013). Expansion des arboviroses et gestion du risque transfusionnel : exemple des virus West Nile, de la dengue et du chikungunya. *Transfusion Clinique et Biologique* 20, 165–173. doi: 10.1016/j.tracli.2013.03.008.

Paul, S., and Gupta, M. (2004). Zinc-catalyzed Williamson ether synthesis in the absence of base. *Tetrahedron Letters* 45, 8825–8829. doi: 10.1016/j.tetlet.2004.10.009.

Peng, Y., and Song, G. (2002). Combined microwave and ultrasound assisted Williamson ether synthesis in the absence of phase-transfer catalysts. *Green Chemistry* 4, 349–351. doi: 10.1039/B201543A.

Perera-Lecoin, M., Meertens, L., Carnec, X., and Amara, A. (2014). Flavivirus Entry Receptors: An Update. *Viruses* 6, 69–88. doi: 10.3390/v6010069.

Pernet, R., and Meyer, G. (1957). *Pharmacopée Madagascar*. Pierre André. 244, boulevard Raspail Paris Available at: https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers13-05/010057844.pdf [Accessed September 22, 2022].

Perrier de la Bathie, H. (1932). Les Plantes introduites à Madagascar (Suite et fin). *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée* 12, 530–543. doi: 10.3406/jatba.1932.5156.

Petrovska, B. B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Rev* 6, 1–5. doi: 10.4103/0973-7847.95849.

Petrus, A. J. A. (1990). Polyphenolic components of *Waltheria indica*. *Fitoterapia* 61, 371.

Pierson, T. C., and Diamond, M. S. (2020). The continued threat of emerging flaviviruses. *Nat Microbiol* 5, 796–812. doi: 10.1038/s41564-020-0714-0.

Poland, G. A., Ovsyannikova, I. G., and Kennedy, R. B. (2019). Zika Vaccine Development: Current Status. *Mayo Clinic Proceedings* 94, 2572–2586. doi: 10.1016/j.mayocp.2019.05.016.

Ponciano, C. S., Ávila, E. P., Grazul, R. M., de Oliveira Mendes, L. A., and de Almeida, M. V. (2021). Natural products and their derivatives as anti-flavivirus drug candidates. *Med Chem Res* 30, 1056–1073. doi: 10.1007/s00044-021-02718-5.

Povi, L., Batomayena, B., Hode, T. A., Kwashie, E.-G., Kodjo, A., and Messanvi, G. (2015). Phytochemical screening, antioxydant and hypoglycemic activity of *coccoloba uvifera* leaves and *Waltheria indica* roots extracts. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 279–283.

Pratheeba, T., Taranath, V., Sai Gopal, D., and Natarajan, D. (2019). Antidengue potential of leaf extracts of *Pavetta tomentosa* and *Tarenna asiatica* (Rubiaceae) against dengue virus and its vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Heliyon* 5, e02732. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02732.

Pujol, C., Estevez, J., Carlucci, M., Ciancia, M., Cerezo, A., and Damonte, E. (2002). Les nouveaux hybrides DL-galactane de l'algue rouge *Gymnogongrus Torulosus* sont de puissants inhibiteurs du virus de l'herpès simplex et du virus de la dengue. *Antivir Chem Chemother* 13, 83–89. doi: 10.1177/095632020201300202.

Qiu, X., Kroeker, A., He, S., Kozak, R., Audet, J., Mbikay, M., et al. (2016). Prophylactic Efficacy of Quercetin 3- β -O-d-Glucoside against Ebola Virus Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60, 5182–5188. doi: 10.1128/AAC.00307-16.

Qureshi, A. I. (2020). “Chapter 1 - Dengue virus infection,” in *Dengue Virus Disease*, eds. A. I. Qureshi and O. Saeed (Academic Press), 1–7. doi: 10.1016/B978-0-12-818270-3.00001-1.

Rabemahefa, L. F., Rajestera, F., Rasolonjatovo, M. Z., and Rasoanandrasana, E. (2021). Valorisation de coques d’arachides avec isolement des substances biologiques extraites. *Revue des Sciences, de Technologies et de l’Environnement* 4, 79–86.

Raekiansyah, M., Buerano, C. C., Luz, M. A. D., and Morita, K. (2018). Inhibitory effect of the green tea molecule EGCG against dengue virus infection. *Arch Virol* 163, 1649–1655. doi: 10.1007/s00705-018-3769-y.

Rafidison, V., Ratsimandresy, F., Rakotondrafara, A., Rakotondrajaona, R., Rasamison, V., Rakotoarisoa, F., et al. (2019). Synthèse et analyse de données sur les inventaires de plantes médicinales de Madagascar. *Ethnobotany Research and Applications* 18. doi: 10.32859/era.18.40.1-19.

Rafiu, B., Lawal, I., and Olaniyi, M. (2020). Chemical composition and antioxidant activity of *Waltheria Indica* Linn whole plant. *Nigerian Journal of Natural Products and Medicine* 23, 69–76. doi: 10.4314/njnpm.v23i1.9.

Ragasa, C. Y., Cruz, C. A., Chiong, I. D., Tada, M., and Rideout, J. A. (1997). Antifungal flavonoids from *Waltheria americana*. *Philippine Journal of Science (Philippines)*. Available at: https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Antifungal+flavonoids+from+Waltheria+americana&author=Ragasa%2C+C.Y.&publication_year=1997 [Accessed September 25, 2022].

Ragasa, C. Y., Macuha, M. R., and Altena, I. A. V. (2016). Chemical Constituents of *Ficus septica* Burm. F. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 8, 1464–1469.

Rakotosaona, R., Mioramalala, S. A., Rakotoarisoa, M. A., Rakotondrandriana, A., Randrianarivo, E., Rabetokotany, F., et al. (2022). Efficacy and safety of CVO PLUS CURATIF capsules, Malagasy improved traditional medication for treating COVID-19 a

randomized, double-blind, placebo-controlled trial. In Review doi: 10.21203/rs.3.rs-1274428/v1.

Ramiharimanana, F. D., Andrianjafy, M. T., Ramarosandratana, N. H., Andrianarijaona, T. E., Rambala Rakotomena, N. A. H., Metay, E., et al. (2022). Chirality Effects on Repellent Properties of 4-Alkoxy coumarins Against Asian Tiger Mosquito (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 59, 430–439. doi: 10.1093/jme/tjab176.

Ranarijaona, M. M., Rambala Rakotomena, N. A. H., Andrianjafy, M. T., Ramiharimanana, F. D., Herinirina, L. C., Ramarosandratana, N. H., et al. (2021). Development of Sustainable Chemistry in Madagascar: Example of the Valuation of CNSL and the Use of Chromones as an Attractant for Mosquitoes. *Molecules* 26, 7625. doi: 10.3390/molecules26247625.

Ranarijaona, T., Arsène, T., Bapdistine, J., and Simon, A. G. (2012). Les plantes magiques traditionnelles les plus réputées des femmes de la ville de Mahajanga.

Randriamiharisoa, M. N., Kuhlman, A. R., Jeannoda, V., Rabarison, H., Rakotoarivelo, N., Randrianarivony, T., et al. (2015). Medicinal plants sold in the markets of Antananarivo, Madagascar. *J Ethnobiol Ethnomed* 11, 60. doi: 10.1186/s13002-015-0046-y.

Randrianarivony, T. N., Ramarosandratana, A. V., Andriamihajarivo, T. H., Rakotoarivony, F., Jeannoda, V. H., Randrianasolo, A., et al. (2017). The most used medicinal plants by communities in Mahaboboka, Amboronabo, Mikoboka, Southwestern Madagascar. *J Ethnobiol Ethnomed* 13, 19. doi: 10.1186/s13002-017-0147-x.

Randrianavony, P., Reboza, A. M., Quansah, N., and Randimbivololona, F. (2017). Hypouricemic Activity of *Pentopetia Androsaemifolia* Decne. (Apocynaceae) Hydro Alcoholic Extract in Mice. *ESJ* 13, 340. doi: 10.19044/esj.2017.v13n36p340.

Rao, Y. K., Fang, S.-H., and Tzeng, Y.-M. (2005). Inhibitory effects of the flavonoids isolated from *Waltheria indica* on the production of NO, TNF-alpha and IL-12 in activated macrophages. *Biol Pharm Bull* 28, 912–915. doi: 10.1248/bpb.28.912.

Rasoanaivo, L. H., Albrieux, F., and Lemaire, M. (2014). Chemical constituents of peels, kernels and hulls of fruits of *Mangifera indica* Var. Hiesyand their potential valorization. *J Pharmacogn Phytochem* 3, 225–233.

Rasoanaivo, P., Petitjean, A., Ratsimamanga-Urverg, S., and Rakoto-Ratsimamanga, A. (1992). Medicinal plants used to treat malaria in Madagascar. *J Ethnopharmacol* 37, 117–127. doi: 10.1016/0378-8741(92)90070-8.

Ratanakomol, T., Roytrakul, S., Wikan, N., and Smith, D. R. (2021). Berberine Inhibits Dengue Virus through Dual Mechanisms. *Molecules* 26, 5501. doi: 10.3390/molecules26185501.

Ratsitorahina, M., Harisoa, J., Ratovonjato, J., Biacabe, S., Reynes, J.-M., Zeller, H., et al. (2008). Outbreak of dengue and Chikungunya fevers, Toamasina, Madagascar, 2006. *Emerg Infect Dis* 14, 1135–1137. doi: 10.3201/eid1407.071521.

Razafindraibe, M., Kuhlman, A. R., Rabarison, H., Rakotoarimanana, V., Rajeriarison, C., Rakotoarivelo, N., et al. (2013). Medicinal plants used by women from Agnalazaha littoral forest (Southeastern Madagascar). *J Ethnobiol Ethnomed* 9, 73. doi: 10.1186/1746-4269-9-73.

Razafindrambao, R., Debray, M., and Jacquemin, H. (1971). Contribution à l'inventaire des plantes médicinales de Madagascar. Paris : ORSTOM.

Reed, W., Carroll, J., Agramonte, A., and Lazear, J. W. (1900). The Etiology of Yellow Fever—A Preliminary Note. *Public Health Pap Rep* 26, 37–53.

Rees, C. R., Costin, J. M., Fink, R. C., McMichael, M., Fontaine, K. A., Isern, S., et al. (2008). In vitro inhibition of dengue virus entry by p-sulfoxy-cinnamic acid and structurally related combinatorial chemistries. *Antiviral Research* 80, 135–142. doi: 10.1016/j.antiviral.2008.05.007.

Reinboth, M., Wolfram, S., Abraham, G., Ungemach, F. R., and Cermak, R. (2010). Oral bioavailability of quercetin from different quercetin glycosides in dogs. *Br J Nutr* 104, 198–203. doi: 10.1017/S000711451000053X.

Renault, P., Balleydier, E., D'Ortenzio, E., Bâville, M., and Filleul, L. (2012). Epidemiology of chikungunya infection on Reunion Island, Mayotte, and neighboring countries. *Médecine et Maladies Infectieuses* 42, 93–101. doi: 10.1016/j.medmal.2011.12.002.

Repik, P. M., Dalrymple, J. M., Brandt, W. E., McCown, J. M., and Russell, P. K. (1983). RNA Fingerprinting as a Method for Distinguishing Dengue 1 Virus Strains. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 32, 577–589. doi: 10.4269/ajtmh.1983.32.577.

Revathi, K., Chandrasekaran, R., Thanigaivel, A., Kirubakaran, S. A., Sathish-Narayanan, S., and Senthil-Nathan, S. (2013). Effects of *Bacillus subtilis* metabolites on larval *Aedes aegypti* L. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 107, 369–376. doi: 10.1016/j.pestbp.2013.10.005.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., and Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* 20, 933–956. doi: 10.1016/0891-5849(95)02227-9.

Rico-Hesse, R. (2003). Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res* 59, 315–341. doi: 10.1016/s0065-3527(03)59009-1.

Rico-Hesse, R., Harrison, L. M., Salas, R. A., Tovar, D., Nisalak, A., Ramos, C., et al. (1997). Origins of Dengue Type 2 Viruses Associated with Increased Pathogenicity in the Americas. *Virology* 230, 244–251. doi: 10.1006/viro.1997.8504.

Rodrigues, L. C. (2016). Microcephaly and Zika virus infection. *The Lancet* 387, 2070–2072. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00742-X.

Roschek, B., Fink, R. C., McMichael, M. D., Li, D., and Alberte, R. S. (2009). Elderberry flavonoids bind to and prevent H1N1 infection in vitro. *Phytochemistry* 70, 1255–1261. doi: 10.1016/j.phytochem.2009.06.003.

Rosmalena, R., Elya, B., Dewi, B. E., Fithriyah, F., Desti, H., Angelina, M., et al. (2019). The Antiviral Effect of Indonesian Medicinal Plant Extracts Against Dengue Virus In Vitro and In Silico. *Pathogens* 8, 85. doi: 10.3390/pathogens8020085.

Rothan, H. A., Abdulrahman, A. Y., Khazali, A. S., Nor Rashid, N., Chong, T. T., and Yusof, R. (2019). Carnosine exhibits significant antiviral activity against Dengue and Zika virus. *Journal of Peptide Science* 25, e3196. doi: 10.1002/psc.3196.

Rothan, H. A., Han, H. C., Ramasamy, T. S., Othman, S., Rahman, N. A., and Yusof, R. (2012). Inhibition of dengue NS2B-NS3 protease and viral replication in Vero cells by recombinant retrocyclin-1. *BMC Infectious Diseases* 12, 314. doi: 10.1186/1471-2334-12-314.

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.

Rothwell, J. A., Day, A. J., and Morgan, M. R. A. (2005). Experimental Determination of Octanol–Water Partition Coefficients of Quercetin and Related Flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4355–4360. doi: 10.1021/jf0483669.

Rush, B. (1951). An account of the bilious remitting yellow fever, as it appeared in the city of Philadelphia, in the year 1793. By Benjamin Rush, M.D. Professor of the institutes, and of clinical medicine, in the University of Pennsylvania. *The American Journal of Medicine* 11, 546–550. doi: 10.1016/0002-9343(51)90035-6.

Sabin, A. B. (1952). Research on Dengue during World War II. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1, 30–50. doi: 10.4269/ajtmh.1952.1.30.

Saeed, O., and Asif, A. (2020). “Chapter 2 - Dengue virus disease; the origins,” in *Dengue Virus Disease*, eds. A. I. Qureshi and O. Saeed (Academic Press), 9–16. doi: 10.1016/B978-0-12-818270-3.00002-3.

Salihu, L. (2012). Antioxidant and Antimicrobial Activities of Ethanol and N - Hexane Extracts of *Waltheria Indica* and *Mucuna Pruriens*. *Journal de l'innovation pharmaceutique et scientifique* 5, 5–8.

Samanta, A., Das, G., and Das, S. (2011). Roles of flavonoids in Plants. *International Journal of pharmaceutical science and technology* 6, 12–35.

Sánchez, I., Gómez-Garibay, F., Taboada, J., and Ruiz, B. H. (2000). Antiviral effect of flavonoids on the Dengue virus. *Phytotherapy Research* 14, 89–92. doi: 10.1002/(SICI)1099-1573(200003)14:2<89::AID-PTR569>3.0.CO;2-C.

Sanna, G., Madeddu, S., Giliberti, G., Ntalli, N. G., Cottiglia, F., De Logu, A., et al. (2015). Limonoids from *Melia azedarach* Fruits as Inhibitors of Flaviviruses and *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE* 10, e0141272. doi: 10.1371/journal.pone.0141272.

Sanofi (2017). Sanofi updates information on dengue vaccine. Available at: <https://www.sanofi.com/en/media-room/press-releases/2017/2017-11-29-16-36-30-1210526> [Accessed September 19, 2022].

Sato, S., Akiya, T., Nishizawa, H., and Suzuki, T. (2006). Total synthesis of three naturally occurring 6,8-di-C-glycosylflavonoids: phloretin, naringenin, and apigenin bis-C- β -d-glucosides. *Carbohydrate Research* 341, 964–970. doi: 10.1016/j.carres.2006.02.019.

Saunders, J. G. (1995). Systematics and evolution of *Waltheria* (Sterculiaceae: Hermannieae) - ProQuest.

Sauter, D., Schwarz, S., Wang, K., Zhang, R., Sun, B., and Schwarz, W. (2014). Genistein as Antiviral Drug against HIV Ion Channel. *Planta Med* 80, 682–687. doi: 10.1055/s-0034-1368583.

Schmidt, A. G., Lee, K., Yang, P. L., and Harrison, S. C. (2012). Small-Molecule Inhibitors of Dengue-Virus Entry. *PLOS Pathogens* 8, e1002627. doi: 10.1371/journal.ppat.1002627.

Sécretariat de GBIF (2021a). *Stenocline ericoides* (Bojer ex DC.). *Taxonomie de la dorsale GBIF*. Available at: <https://www.gbif.org/species/4244471> [Accessed September 23, 2022].

Sécretariat de GBIF (2021b). *Stenocline inuloides* (Bojer ex DC.). *Taxonomie de la dorsale GBIF*. Available at: <https://www.gbif.org/species/4244429> [Accessed September 23, 2022].

Secrétariat du GBIF (2021). *Waltheria indica* L. *Taxonomie de la dorsale GBIF*. Available at: <https://www.gbif.org/species/5406665> [Accessed September 24, 2022].

Secrétariat du GBIF (2022). *Pentopetia Decné*. *Taxonomie de la dorsale GBIF*. Available at: <https://www.gbif.org/species/7312458> [Accessed September 23, 2022].

Serbus, L. R., Casper-Lindley, C., Landmann, F., and Sullivan, W. (2008). The Genetics and Cell Biology of *Wolbachia* -Host Interactions. *Annu. Rev. Genet.* 42, 683–707. doi: 10.1146/annurev.genet.41.110306.130354.

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. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.105.

Shibata, C., Ohno, M., Otsuka, M., Kishikawa, T., Goto, K., Muroyama, R., et al. (2014). The flavonoid apigenin inhibits hepatitis C virus replication by decreasing mature microRNA122 levels. *Virology* 462–463, 42–48. doi: 10.1016/j.virol.2014.05.024.

Shubina, V. S., Kozina, V. I., and Shatalin, Y. V. (2021). Comparison of Antioxidant Properties of a Conjugate of Taxifolin with Glyoxylic Acid and Selected Flavonoids. *Antioxidants* 10, 1262. doi: 10.3390/antiox10081262.

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. *Letters in Applied Microbiology* 53, 602–607. doi: 10.1111/j.1472-765X.2011.03146.x.

Smit, J. M., Moesker, B., Rodenhuis-Zybert, I., and Wilschut, J. (2011). Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion. *Viruses* 3, 160–171. doi: 10.3390/v3020160.

Smith, J. L., Sheridan, K., Parkins, C. J., Frueh, L., Jemison, A. L., Strode, K., et al. (2018). Characterization and structure-activity relationship analysis of a class of antiviral compounds that directly bind dengue virus capsid protein and are incorporated into virions. *Antiviral Research* 155, 12–19. doi: 10.1016/j.antiviral.2018.04.019.

Sood, R., Raut, R., Tyagi, P., Pareek, P. K., Barman, T. K., Singhal, S., et al. (2015). Cissampelos pareira Linn: Natural Source of Potent Antiviral Activity against All Four Dengue Virus Serotypes. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 9, e0004255. doi: 10.1371/journal.pntd.0004255.

SPF (2022). Surveillance de la dengue à La Réunion. Point au 9 août 2022. *Agence régionale de La Santé*. Available at: <https://www.santepubliquefrance.fr/regions/ocean-indien/documents/bulletin-regional/2022/surveillance-de-la-dengue-a-la-reunion.-point-au-9-aout-2022> [Accessed August 12, 2022].

Stanaway, J. D., Shepard, D. S., Undurraga, E. A., Halasa, Y. A., Coffeng, L. E., Brady, O. J., et al. (2016). The Global Burden of Dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Infect Dis* 16, 712–723. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00026-8.

Steiner, R. A., Kalk, K. H., and Dijkstra, B. W. (2002). Anaerobic enzyme-substrate structures provide insight into the reaction mechanism of the copper-dependent quercetin 2,3-dioxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 16625–16630. doi: 10.1073/pnas.262506299.

Subramaniam, J., Murugan, K., Panneerselvam, C., Kovendan, K., Madhiyazhagan, P., Kumar, P. M., et al. (2015). Eco-friendly control of malaria and arbovirus vectors using the mosquitofish *Gambusia affinis* and ultra-low dosages of Mimosops elengi-synthesized silver nanoparticles: towards an integrative approach? *Environ Sci Pollut Res* 22, 20067–20083. doi: 10.1007/s11356-015-5253-5.

Suwanmanee, S., and Luplertlop, N. (2017). Dengue and Zika viruses: lessons learned from the similarities between these Aedes mosquito-vectorized arboviruses. *J Microbiol.* 55, 81–89. doi: 10.1007/s12275-017-6494-4.

Swamy, K. C. K., Kumar, N. N. B., Balaraman, E., and Kumar, K. V. P. P. (2009). Mitsunobu and Related Reactions: Advances and Applications. *Chem. Rev.* 109, 2551–2651. doi: 10.1021/cr800278z.

Sze, A., Olagnier, D., Hadj, S. B., Han, X., Tian, X. H., Xu, H.-T., et al. (2017). Sophoraflavenone G Restricts Dengue and Zika Virus Infection via RNA Polymerase Interference. *Viruses* 9, E287. doi: 10.3390/v9100287.

Tabidi, R. H., Babeker, E. A., and Osman, R. E. (2019). Evaluation of antibacterial activity and cytotoxicity of roots of *Waltheria indica*. *World Journal of Pharmaceutical Research* 8, 201–211. doi: 10.20959/wjpr20192-14146.

Talarico, L. B., Nosedá, M. D., Ducatti, D. R. B., Duarte, M. E. R., and Damonte, E. B. Y. 2011 (2011). Differential inhibition of dengue virus infection in mammalian and mosquito cells by iota-carrageenan. *Journal of General Virology* 92, 1332–1342. doi: 10.1099/vir.0.028522-0.

Talarico, L. B., Pujol, C. A., Zibetti, R. G. M., Faría, P. C. S., Nosedá, M. D., Duarte, M. E. R., et al. (2005). The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. *Antiviral Research* 66, 103–110. doi: 10.1016/j.antiviral.2005.02.001.

Tambyah, P. A., Koay, E. S. C., Poon, M. L. M., Lin, R. V. T. P., and Ong, B. K. C. (2008). Dengue Infection Study Group Dengue hemorrhagic fever transmitted by blood transfusion. *N Engl J Med* 359, 1526–1527. doi: 10.1056/NEJMc0708673.

Tan, Y. P., Houston, S. D., Modhiran, N., Savchenko, A. I., Boyle, G. M., Young, P. R., et al. (2019). Stachyonic Acid: A Dengue Virus Inhibitor from *Basilicum polystachyon*. *Chemistry – A European Journal* 25, 5664–5667. doi: 10.1002/chem.201900591.

Tanase, C., Bujor, O.-C., and Popa, V. I. (2019). “Chapter 3 - Phenolic Natural Compounds and Their Influence on Physiological Processes in Plants,” in *Polyphenols in Plants (Second Edition)*, ed. R. R. Watson (Academic Press), 45–58. doi: 10.1016/B978-0-12-813768-0.00003-7.

Tang, L. I., Ling, A. P., Koh, R. Y., Chye, S. M., and Voon, K. G. (2012). Screening of anti-dengue activity in methanolic extracts of medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12, 3. doi: 10.1186/1472-6882-12-3.

Tao, J., Hu, Q., Yang, J., Li, R., Li, X., Lu, C., et al. (2007). In vitro anti-HIV and -HSV activity and safety of sodium rutin sulfate as a microbicide candidate. *Antiviral Research* 75, 227–233. doi: 10.1016/j.antiviral.2007.03.008.

Tappe, D., Rissland, J., Gabriel, M., Emmerich, P., Günther, S., Held, G., et al. (2014). First case of laboratory-confirmed Zika virus infection imported into Europe, November 2013. *Eurosurveillance* 19, 20685. doi: 10.2807/1560-7917.ES2014.19.4.20685.

Tarasuk, M., Songprakhon, P., Chimm, P., Sratongno, P., Na-Bangchang, K., and Yenchitsomanus, P. (2017). Alpha-mangostin inhibits both dengue virus production and cytokine/chemokine expression. *Virus Research* 240, 180–189. doi: 10.1016/j.virusres.2017.08.011.

Tay, M. Y. F., Fraser, J. E., Chan, W. K. K., Moreland, N. J., Rathore, A. P., Wang, C., et al. (2013). Nuclear localization of dengue virus (DENV) 1–4 non-structural protein 5; protection against all 4 DENV serotypes by the inhibitor Ivermectin. *Antiviral Research* 99, 301–306. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.06.002.

Termer, M., Carola, C., Salazar, A., Keck, C. M., Hemberger, J., and von Hagen, J. (2021). Identification of plant metabolite classes from *Waltheria Indica* L. extracts regulating inflammatory immune responses via COX-2 inhibition. *Journal of Ethnopharmacology* 270, 113741. doi: 10.1016/j.jep.2020.113741.

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. doi: 10.1084/jem.65.6.767.

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. doi: 10.1084/jem.65.6.787.

Thomas, S. J., Endy, T. P., Rothman, A. L., and Barrett, A. D. (2015). “155 - Flaviviruses (Dengue, Yellow Fever, Japanese Encephalitis, West Nile Encephalitis, St. Louis Encephalitis, Tick-Borne Encephalitis, Kyasanur Forest Disease, Alkhurma Hemorrhagic Fever, Zika),” in *Mandell, Douglas, and Bennett’s Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)*, eds. J. E. Bennett, R. Dolin, and M. J. Blaser (Philadelphia: W.B. Saunders), 1881-1903.e6. doi: 10.1016/B978-1-4557-4801-3.00155-7.

Thomas, S. J., and Yoon, I.-K. (2019). A review of Dengvaxia®: development to deployment. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 15, 2295–2314. doi: 10.1080/21645515.2019.1658503.

Tommasini, S., Raneri, D., Ficarra, R., Calabrò, M. L., Stancanelli, R., and Ficarra, P. (2004). Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with beta-cyclodextrin. *J Pharm Biomed Anal* 35, 379–387. doi: 10.1016/S0731-7085(03)00647-2.

Tong, X., Qiu, H., Zhang, X., Shi, L., Wang, G., Ji, F., et al. (2010). WSS45, a sulfated α -D-glucan, strongly interferes with Dengue 2 virus infection in vitro. *Acta Pharmacol Sin* 31, 585–592. doi: 10.1038/aps.2010.29.

Troost, B., and Smit, J. M. (2020). Recent advances in antiviral drug development towards dengue virus. *Current Opinion in Virology* 43, 9–21. doi: 10.1016/j.coviro.2020.07.009.

Tropicos (2022a). Stenocline DC. *Tropicos*. Available at: <https://www.tropicos.org/name/Search?name=Stenocline%20ericoides> [Accessed September 23, 2022].

Tropicos (2022b). Stenocline ericoides DC. *Tropicos*. Available at: <https://www.tropicos.org/name/Search?name=Stenocline%20ericoides> [Accessed September 23, 2022].

Tropicos (2022c). Tropicos | Name - Stenocline inuloides. *Tropicos*. Available at: <https://www.tropicos.org/name/2704011> [Accessed September 23, 2022].

Tropicos (n.d.). Tropicos | Name - Waltheria indica. *Tropicos*. Available at: <https://www.tropicos.org/name/30400110> [Accessed September 24, 2022].

Trouillas, P., Marsal, P., Siri, D., Lazzaroni, R., and Duroux, J.-L. (2006). A DFT study of the reactivity of OH groups in quercetin and taxifolin antioxidants: The specificity of the 3-OH site. *Food Chemistry* 97, 679–688. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.05.042.

Trujillo-Correa, A. I., Quintero-Gil, D. C., Diaz-Castillo, F., Quiñones, W., Robledo, S. M., and Martinez-Gutierrez, M. (2019). In vitro and in silico anti-dengue activity of compounds obtained from Psidium guajava through bioprospecting. *BMC Complement Altern Med* 19, 298. doi: 10.1186/s12906-019-2695-1.

Tsai, F.-J., Lin, C.-W., Lai, C.-C., Lan, Y.-C., Lai, C.-H., Hung, C.-H., et al. (2011). Kaempferol inhibits enterovirus 71 replication and internal ribosome entry site (IRES)

activity through FUBP and HNRP proteins. *Food Chemistry* 128, 312–322. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.03.022.

Useful Tropical Plants (2014). *Waltheria indica* L. Malvaceae. *Useful Tropical Plants*. Available at: <https://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Waltheria+indica> [Accessed September 25, 2022].

Valentová, K., Vrba, J., Bancířová, M., Ulrichová, J., and Křen, V. (2014). Isoquercitrin: Pharmacology, toxicology, and metabolism. *Food and Chemical Toxicology* 68, 267–282. doi: 10.1016/j.fct.2014.03.018.

van Acker, S. A. B. E., de Groot, M. J., van den Berg, D.-J., Tromp, M. N. J. L., Donné-Op den Kelder, G., van der Vijgh, W. J. F., et al. (1996). A Quantum Chemical Explanation of the Antioxidant Activity of Flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.* 9, 1305–1312. doi: 10.1021/tx9600964.

van Cleef, K. W. R., Overheul, G. J., Thomassen, M. C., Kaptein, S. J. F., Davidson, A. D., Jacobs, M., et al. (2013). Identification of a new dengue virus inhibitor that targets the viral NS4B protein and restricts genomic RNA replication. *Antiviral Research* 99, 165–171. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.05.011.

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. doi: 10.3389/fmicb.2017.01314.

Venkatesham, A., Saudi, M., Kaptein, S., Neyts, J., Rozenski, J., Froeyen, M., et al. (2017). Aminopurine and aminoquinazoline scaffolds for development of potential dengue virus inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 126, 101–109. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.10.008.

Verdier-Pinard, P. (1994). Action des alcaloïdes de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) sur les protéines microtubulaires: formation différentielle des paracristaux de tubuline. Available at: <https://www.theses.fr/1994TOU30273> [Accessed September 22, 2022].

Verguin, J. (1956). Vingt plantes médicinales du Bas-Mangoky (Côte Ouest de Madagascar). *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée* 3, 412–414. doi: 10.3406/jatba.1956.2321.

Verpoorte, R. (1984). “Métabolisme secondaire,” in *Ingénierie métabolique du métabolisme secondaire des plantes* (Springer-Verlag Berlin Beideiberg GmbH), 1–29. Available at: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-015-9423-3_1 [Accessed September 2, 2022].

Vincetti, P., Kaptein, S. J. F., Costantino, G., Neyts, J., and Radi, M. (2019). Scaffold Morphing Approach To Expand the Toolbox of Broad-Spectrum Antivirals Blocking Dengue/Zika Replication. *ACS Med. Chem. Lett.* 10, 558–563. doi: 10.1021/acsmchemlett.8b00583.

Waldock, J., Chandra, N. L., Lelieveld, J., Proestos, Y., Michael, E., Christophides, G., et al. (2013). The role of environmental variables on *Aedes albopictus* biology and chikungunya epidemiology. *Pathogens and Global Health* 107, 224–241. doi: 10.1179/2047773213Y.0000000100.

Walle, T. (2004). Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* 36, 829–837. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.002.

Wang, P., Hu, K., Luo, S., Zhang, M., Deng, X., Li, C., 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. doi: 10.1016/j.virol.2015.11.006.

Watrous, J., Roach, P., Alexandrov, T., Heath, B. S., Yang, J. Y., Kersten, R. D., et al. (2012). Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, E1743–E1752. doi: 10.1073/pnas.1203689109.

Weaver, S. C. (2018). Prediction and prevention of urban arbovirus epidemics: A challenge for the global virology community. *Antiviral Research* 156, 80–84. doi: 10.1016/j.antiviral.2018.06.009.

WFO (2022a). *Pentopetia Decné.* WFO. Available at: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-4000028665> [Accessed September 23, 2022].

WFO (2022b). *Stenocline ericoides DC.* WFO. Available at: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000043272> [Accessed September 23, 2022].

WFO (2022c). *Stenocline inuloides DC.* WFO. Available at: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000069415> [Accessed September 23, 2022].

WFO (2022d). *Waltheria indica* L. WFO. Available at: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000427365> [Accessed September 24, 2022].

Whitby, K., Pierson, T. C., Geiss, B., Lane, K., Engle, M., Zhou, Y., et al. (2005). Castanospermine, a Potent Inhibitor of Dengue Virus Infection In Vitro and In Vivo. *Journal of Virology* 79, 8698–8706. doi: 10.1128/JVI.79.14.8698-8706.2005.

WHO (2018). Dengue vaccine: WHO position paper – September 2018 – Note de synthèse de l’OMS sur le vaccin contre la dengue– septembre 2018. *Weekly Epidemiological Record = Relevé épidémiologique hebdomadaire* 93, 457–476.

WHO (2022). Dengue et dengue sévère. Available at: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> [Accessed April 26, 2022].

WHO, FAO, and OIE (2004). WHO EMRO | Maladies émergentes | Thèmes de santé. Genève Suisse Available at: <http://www.emro.who.int/fr/health-topics/emerging-diseases/Page-1.html> [Accessed July 13, 2022].

Williams, J. R., Gong, H., Hoff, N., and Olubodun, O. I. (2005). Synthesis of the shark repellent pavoninin-4. *J Org Chem* 70, 10732–10736. doi: 10.1021/jo051733a.

Williamson, A. (1850). XLV. Theory of ætherification. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* 37, 350–356. doi: 10.1080/14786445008646627.

Winkel, B. S. J. (2006). “The Biosynthesis of Flavonoids,” in *The Science of Flavonoids*, ed. E. Grotewold (New York, NY: Springer), 71–95. doi: 10.1007/978-0-387-28822-2_3.

Wong, G., He, S., Siragam, V., Bi, Y., Mbikay, M., Chretien, M., et al. (2017). Antiviral activity of quercetin-3-β-O-D-glucoside against Zika virus infection. *Virol Sin* 32, 545–547. doi: 10.1007/s12250-017-4057-9.

Wu, D., Mao, F., Ye, Y., Li, J., Xu, C., Luo, X., et al. (2015). Policresulen, a novel NS2B/NS3 protease inhibitor, effectively inhibits the replication of DENV2 virus in BHK-21 cells. *Acta Pharmacol Sin* 36, 1126–1136. doi: 10.1038/aps.2015.56.

Xiao, M., Shao, Y., Yan, W., and Zhang, Z. (2011). Measurement and correlation of solubilities of apigenin and apigenin 7-O-rhamnosylglucoside in seven solvents at different temperatures. *The Journal of Chemical Thermodynamics* 43, 240–243. doi: 10.1016/j.jct.2010.09.013.

Xu, L., Su, W., Jin, J., Chen, J., Li, X., Zhang, X., et al. (2014). Identification of Luteolin as Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16 Inhibitors through Reporter Viruses and Cell Viability-Based Screening. *Viruses* 6, 2778–2795. doi: 10.3390/v6072778.

Yamamoto, T., Yoshimura, M., Yamagushi, F., Koushi, T., Tsuji, R., SAITO, M., et al. (2004). Anti-allergic Activity of Naringenin Chalcone from a Tomato Skin Extract. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 68, 1706–1711. doi: 10.1271/bbb.68.1706.

Yang, B., Liu, H., Yang, J., Gupta, V. K., and Jiang, Y. (2018a). New insights on bioactivities and biosynthesis of flavonoid glycosides. *Trends in Food Science & Technology* 79, 116–124. doi: 10.1016/j.tifs.2018.07.006.

Yang, B., Liu, H., Yang, J., Gupta, V. K., and Jiang, Y. (2018b). New insights on bioactivities and biosynthesis of flavonoid glycosides. *Trends in Food Science & Technology* 79, 116–124. doi: 10.1016/j.tifs.2018.07.006.

Yang, J.-M., Chen, Y.-F., Tu, Y.-Y., Yen, K.-R., and Yang, Y.-L. (2007). Combinatorial Computational Approaches to Identify Tetracycline Derivatives as Flavivirus Inhibitors. *PLOS ONE* 2, e428. doi: 10.1371/journal.pone.0000428.

Yao, X., Ling, Y., Guo, S., Wu, W., He, S., Zhang, Q., et al. (2018). Tatanan A from the *Acorus calamus* L. root inhibited dengue virus proliferation and infections. *Phytomedicine* 42, 258–267. doi: 10.1016/j.phymed.2018.03.018.

Yao, Z.-W., Liu, H., Zhou, R., Feng, M.-Y., Wang, F., Qin, X.-J., et al. (2021). Non-volatile acylphloroglucinol components from *Eucalyptus robusta* inhibit Zika virus by impairing RdRp activity of NS5. *Bioorganic Chemistry* 116, 105303. doi: 10.1016/j.bioorg.2021.105303.

Youbare-Ziebrou, M., Lompo, M., Ouedraogo, N., Yaro, B., and Guissoun, I. (2016). Antioxidant, analgesic and anti-inflammatory activities of the leafy stems of *Waltheria indica* L. (Sterculiaceae). *J App Pharm Sci*, 124–129. doi: 10.7324/JAPS.2016.60219.

Young, P. R. (2018). Arboviruses: A Family on the Move. *Adv Exp Med Biol* 1062, 1–10. doi: 10.1007/978-981-10-8727-1_1.

Young, P. R., Ng, L. F. P., Hall, R. A., Smith, D. W., and Johansen, C. A. (2014). “14 - Arbovirus Infections,” in *Manson’s Tropical Infectious Diseases (Twenty-third Edition)*, eds. J. Farrar, P. J. Hotez, T. Junghanss, G. Kang, D. Lalloo, and N. J. White (London: W.B. Saunders), 129-161.e3. doi: 10.1016/B978-0-7020-5101-2.00015-7.

Yu, J.-S., Wu, Y.-H., Tseng, C.-K., Lin, C.-K., Hsu, Y.-C., Chen, Y.-H., et al. (2017a). Schisandrin A inhibits dengue viral replication via upregulating antiviral interferon responses through STAT signaling pathway. *Sci Rep* 7, 45171. doi: 10.1038/srep45171.

Yu, Y., Deng, Y.-Q., Zou, P., Wang, Q., Dai, Y., Yu, F., et al. (2017b). A peptide-based viral inactivator inhibits Zika virus infection in pregnant mice and fetuses. *Nat Commun* 8, 15672. doi: 10.1038/ncomms15672.

Yuan, S., Chan, J. F.-W., den-Haan, H., Chik, K. K.-H., Zhang, A. J., Chan, C. C.-S., et al. (2017). Structure-based discovery of clinically approved drugs as Zika virus NS2B-NS3 protease inhibitors that potently inhibit Zika virus infection in vitro and in vivo. *Antiviral Research* 145, 33–43. doi: 10.1016/j.antiviral.2017.07.007.

Zailani, A. H., Jada, S. M., and Usman, A. (2010). Antimicrobial activity of *Waltheria indica*. *Journal of American Science* 6, 1591–1594.

Zandi, K., Lim, T.-H., Rahim, N.-A., Shu, M.-H., Teoh, B.-T., Sam, S.-S., et al. (2013). Extract of *Scutellaria baicalensis* inhibits dengue virus replication. *BMC Complement Altern Med* 13, 1–10. doi: 10.1186/1472-6882-13-91.

Zandi, K., Teoh, B. T., Sam, S. S., Wong, P. F., Mustafa, M. R., and AbuBakar, S. (2011a). In vitro antiviral activity of fisetin, rutin and naringenin against dengue virus type-2. *Journal of Medicinal Plants Research* 5, 5534–5539.

Zandi, K., Teoh, B.-T., Sam, S.-S., Wong, P.-F., Mustafa, M. R., and Abubakar, S. (2011b). Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. *Viol J* 8, 560. doi: 10.1186/1743-422X-8-560.

Zerbo, P., Millogo, R. J., Nacoulma, O. G., and Damme, P. V. (2012). Plantes médicinales et pratiques médicales au Burkina Faso: cas des Sanan. *Pharmacopée et médecine traditionnelle africaine* 16. Available at: <http://publication.lecames.org/index.php/pharm/article/view/13> [Accessed September 25, 2022].

Zhang, W., Qiao, H., Lv, Y., Wang, J., Chen, X., Hou, Y., et al. (2014). Apigenin Inhibits Enterovirus-71 Infection by Disrupting Viral RNA Association with trans-Acting Factors. *PLOS ONE* 9, e110429. doi: 10.1371/journal.pone.0110429.

Zhao, T., Tang, H., Xie, L., Zheng, Y., Ma, Z., Sun, Q., et al. (2019). *Scutellaria baicalensis* Georgi. (Lamiaceae): a review of its traditional uses, botany, phytochemistry,

pharmacology and toxicology. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 71, 1353–1369. doi: 10.1111/jphp.13129.

Zhu, Y.-Z., Cao, M.-M., Wang, W.-B., Wang, W., Ren, H., Zhao, P., et al. (2012). 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. doi: 10.1099/vir.0.034637-0.

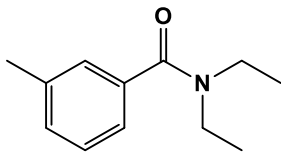
Zongo, R. (2013). Caractérisation chimique et biologique de *Waltheria indica* L. (Malvaceae), herbacée utilisée en médecine traditionnelle au Burkina Faso pour la prise en charge de l'asthme. Available at: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00949223> [Accessed July 19, 2021].

Zou, M., Liu, H., Li, J., Yao, X., Chen, Y., Ke, C., et al. (2020). Structure-activity relationship of flavonoid bifunctional inhibitors against Zika virus infection. *Biochemical Pharmacology* 177, 113962. doi: 10.1016/j.bcp.2020.113962.

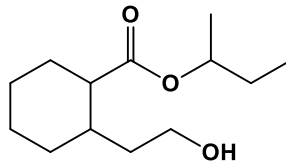
Annexes

ANNEXE 1 : Profil chimique des produits utilisés dans la lutte antivectorielle

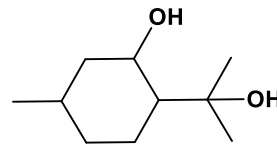
Répulsifs



DEET

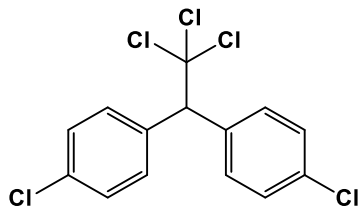


Icaridine



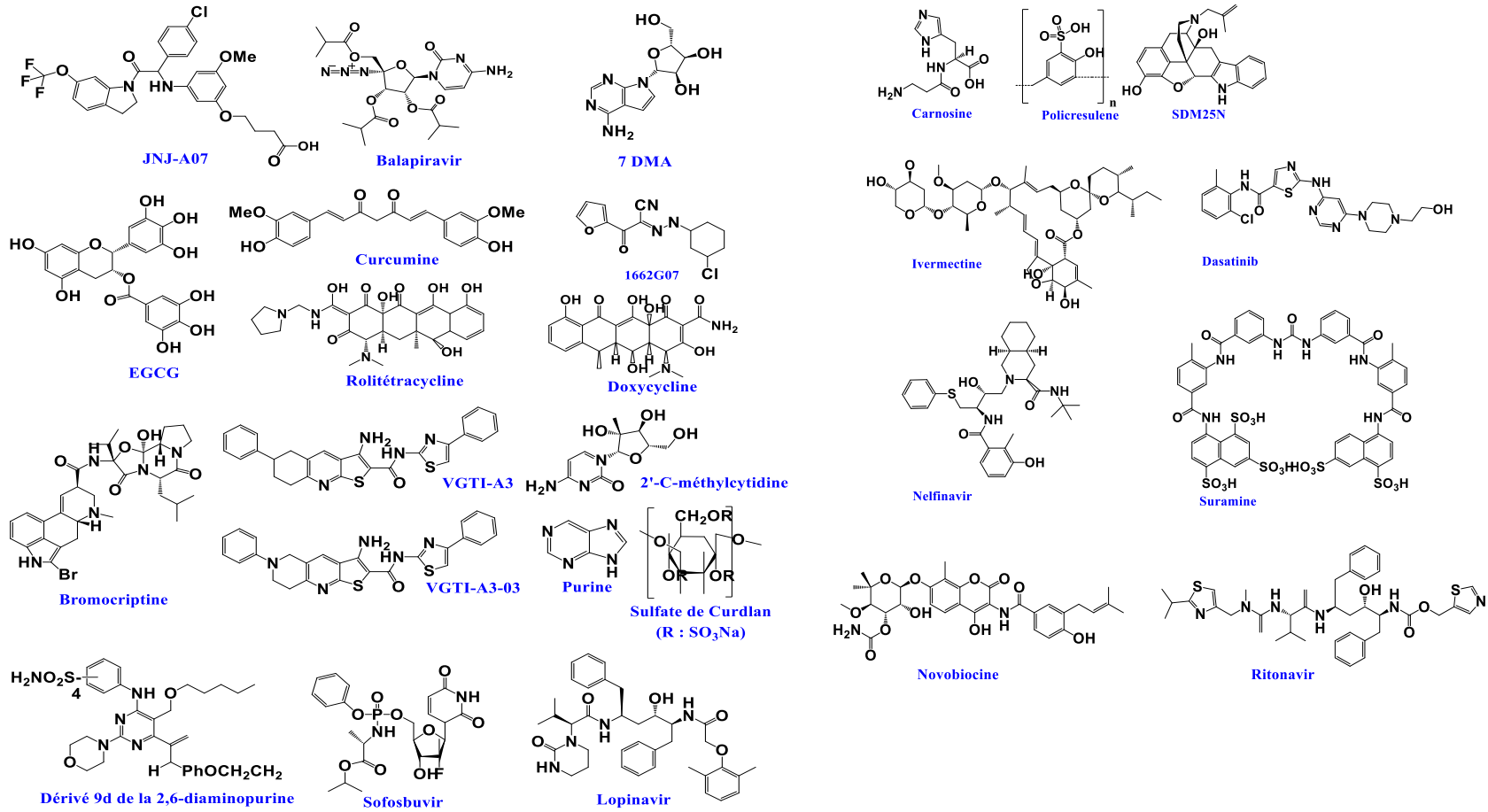
PMD

Insecticides

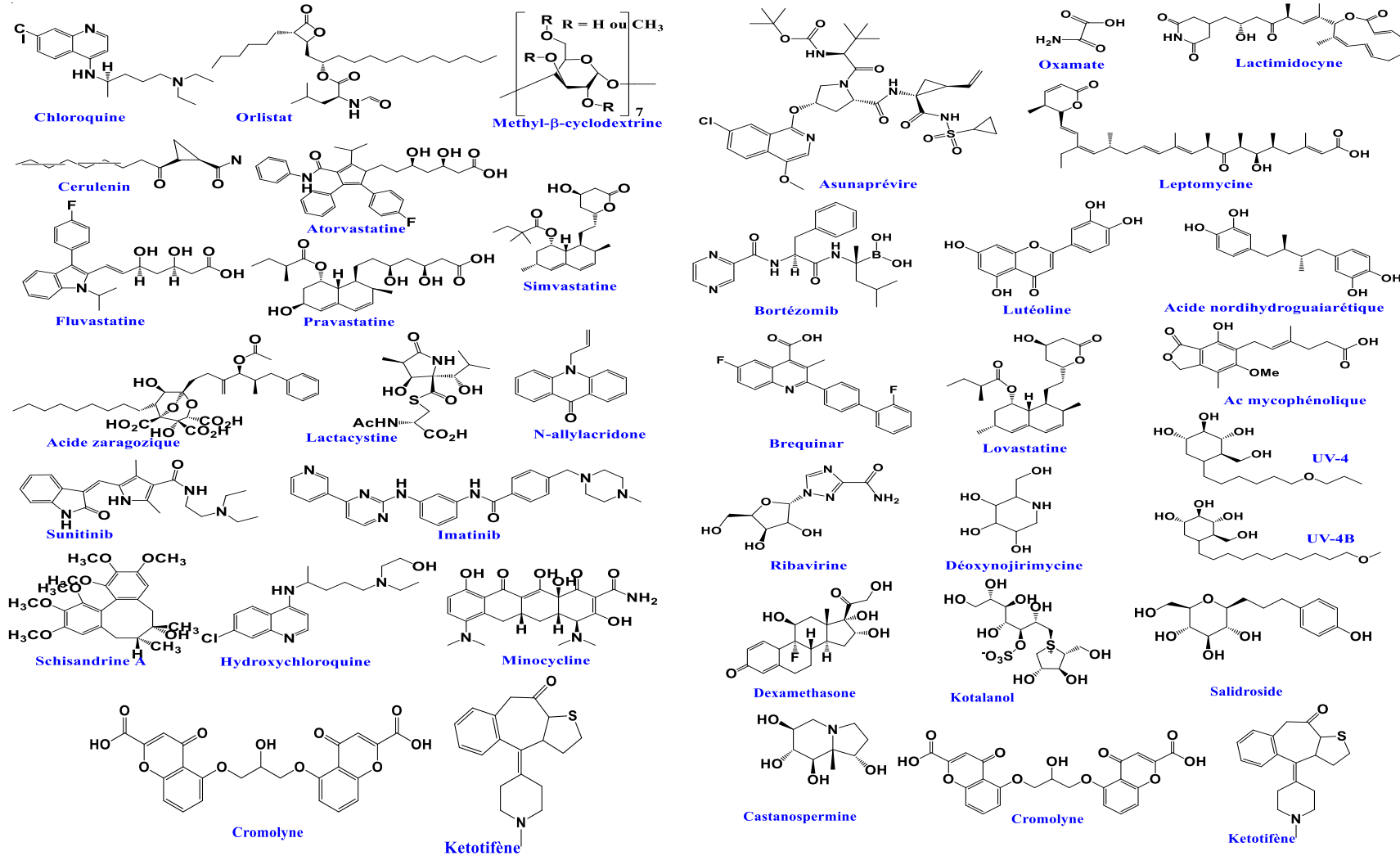


DDT

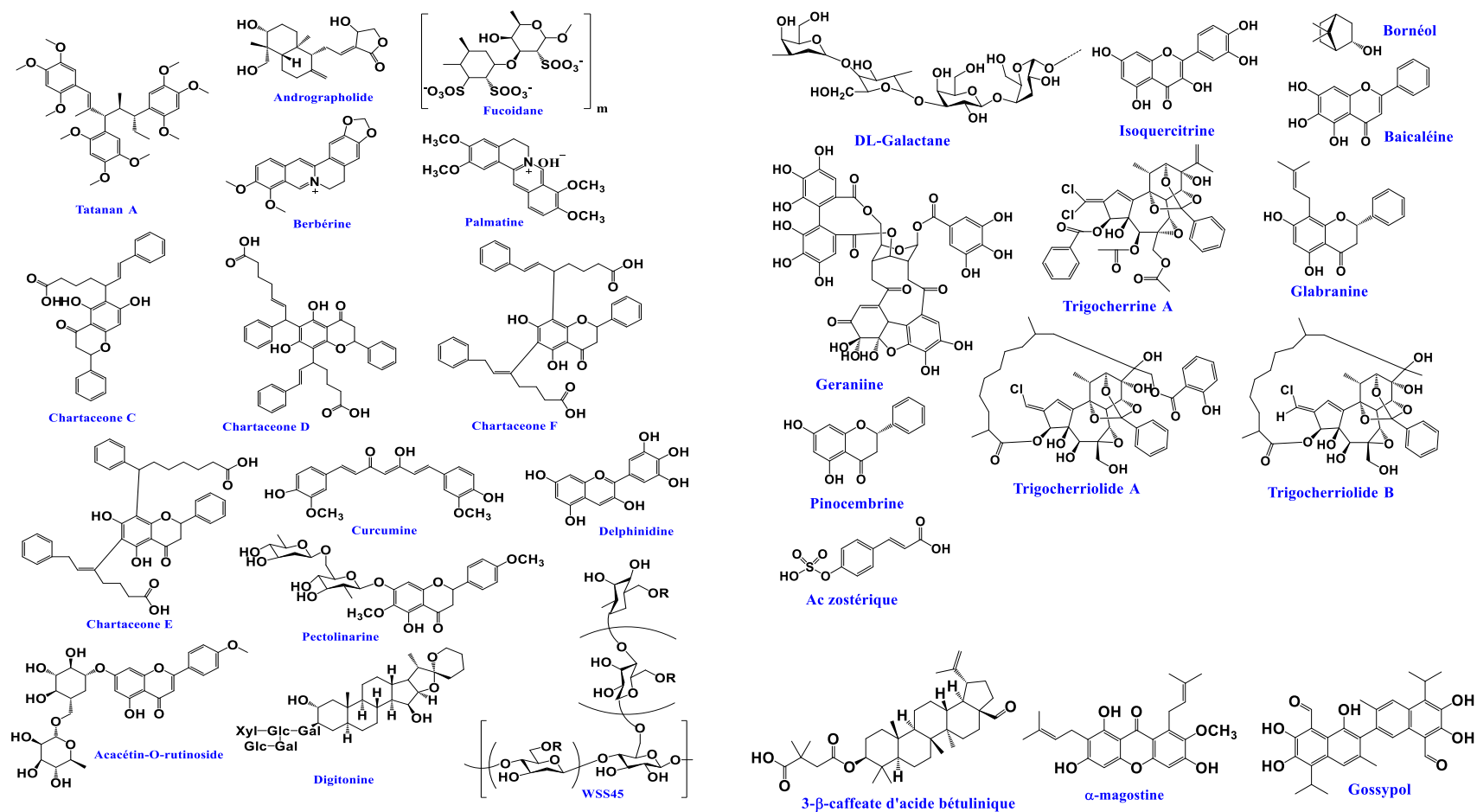
ANNEXE 2 : Liste non exhaustive des DAA (Direct-Acting Antiviral) contre ZIKV et DENV



ANNEXE 3 : Liste non exhaustive des HDA (Host-Directed Antivirals) contre ZIKV et DENV

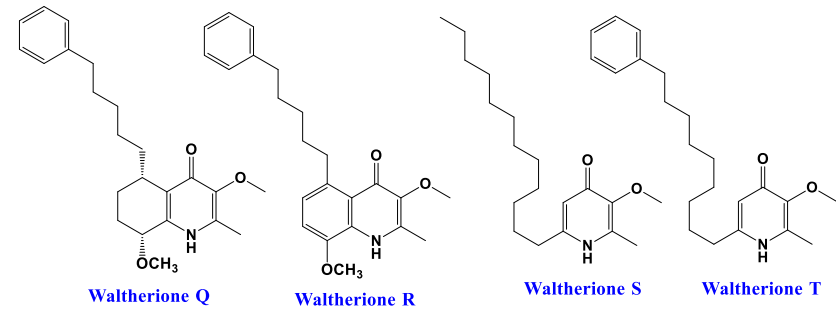
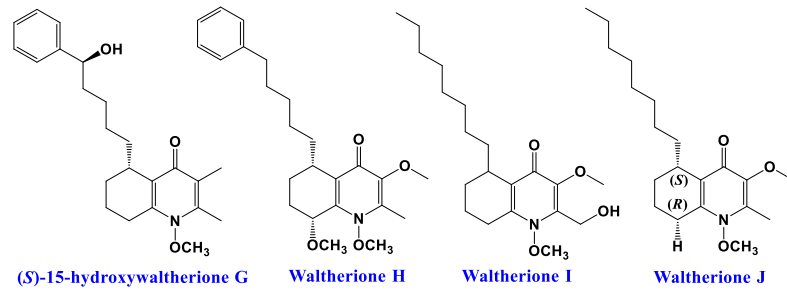
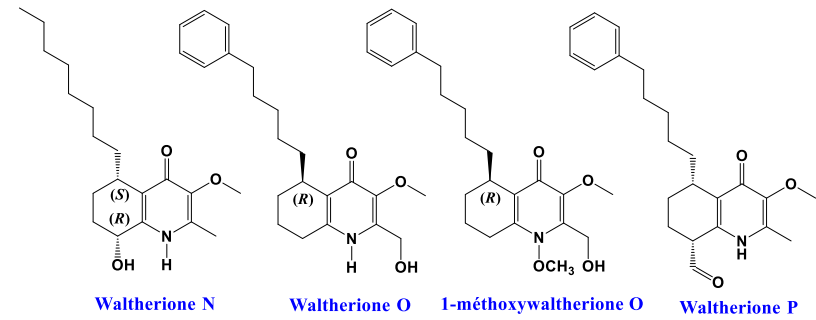
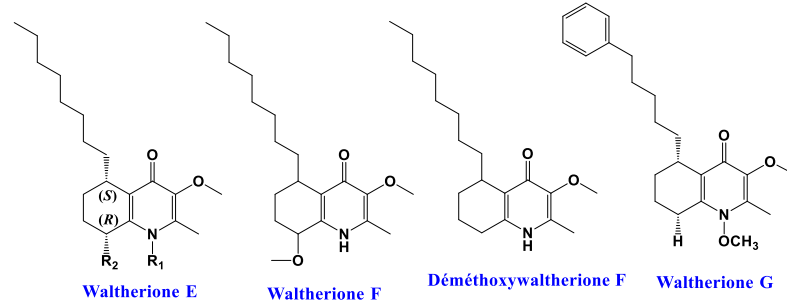
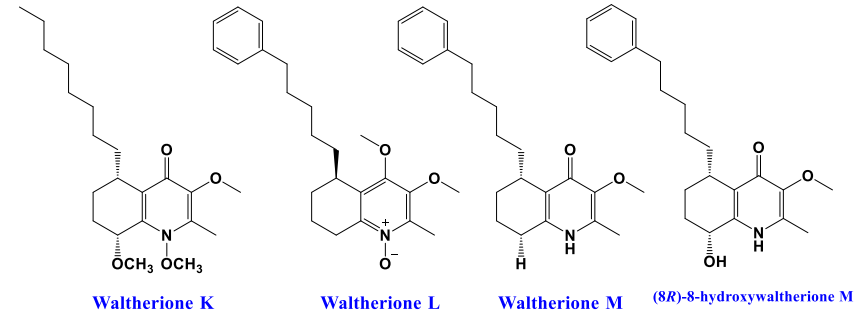
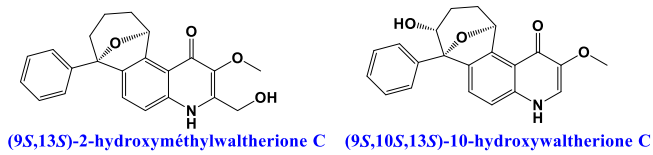
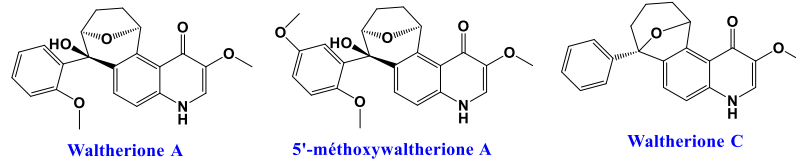


ANNEXE 4 : Liste des molécules bioactives isolées des plantes anti-ZIKV et anti-DENV



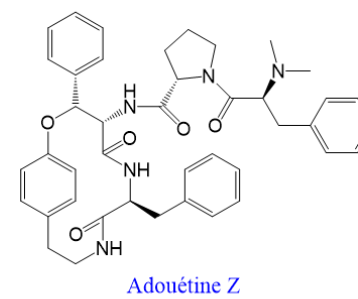
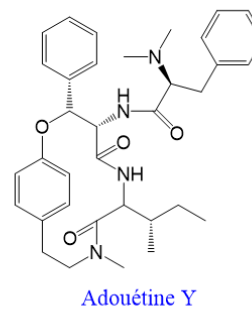
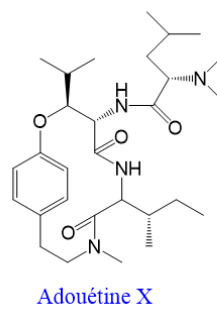
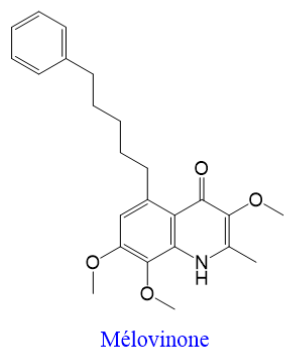
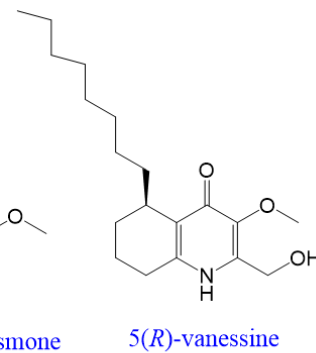
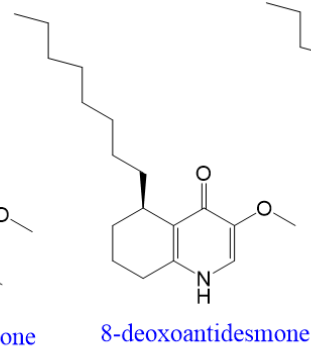
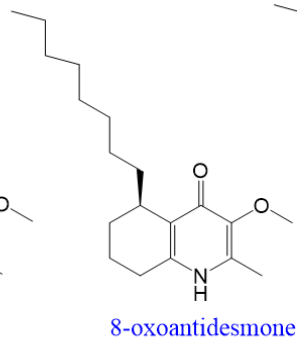
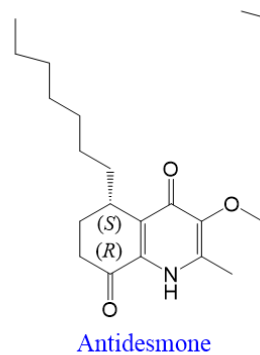
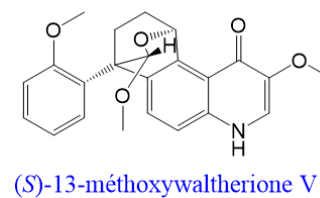
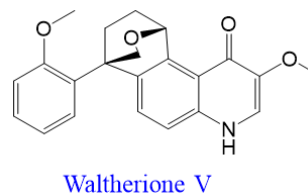
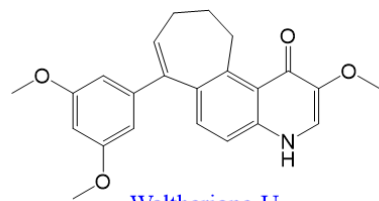
ANNEXE 5 : Composition chimique de *W. indica*

ALCALOIDES QUINOLEIQUES



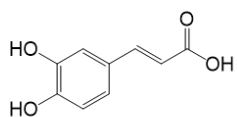
ANNEXE 5 : Composition chimique de *W. indica*

ALCALOIDES QUINOLEIQUES

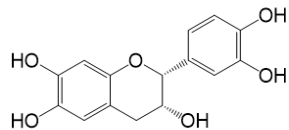


ANNEXE 5 : Composition chimique de *W. indica*

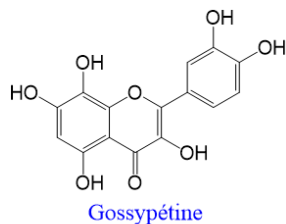
Flavonoïdes



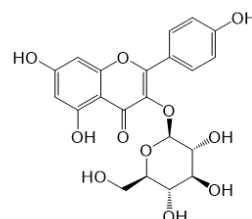
Acide caféique



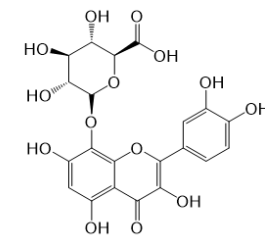
(-)-épicatéchine



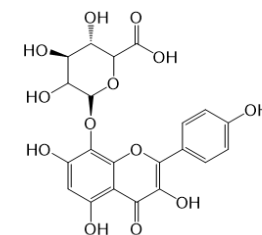
Gossypétine



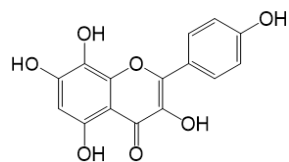
Kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside



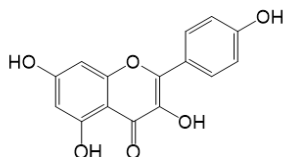
Gossypétin-8-O-glucuronide



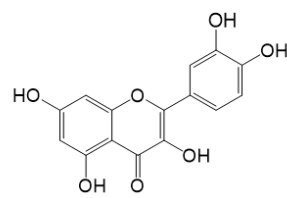
Herbacétin-8-O-glucuronide



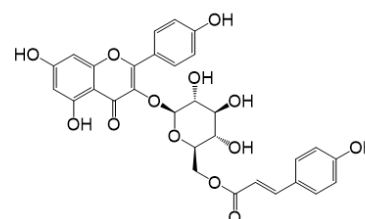
Herbacétine



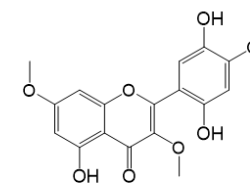
Kaempférol



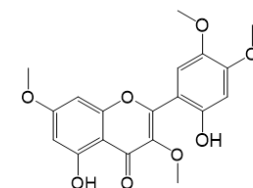
Quercétine



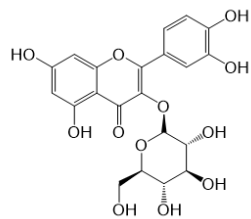
Tilioside



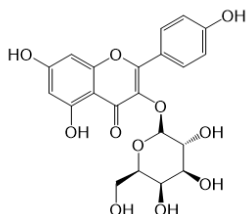
2',5,5'-trihydroxy-3,4,7-triméthoxyflavone



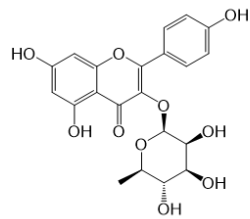
2,5-dihydroxy-3,4',5',7-tétraméthoxyflavone



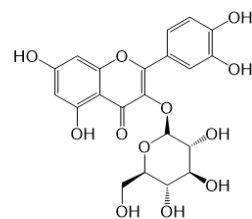
Isoquercitrine



Kaempférol-3-O-galactoside

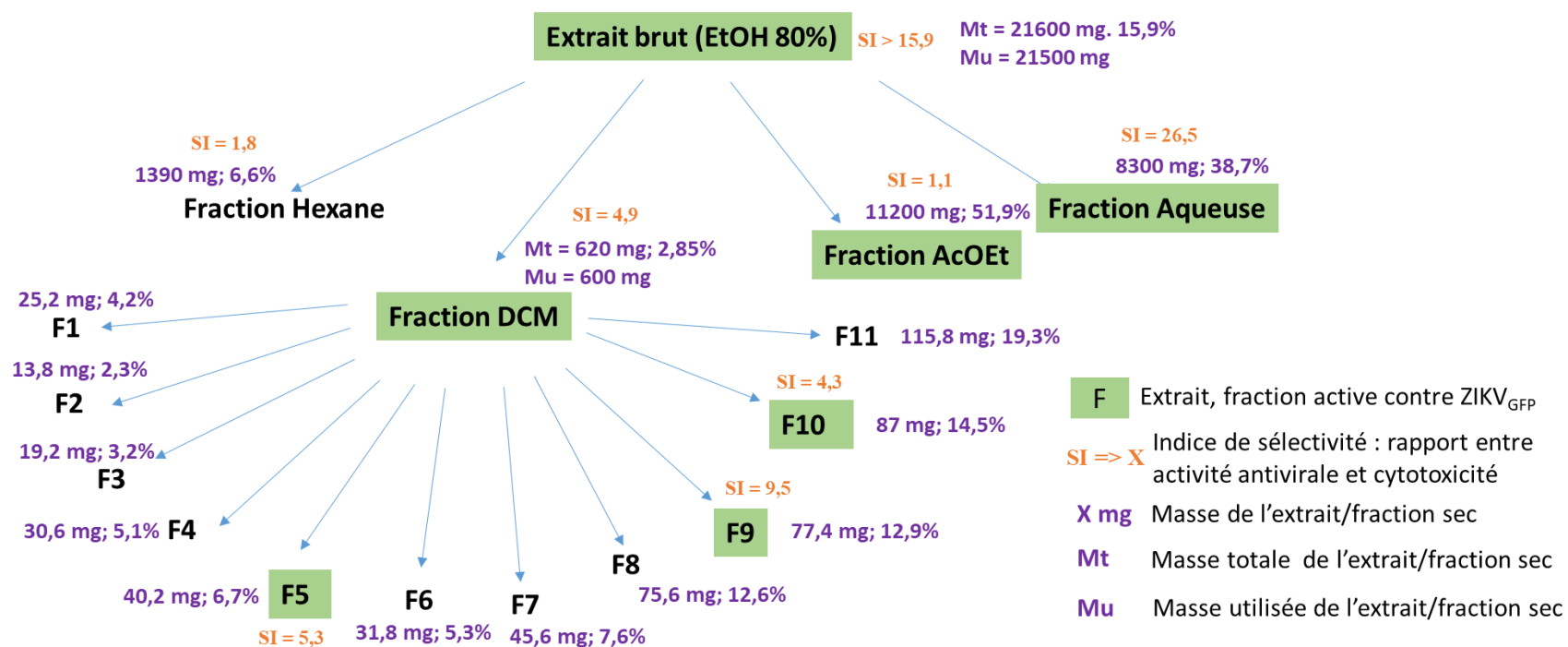


Kaempferol-3-O-α-L-rhamnoside

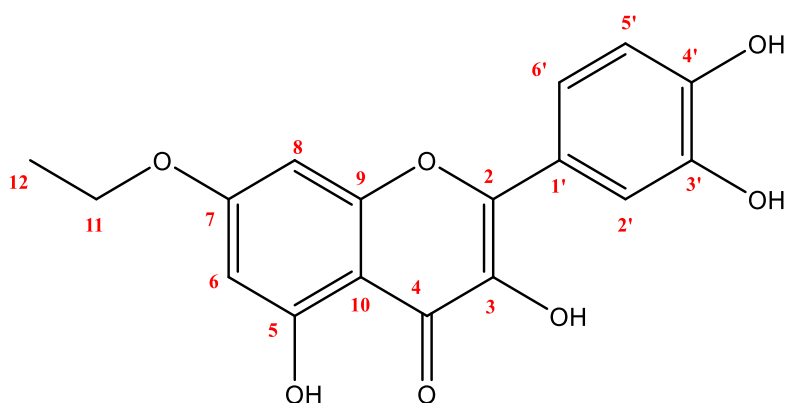


Isoquercitrine

ANNEXE 6 : Fractionnement de l'extrait EtOH de *W. indica*



ANNEXE 7 : Spectres RMN du éthyloxyquercétine



Position	δ_{1H} (ppm) (J en Hz)	δ_{13C} (ppm)
2	-	136,3
3	-	135,56
4	-	165,1
5	-	161
6	7,56 (d ; 3)	104,1
7	-	164,3
8	7,57 (d ; 3)	112,9
9	-	147
10	-	115,1
11	4,17 (q ; 4,5)	65,21
12	1,28 (t ; 2,7)	17,38
1'	-	128,45
2'	7,54 (d ; 2,1)	132,44
3'	-	135,96
4'	-	136,29
5'	7,59 (d ; 2,1)	132,61
6'	7,65 (d ; 1,8)	134,56
OH	4,81 (s)	-

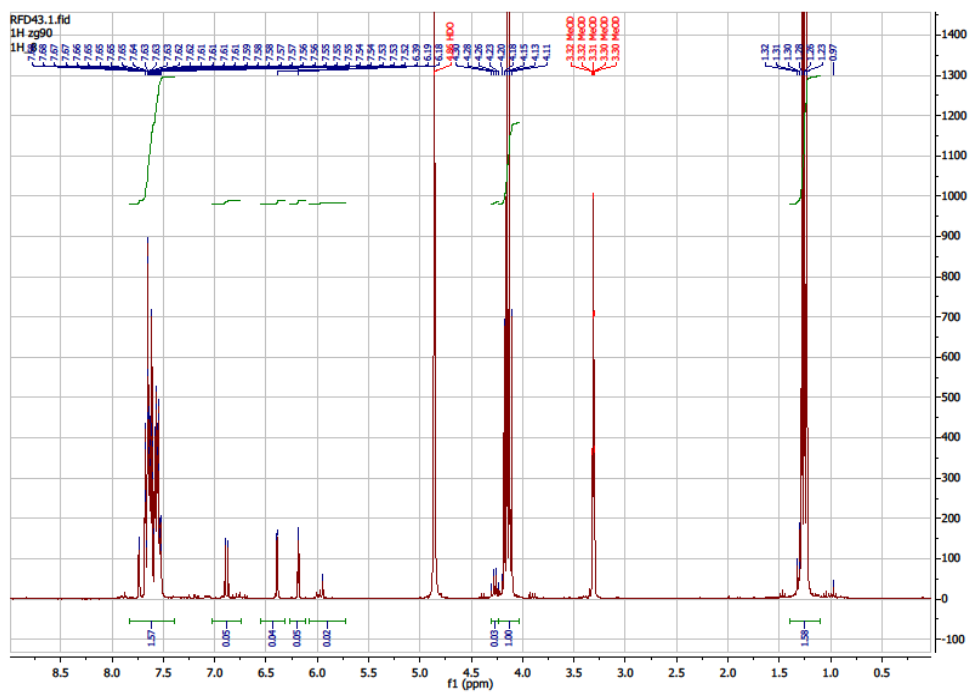
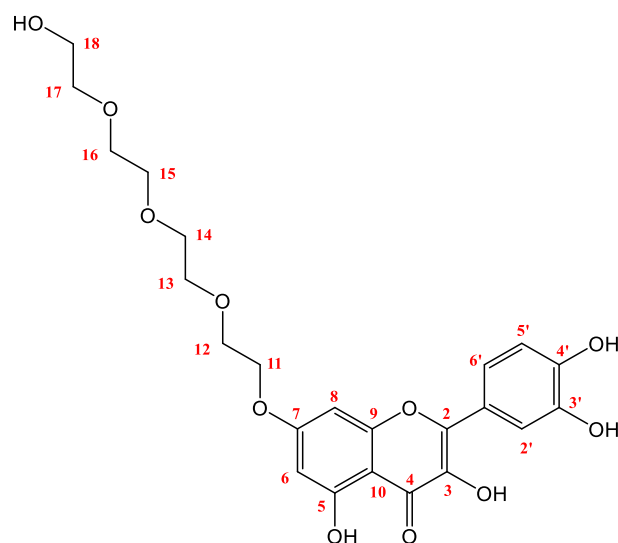


Figure 49- Spectre RMN ^1H (MeOD, 300MHz) de éthyloxyquercétine

ANNEXE 8 : Spectres RMN du tétraéthylèneglycoxyquercétine



Position	δ_{1H} (ppm) (J en Hz)	δ_{13C} (ppm)
2	-	144,80
3	-	128,65
4	-	164,4
5	-	156,8
6	6,29 (<i>d</i> ; 2,1)	93,01
7	-	161,07
8	6,78 (<i>d</i> ; 8,4)	97,8
9	-	147,35
10	-	114,5
11	3,54 (<i>t</i> ; 2,1)	70,16
12	3,21 (<i>t</i> ; 1,5)	69,9
13	3,20 (<i>t</i> ; 0,3)	72,25
14	3,20 (<i>t</i> ; 0,3)	72,25
15	3,20 (<i>t</i> ; 0,3)	72,25
16	3,20 (<i>t</i> ; 0,3)	72,25
17	3,20 (<i>t</i> ; 0,3)	70,16
18	3,46 (<i>t</i> ; 5,1)	60,82
1'	-	128,49
2'	6,28 (<i>d</i> , 2,1)	122,73
3'	-	131,73
4'	-	131,60
5'	7,5 (<i>d</i> , 2,1)	120,28
6'	7,6 (<i>d</i> , 2,1)	114,83
OH	4,7 (<i>s</i> , 2,1)	-

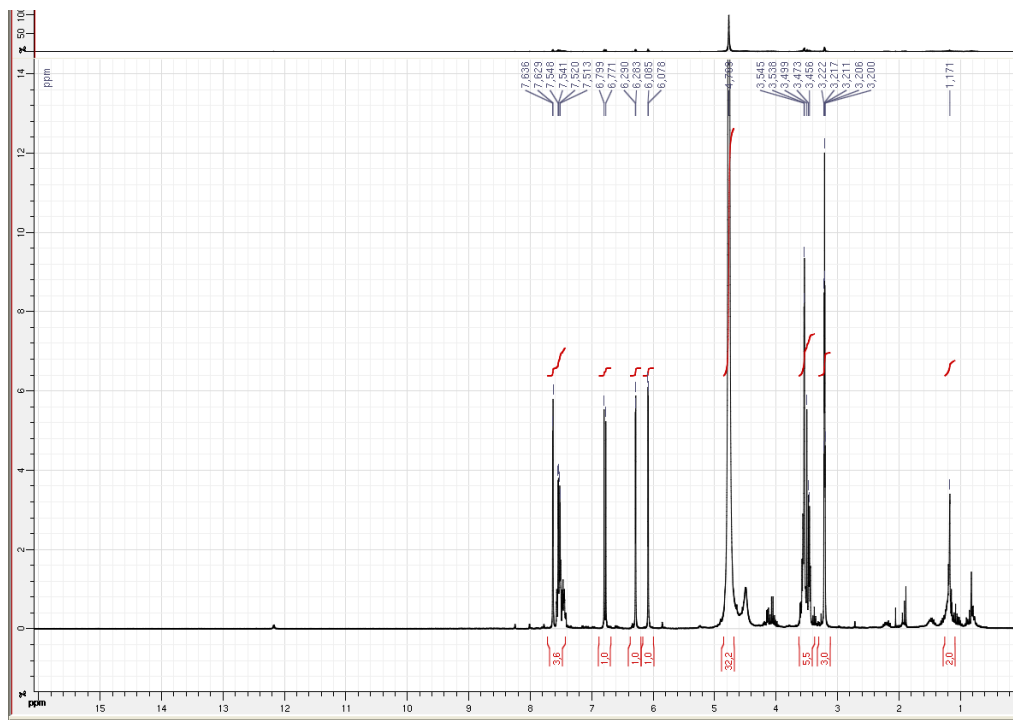


Figure 50- Spectre RMN ^1H (MeOD, 300MHz) de tétraéthylenglyoxyquercétine

ANNEXE 9 – Publication et participation aux congrès

Les résultats obtenus durant cette thèse ont été objet de :

1) Une publication soumise au journal *Pharmaceuticals*

Fenia D Ramiharimanana, Juliano G Haddad, Maminiana A Andriavalonirina, Cécile Apel, Nicolas Diotel, Philippe Desprès, Voahangy Vestalys Ramanandraibe, Chaker El Kalamouni, Antiviral effect of *Stenocline ericoides* and *inuloides*, two flavonoid-rich endemic plants from Madagascar, against Dengue and Zika virus. Soumise au *Pharmaceuticals* le 04 novembre 2022.

2) Deux publications en cours de rédaction

a) Caractérisation antivirale et fractionnement bio-guidé de *W. indica* contre le zika et la dengue.

b) Modification structurale bio-guidée pour l'étude de la relation entre la structure chimique des dérivés de quercétine et leur activité antivirale

Ma participation à des congrès internationaux m'ont permis de valoriser mes travaux de recherche au moyen de :

1) Une communication orale présentée au sein du congrès international American Society of Virology 2021

Fenia D Ramiharimanana, Juliano G Haddad, Maminiana A Andriavalonirina, Cécile Apel, Nicolas Diotel, Philippe Desprès, Voahangy Vestalys Ramanandraibe, Zika virus infection is severely impaired by the endemic medicinal plant of Madagascar : *Stenocline ericoides*, at doses showing no acute toxicity in zebrafish. *40th International Conference on American Society of Virology*, Etats Unis, 19-23 Juillet 2021.


2) Un poster présenté au sein du congrès international American Society of Virology 2022

Fenia D Ramiharimanana, Juliano G Haddad, Maminiana A Andriavalonirina, Cécile Apel, Nicolas Diotel, Philippe Desprès, Voahangy Vestalys Ramanandraibe, Extract from *Waltheria indica*, a medicinal plant from Madagascar, inhibits the infection of Zika and dengue viruses at different stages of the viral cycle, *41st International Conference on American Society of Virology*, University of Madison, 16-20 Juillet 2022.

LETTRE D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussigné(e) Ramiharimanana Fenia Diane, en ma qualité de doctorante de l'Université de La Réunion, déclare être consciente 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 13 Octobre 2022

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 tels 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.

