



**HAL**  
open science

# Activités antivirales et immunomodulatrices d'alcaloïdes contre l'infection par l'alphavirus arthritogénique O'nyong-nyong

Anne-Laure Sandenon Seteyen

## ► To cite this version:

Anne-Laure Sandenon Seteyen. Activités antivirales et immunomodulatrices d'alcaloïdes contre l'infection par l'alphavirus arthritogénique O'nyong-nyong. Médecine humaine et pathologie. Université de la Réunion, 2023. Français. NNT : 2023LARE0048 . tel-04560439

**HAL Id: tel-04560439**

**<https://theses.hal.science/tel-04560439>**

Submitted on 26 Apr 2024

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

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

# Université de La Réunion

## THESE

Présentée pour obtenir le titre de

Docteur en sciences de l'Université de La Réunion

Spécialité : Biologie-Santé

Par

Anne-Laure SANDENON SETEYEN

Activités antivirales et immunomodulatrices d'alcaloïdes contre l'infection par  
l'alphavirus arthritogénique O'nyong-nyong

Soutenance publique le 13 décembre 2023

M. Vincent LISOWSKI	Professeur Université de Montpellier	Rapporteur
M. Pierre ROQUES	Directeur de recherche Institut Pasteur	Rapporteur
M. Ahcène BOUMENDJEL	Professeur Université Grenoble-Alpes	Président
Mme Marie-Paule GONTHIER	Professeur Université de La Réunion	Examinatrice
Mme Emmanuelle GIRARD- VALENCIENNES	Maître de conférences Université de La Réunion	Co-encadrante
M. Jimmy SÉLAMBAROM	Maitre de conférences – HDR Université de La Réunion	Directeur de thèse

Thèse réalisée avec le soutien de



# Résumé

Les alphavirus arthritogéniques, comme le virus du Chikungunya, sont des agents pathogènes (ré)émergents, et s'inscrivent dans une préoccupation majeure de santé publique. La physiopathologie de l'infection peut entraîner une inflammation chronique par un dérèglement du système immunitaire dirigé vers le système musculo-squelettique.

En l'absence de traitement spécifique, la recherche de molécules efficaces demeure un enjeu important. Ces travaux visaient à caractériser le potentiel anti-alphaviral d'alcaloïdes dont l'intérêt a été préalablement établi à partir des données expérimentales de la littérature sur les isoquinoléines, quinolizidines et indoles. L'évaluation biologique de structures représentatives (berbérine, matrine, tabersonine) a été conduite par le développement d'un modèle *in vitro* à partir d'une lignée de fibroblastes (HS633T) et de l'alphavirus O'nyong-nyong (ONNV). Ce modèle biologique a permis d'établir un profil antiviral et immunomodulateur des alcaloïdes étudiés au regard de leur activité antivirale directe, mais aussi des réponses immunitaires liées à la voie essentielle des interférons de type 1 et aux voies canoniques et médiateurs-clés de l'inflammation. De la même façon, il a été établi le profil d'extraits végétaux obtenus de trois espèces de plantes de La Réunion susceptibles de contenir ces alcaloïdes : *Argemone mexicana*, *Sophora denudata* et *Tabernaemontana mauritiana*.

Ces travaux sur la recherche d'alcaloïdes anti-alphaviraux ont été développés à partir d'une évaluation biologique approfondie permettant d'établir leurs effets coopératifs ou non avec la réponse immunitaire. Ces travaux permettent d'envisager d'une part, le développement en pharmacochimie des molécules étudiées et d'autre part, de futures investigations selon une approche chimiotaxonomique, pour l'identification de nouvelles sources phytochimiques au sein de la biodiversité régionale.

**Mots-clés** : alphavirus O'nyong-nyong ; fibroblastes ; alcaloïdes ; extraits végétaux ; antiviral ; immunomodulateur.

# Summary

Arthritogenic alphaviruses, such as Chikungunya virus, are (re)emerging pathogens and are related to a major public health concern. Human infection by arthritogenic alphaviruses can lead to chronic inflammation resulting from a dysregulation of the immune system affecting the musculoskeletal system.

There is no specific treatment against infection by arthritogenic alphaviruses to date, and drug discovery remains an ongoing challenge. This study aimed to establish the therapeutic potential of alkaloids. Based on previous experimental evidences, special attention has been paid to isoquinoline-, quinolizidine- and indole-based alkaloids. Their anti-alphaviral potential was studied through representative compounds (berberine, matrine, tabersonine) by an *in vitro* model developed using fibroblast cell line (HS633T) and the O'nyong-nyong alphavirus (ONNV). Thus, the antiviral and immunomodulatory profile of the compounds was established from their direct antiviral activity against the virus, but also from the immune response related to the essential type 1 interferon pathway and the canonical inflammatory pathways/key mediators. Similar effects were established for plant-extracts produced from three species of Reunion Island and suspected for their alkaloid contents: *Argemone mexicana*, *Sophora denudata* and *Tabernaemontana mauritiana*.

In the search of anti-alphaviral alkaloids, this study was based on an in-deep biological evaluation to determine their cooperative effects or not on the host immune responses. The perspectives of this work include a pharmacochemical development from the new molecular sources, as well as a chemotaxonomic approach for the identification of new phytochemical sources within the regional biodiversity.

**Keywords:** O'nyong-nyong alphavirus; fibroblasts; alkaloids; plant extracts; antiviral; immunomodulator.

# Remerciements

En préambule à ce manuscrit, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ces travaux de thèse.

Je tiens à remercier le Docteur Pierre ROQUES et le Professeur Vincent LISOWSKI d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse en tant que rapporteurs. J'adresse également mes remerciements au Professeur Marie-Paule GONTHIER et au Professeur Ahcène BOUMENDJEL pour avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse.

Ces travaux ont été réalisés au sein de l'unité de recherche EPI (études pharmacologiques) de l'Université de La Réunion. Je tiens à remercier le Professeur Philippe GASQUE, administrateur provisoire de EPI, de m'avoir ouvert les portes de la recherche et d'avoir accepté de m'accueillir au sein de l'unité durant ces années de thèse.

J'aimerais remercier mon directeur de thèse, le Docteur-HDR Jimmy SÉLAMBAROM qui a permis à cette thèse de voir le jour. Je le remercie particulièrement pour son accompagnement tout au long de cette thèse. Merci pour sa disponibilité, pour tous ses conseils et pour tous nos échanges.

Je tiens aussi à remercier ma co-encadrante, le Docteur Emmanuelle GIRARD-VALENCIENNES. Je la remercie particulièrement de m'avoir accompagnée tout au long de ce travail. Merci pour sa rigueur, sa disponibilité, sa patience, son oreille attentive et tous ses conseils.

J'adresse mes remerciements à tous ceux, avec qui j'ai pu échanger ces dernières années et qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à mon travail. Plus particulièrement merci à Patricia CLERC du laboratoire Chembipro. Merci pour le partage de connaissances, l'aide et les conseils qui ont été essentiels à la réalisation des travaux de chimie.

Je remercie la Région Réunion pour m'avoir accordée une allocation régionale de recherche.

Merci à la team EPI. Merci à vous les filles, Axelle, Chailas, Laetitia et Mélissa, ma famille du laboratoire, sans vous cette aventure n'aurait vraiment pas été la même. Merci pour nos échanges et vos conseils. Merci pour tous ces moments exceptionnels partagés et surtout merci d'avoir été là dans les moments les plus difficiles.

Je tiens à remercier mon Amie Merlène. Une nouvelle étape de la vie partagée avec toi, j'ai été ravie d'avoir commencé et terminé ces années de thèse avec toi. Merci pour ton écoute, tes conseils, tes encouragements et surtout ton grain de folie. Je profite ici pour adresser une pensée particulière à notre Ami. Lui, qui n'est plus, mais qui je sais n'est jamais trop loin, ce travail est aussi un peu le sien.

Je tiens à remercier Aurélie, ma meilleure amie, ma sœur. Merci de toujours répondre présent, de toujours trouver les mots justes pour me réconforter et me motiver, merci pour ton investissement et d'avoir toujours essayé de comprendre mon travail.

Je souhaiterais clore cette partie en remerciant ma famille. Maman, merci d'avoir toujours fait de ton mieux, sans toi je n'aurais pu arriver jusque-là et sans toi je n'aurais pu atteindre mes objectifs. Merci à ma petite famille, merci à vous deux d'être aujourd'hui à la fois mon moteur et mon soutien. Merci à toi, ma moitié d'être toujours là, de t'intéresser à mon travail, merci pour ton oreille attentive et tes encouragements. Merci de toujours me porter. Enfin, merci à vous, qui n'êtes plus mais qui continuez à être à travers moi. Votre résilience est mon plus bel héritage et ma plus belle motivation.

# Table des matières

<b>Table des matières</b> .....	<b>1</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>5</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>7</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>9</b>
<b>Introduction générale</b> .....	<b>10</b>
<b>Objectifs de la thèse</b> .....	<b>12</b>
<b>Chapitre 1. Les alphavirus arthritogéniques</b> .....	<b>14</b>
<b>I. Généralités</b> .....	<b>14</b>
<b>II. Caractéristiques biologiques des alphavirus</b> .....	<b>19</b>
1. Morphologie et génome .....	19
(a) Les protéines non structurales .....	20
(b) Les protéines structurales .....	20
2. Le cycle viral .....	20
3. L'infection.....	21
(a) Phase aiguë .....	22
(b) Phase chronique .....	23
4. La réponse immunitaire innée .....	23
(a) La réponse antivirale.....	24
(b) Réponse inflammatoire .....	26
(c) La réponse immunitaire adaptative.....	27
<b>III. Échappement immunitaire</b> .....	<b>30</b>
<b>IV. Traitements</b> .....	<b>31</b>
1. Les traitements symptomatiques .....	31

2.	La recherche et le développement .....	32
(a)	Les molécules à activité antivirale directe .....	32
(b)	Les anticorps.....	36
(c)	Les immunomodulateurs .....	36
(d)	Molécules à action physiocellulaire.....	38
(e)	Les vaccins .....	38
<b>Chapitre 2. La piste thérapeutique des alcaloïdes .....</b>		<b>40</b>
<b>I.</b>	<b>Les alcaloïdes naturels .....</b>	<b>40</b>
1.	Définitions .....	40
2.	Sources naturelles .....	41
3.	Propriétés physicochimiques .....	41
4.	Fonctions biologiques .....	42
5.	Activités biologiques .....	42
<b>II.</b>	<b>Les alcaloïdes comme sources potentielles d'anti-alphaviraux .....</b>	<b>44</b>
1.	Analyse de données pour des alcaloïdes représentatifs .....	44
2.	Activités biologiques en contexte viral.....	45
3.	Activités biologiques hors contexte viral.....	49
4.	Relation structure-activité .....	53
<b>Chapitre 3. Développement d'un modèle d'évaluation <i>in vitro</i> avec la chloroquine .....</b>		<b>54</b>
<b>I.</b>	<b>Approche expérimentale.....</b>	<b>54</b>
<b>II.</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>56</b>
1.	Caractérisation phénotypique des cellules HS633T .....	56
2.	Cytotoxicité .....	58
3.	Cinétique d'infection .....	59
4.	Réponse immunitaire .....	60

5. Effets de la chloroquine .....	62
<b>III. Discussion .....</b>	<b>66</b>
<b>Chapitre 4. Évaluation <i>in vitro</i> du potentiel anti-alphaviral d'alcaloïdes-</b>	
<b>types (berbérine, matrine et tabersonine) .....</b>	<b>70</b>
<b>I. Approche expérimentale.....</b>	<b>70</b>
<b>II. Résultats .....</b>	<b>71</b>
1. Cytotoxicité .....	71
2. Réduction de l'infection.....	73
3. Effets sur la réponse antivirale de la cellule-hôte.....	74
4. Effets sur les médiateurs de l'inflammation.....	77
5. Effets sur les voies de l'inflammation .....	78
<b>III. Discussion .....</b>	<b>80</b>
<b>Chapitre 5. Activités anti-alphavirales d'extraits de plantes de La Réunion</b>	
<b>85</b>	
<b>I. La biodiversité végétale régionale .....</b>	<b>85</b>
1. Les caractéristiques remarquables du milieu.....	85
2. Les usages thérapeutiques traditionnels des plantes .....	86
3. Valorisation chimique et biologique des espèces végétales .....	86
<b>II. Les espèces végétales étudiées.....</b>	<b>91</b>
1. Sélection des espèces locales .....	91
(a) Données relatives aux espèces sélectionnées .....	92
<b>III. Traitements du matériel végétal.....</b>	<b>99</b>
1. Collecte et échantillonnage du matériel végétal .....	99
(a) Extraits bruts éthanoliques .....	100
(b) Extraits « alcaloïdes totaux ».....	100
<b>IV. Evaluation biologique des extraits végétaux.....</b>	<b>101</b>

1. Activité antioxydante .....	102
2. Cytotoxicité .....	103
3. Effets des extraits sur l'expression des gènes viraux.....	105
4. Effets des extraits sur la réponse antivirale.....	106
5. Potentiel anti-inflammatoire des extraits étudiés.....	109
<b>V. Caractérisation chimique préliminaire des extraits et fractions .....</b>	<b>113</b>
• Analyses HPLC-UV-MS pour <i>Argemone mexicana</i> .....	114
• Analyses HPLC-UV-MS pour <i>Sophora denudata</i> .....	115
• Analyses HPLC-UV-MS pour <i>Tabernaemontana mauritiana</i> .....	117
<b>VI. Discussion .....</b>	<b>118</b>
<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>123</b>
<b>Matériel et Méthodes .....</b>	<b>126</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>134</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>161</b>
Annexe 1 Activités biologiques des alcaloïdes.....	162
Annexe 2 Analyses HPLC-UV-MS de l'extrait AT de l'espèce <i>Tabernaemontana mauritiana</i> .....	202

# Abréviations

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien

BFV : *Barmah Forest Virus* (Virus de la forêt de Barmah)

CHIKV : *Chikungunya Virus* (Virus du Chikungunya)

CHL : Chloroquine

CLR : *C-type lectin receptor* (Récepteur lectine de type C)

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CMVH : Cytomégalovirus humain

COX : Cyclooxygénase

DENV : *Dengue Virus* (Virus de la dengue)

DMARD : *Disease Modifying Anti Rheumatic Drug* (antirhumatismal modificateur de la maladie)

EV : Entérovirus

HSV-1/2 : *Human Herpes Virus 1/2* (Virus de l'Herpès humain 1/2)

IFN : Interféron

IFNAR : *IFN alpha receptor* (Récepteur de l'interféron alpha)

IKK $\epsilon$  : *I $\kappa$ B kinase  $\epsilon$*

IL : Interleukine

IRF : *Interferon regulatory factor* (Facteur de régulation de l'interféron)

ISG : *Interferon stimulated gene* (Gène stimulé par l'interféron)

JAK-STAT : *Janus kinase-signal transducers and activators of transcription*

JNK : *Jun N-terminal kinase*

MAPK : *Mitogen-activated protein kinases*

MAYV : *Mayaro virus* (Virus Mayaro)

MDA5 : *Melanoma differentiation associated antigen 5*

MOI : *Multiplicity of infection* (ou le rapport entre le nombre de virus et le nombre de cellules)

MXRA8 : *Matrix Remodeling Associated 8*

MyD88 : *Myeloid differentiation primary response 88*

NF- $\kappa$ B : *Nuclear factor kappa B*

NLRP3 : *NLR Family Pyrin Domain Containing 3*

nsP : *non structural protein* (Protéine non structurale)

ONNV : *O'nyong-nyong virus* (Virus O'nyong-nyong)

ORAC : *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (Capacité d'absorption des radicaux libres de l'oxygène)

PFU : *Plaque Forming Unit* (Plaque de lyse)

PRR : *Pattern recognition receptor* (Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires)

RIG-I : *Retinoic acid-inducible gene I*

RLR : *Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptor*

RRV : *Ross River virus* (Virus Ross River)

SARS-CoV-2 : *Severe-Acute-Respiratory-Syndrome-related Coronavirus 2* (Syndrome respiratoire aigu sévère lié au virus du Coronavirus-2)

SINV : *Sindbis Virus* (Virus Sindbis)

TLR : *Toll-like receptor* (Récepteur de type « *Toll-like* »)

VEB : Virus Epstein Barr

VHB : Virus de l'hépatite B

VHC : Virus de l'hépatite C

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VRS : Virus respiratoire syncytial

YFV : *Yellow Fever Virus* (Virus de la fièvre jaune)

ZIKV : *Zika Virus* (Virus Zika)

# Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Classification de Baltimore (1971) <i>d'après</i> [2].....	14
<b>Figure 2.</b> Arbre phylogénétique des alphavirus <i>d'après</i> [7].....	16
<b>Figure 3.</b> Arbre phylogénétique du complexe Semliki Forest <i>d'après</i> [9].....	17
<b>Figure 4.</b> Distribution spatio-temporelle des épidémies causées par les alphavirus arthritogéniques <i>d'après</i> [10].....	17
<b>Figure 5.</b> Structure des alphavirus <i>adapté de</i> [21].....	19
<b>Figure 6.</b> Structure génomique des alphavirus.....	19
<b>Figure 7.</b> Cycle de vie des alphavirus.....	21
<b>Figure 8.</b> Dissémination d'un alphavirus chez l'Homme (exemple du CHIKV) <i>adapté de</i> [30]. .....	22
<b>Figure 9.</b> Production des anticorps après infection au CHIKV <i>adapté de</i> [82]. .....	28
<b>Figure 10.</b> Résumé de la réponse immunitaire anti-alphavirale.....	30
<b>Figure 11.</b> Principes actifs appliqués en traitement symptomatique. ....	31
<b>Figure 12.</b> Principes actifs à activité antivirale directe.....	33
<b>Figure 13.</b> Molécules à activité immunomodulatrice. ....	37
<b>Figure 14.</b> Alcaloïdes d'intérêt pharmaceutique. ....	43
<b>Figure 15.</b> Alcaloïdes naturels représentatifs de trois classes structurales d'intérêt <i>adapté de</i> [193].....	45
<b>Figure 16.</b> Mécanismes d'action cellulaire des alcaloïdes représentatifs <i>d'après</i> [193].....	52
<b>Figure 17.</b> Susceptibilité comparée des cellules sMSC et HS633T à l'infection par ONNV. .56	
<b>Figure 18.</b> Caractérisation phénotypique des cellules HSF et HS633T.....	57
<b>Figure 19.</b> Viabilité des cellules HS633T infectées et/ou exposées aux traitements. ....	58
<b>Figure 20.</b> Infection des cellules HS633T par le virus O'nyong-nyong.....	59
<b>Figure 21.</b> Niveaux d'expression des composants de la réponse immunitaire. ....	61
<b>Figure 22.</b> Inhibition virale par la chloroquine dans les cellules HS633T.....	62
<b>Figure 23.</b> Immunofluorescence du marqueur LC3 dans les cellules HS633T.....	63
<b>Figure 24.</b> Effets antiviral et immunomodulateur de la chloroquine.....	66
<b>Figure 25.</b> Effet de la chloroquine sur les réponses immunitaires des cellules HS633T contre l'infection par le virus O'nyong-nyong. ....	69
<b>Figure 26.</b> Types structuraux des classes d'alcaloïdes sélectionnées et alcaloïdes-types. ....	70

<b>Figure 27.</b> Viabilité des cellules HS633T après infection par ONNV seul ou en co- traitement avec les alcaloïdes. ....	72
<b>Figure 28.</b> Réduction de l'infection par les alcaloïdes. ....	73
<b>Figure 29.</b> Effets des alcaloïdes sur les composants immunitaires antiviraux. ....	75
<b>Figure 30.</b> Effets des alcaloïdes sur les facteurs cellulaires de l'autophagie. ....	76
<b>Figure 31.</b> Effets des alcaloïdes sur les médiateurs de l'inflammation. ....	77
<b>Figure 32.</b> Effets des alcaloïdes sur les voies de l'inflammation. ....	79
<b>Figure 33.</b> Effets des alcaloïdes étudiés sur la réponse immunitaire (antivirale en bleu et inflammatoire en rose) d'après [292]. ....	84
<b>Figure 34.</b> Photos descriptives de l'espèce <i>Argemone mexicana</i> Linn d'après [364]. ....	93
<b>Figure 35.</b> Photos descriptives de l'espèce <i>Sophora denudata</i> d'après [364]. ....	95
<b>Figure 36.</b> Photos descriptives de l'espèce <i>Tabernaemontana mauritiana</i> [364]. ....	98
<b>Figure 37.</b> Viabilité des cellules HS633T après infection par ONNV ou traitement par les extraits de <i>A. mexicana</i> , <i>S. denudata</i> et <i>T. mauritiana</i> . ....	104
<b>Figure 38.</b> Effets des extraits de <i>A. mexicana</i> , <i>S. denudata</i> et <i>T. mauritiana</i> sur l'expression des gènes viraux. ....	105
<b>Figure 39.</b> Effets des extraits de <i>A. mexicana</i> , <i>S. denudata</i> et <i>T. mauritiana</i> sur les composants de la réponse antivirale. ....	107
<b>Figure 40.</b> Effets des extraits de <i>A. mexicana</i> , <i>S. denudata</i> et <i>T. mauritiana</i> sur l'expression les composants de l'autophagie PI3K et AMPK. ....	109
<b>Figure 41.</b> Effet des extraits de <i>A. mexicana</i> , <i>S. denudata</i> et <i>T. mauritiana</i> sur les médiateurs de l'inflammation. ....	110
<b>Figure 42.</b> Effet des extraits de <i>A. mexicana</i> , <i>S. denudata</i> et <i>T. mauritiana</i> sur les composants des voies de l'inflammation. ....	112
<b>Figure 43.</b> Comparaison de données UHPLC-UV-MS pour la berbérine et l'extrait « alcaloïdes totaux » de <i>Argemone mexicana</i> ( <i>A. mexicana</i> AT). ....	115
<b>Figure 44.</b> Comparaison de données UHPLC-UV-MS pour la matrine et l'extrait « alcaloïdes totaux » de <i>Sophora denudata</i> ( <i>S. denudata</i> AT). ....	116
<b>Figure 45.</b> Comparaison de données UHPLC-UV-MS pour la tabersonine et l'extrait « alcaloïdes totaux » de l'espèce <i>Tabernaemontana mauritiana</i> ( <i>T. mauritiana</i> AT). ....	118
<b>Figure 46.</b> Diagramme de l'extraction « alcaloïdes totaux ». ....	132

# Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Les principaux alphavirus pathogènes pour l'Homme.....	15
<b>Tableau 2.</b> Effets antiviraux et immunomodulateurs en contexte viral <i>d'après</i> [193].....	46
<b>Tableau 3.</b> Effets immunomodulateurs des alcaloïdes dans d'autres modèles d'après [193] .	49
<b>Tableau 4.</b> Principales activités biologiques décrites pour <i>Argemone mexicana</i> . ....	94
<b>Tableau 5.</b> Principales activités biologiques décrites pour des espèces du genre <i>Sophora</i> .....	96
<b>Tableau 6.</b> Activités biologiques décrites pour des espèces du genre <i>Tabernaemontana</i> .....	99
<b>Tableau 7.</b> Bilan des extraits bruts éthanoliques.....	100
<b>Tableau 8.</b> Bilan de rendement massique des extraits « alcaloïdes totaux » (AT).....	101
<b>Tableau 9.</b> Potentiel anti-oxydant des extraits réalisés.....	103
<b>Tableau 10.</b> Références des molécules standard utilisées en solution pour le traitement des cellules. ....	126
<b>Tableau 11.</b> Anticorps utilisés pour les immunofluorescences.....	127
<b>Tableau 12.</b> Listes des amorces utilisées. ....	128

# Introduction générale

Les maladies infectieuses représentent un enjeu mondial de santé publique depuis l'émergence d'agents pathogènes à fort impact économique et humain, tels que le HSV-1 responsable d'infection courante, avec presque la moitié de la population mondiale concernée, le VIH responsable du SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise), ou encore le parasite *Plasmodium falciparum* responsable du paludisme. Les alphavirus constituent également un enjeu planétaire de santé publique depuis l'épidémie de 2005-2006 du CHIKV qui a débuté dans l'océan Indien et qui s'est étendue au reste du monde et ils caractérisent des risques (ré)émergents avec d'autres pathogènes comme le virus Ebola ou encore les coronavirus. CHIKV et SINV sont les premiers alphavirus arthritogéniques pathogènes pour l'Homme qui ont été isolés pour la première fois en 1952, puis le MAYV en 1954, ONNV et RRV en 1959 et finalement le BFV en 1974.

Les alphavirus appartiennent au groupe des arbovirus (*arthropod-borne viruses*) qui se caractérisent par une transmission vectorielle à l'Homme, principalement par les moustiques, et constituent une nouvelle problématique de l'infectiologie tropicale. Comme pour toutes les arboviroses et en l'absence de vaccins ou traitements spécifiques, les mesures de santé publique s'attachent alors à la prévention primaire pour limiter la transmission de la maladie par des mesures communautaires ou individuelles, à la prévention secondaire visant à contrôler la progression des symptômes, et à la prévention tertiaire pour éviter les complications.

Les progrès scientifiques ont permis d'établir la physiopathologie de l'infection par les alphavirus, et d'identifier des caractéristiques communes ou spécifiques. Ainsi, il a été établi qu'une infection par un alphavirus se caractérise par un tropisme tissulaire et cellulaire, et peut évoluer vers une phase chronique à cause de la persistance localisée du virus. La réponse immunitaire développée contre l'infection par un alphavirus continue d'être étudiée, mais a déjà révélé sa complexité, ses avantages et ses limites. En particulier, les alphavirus sont capables, comme d'autres virus, de développer des stratégies d'évasion à la réponse immunitaire. Pour le groupe des alphavirus arthritogéniques traité dans cette étude, l'infection se singularise par des atteintes articulaires aiguës ou chroniques, modérées ou sévères.

En l'absence de vaccins ou d'antiviraux spécifiques, la prise en charge médicale d'une infection par les alphavirus reste limitée à des médicaments indiqués en traitement symptomatique. La

recherche de solutions vaccinales ou thérapeutiques est active, mais se heurte au temps long de leur découverte et de leur développement, mais aussi à la capacité remarquable et imprévisible d'évolution des agents pathogènes. Les mutations rapides de ces derniers peuvent ainsi compromettre l'efficacité d'une molécule antivirale en développement, et appellent donc à considérer des sources moléculaires facilement adaptables ou renouvelables pour constituer un arsenal d'antiviraux rapidement mobilisables.

La biodiversité, et en particulier celle qui caractérise le règne végétal, a toujours constitué une source d'intérêt en santé humaine, depuis les usages ancestraux de plantes médicinales, et dans les temps modernes, avec l'émergence et le développement de la recherche pharmaceutique illustré par des découvertes majeures (aspirine, quinine, camptothécine, taxol et taxotère...). La phytochimie a révélé l'existence et les propriétés d'une grande diversité de métabolites secondaires, généralement répartis en trois grandes classes chimiques, particulièrement étudiées pour des applications thérapeutiques (terpènes, polyphénols, alcaloïdes). Les travaux menés dans ce domaine représentent un axe majeur de recherche, notamment dans le cas d'une biodiversité végétale encore insuffisamment caractérisée.

Dans le même temps, les apports de la physiologie végétale ont permis de caractériser ces métabolites secondaires comme pouvant exercer un rôle physiologique pour la croissance et le développement de la plante, mais surtout un rôle écologique pour son adaptation à l'environnement ou sa défense contre des bioagresseurs. Les fonctions biologiques intrinsèques des métabolites secondaires pour l'organisme végétal font que ceux-ci représentent une ressource de plus en plus importante pour des applications en santé humaine.

La Réunion est un des points chauds (*hotspots*) identifiés dans la biodiversité mondiale. Sa flore est riche d'une diversité en espèces endémiques et indigènes, avec une politique de préservation et de restauration résolument affirmée (Parc National de La Réunion, Muséum d'Histoire Naturelle, Conservatoire Botanique National de Mascarin, Agence Régionale de Biodiversité), après l'identification des espèces engagée par les travaux pionniers du botaniste et écologiste réunionnais Thérésien Cadet (1937-1987). La recherche universitaire, structurée localement avec le Centre Universitaire de La Réunion créé en 1970, devenu Université de La Réunion en 1982, a particulièrement renforcé la caractérisation biologique et chimique des espèces végétales pour des applications potentielles en santé humaine.

Les épidémies régionales du CHIKV de 2005-2006 ont promu la recherche de molécules bioactives issues de sources végétales, en particulier au moyen d'un premier programme

d'envergure (PHYTOCHIK, 2010) associant le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments (LCSNSA) de l'Université de La Réunion à un consortium national. Une structuration scientifique plus complète a été ensuite engagée, dans une approche intégrée entre l'écologie vectorielle et les physiopathologies infectieuses, avec la création d'un centre de recherche et de veille sanitaire sur les maladies émergentes (CRVOI, 2007) et des premières unités pluridisciplinaires de recherche en santé, à compter de 2010, période de création de la nouvelle UFR Santé. Concernant les alphavirus, la recherche s'est intéressée aussi bien au processus infectieux (EA GRI intégrée à l'UMR PIMIT), qu'au processus inflammatoire (UR EPI). Ces aspects physiopathologiques ont été associés à la recherche de solutions thérapeutiques, et plus particulièrement au laboratoire EPI, de molécules antivirales et immunomodulatrices de la biodiversité végétale régionale (Projet CPER-FEDER VIROPAM, 2018-2022), avec un développement pharmacochimique particulier sur un polyphénol (brevet en demande, N°FR2300375).

## **Objectifs de la thèse**

Suivant la stratégie thérapeutique basée sur des molécules possédant une double activité antivirale et immunomodulatrice, ces travaux visaient l'évaluation *in vitro* d'alcaloïdes, avec le ONNV comme modèle d'alphavirus arthritogénique, biologiquement et cliniquement proche du CHIKV. ONNV est également adapté à la recherche en laboratoire en niveau 2 de confinement, moins contraignant que le niveau 3 défini pour CHIKV. Avec la grande diversité moléculaire des alcaloïdes, encore peu caractérisée contre les alphavirus, l'approche a été dirigée sur trois classes structurales (isoquinoléines, quinolizidines, indoles) reconnues d'intérêt pharmacologique, à partir de trois structures naturelles (berbérine, matrine, tabersonine) continuellement étudiées pour des nouvelles indications thérapeutiques, y compris contre les pathologies associées aux virus (ré)émergents. Cette approche moléculaire a été ensuite exploitée par une approche chimiotaxonomique pour considérer trois espèces végétales de La Réunion (*Argemone mexicana*, *Sophora denudata*, *Tabernaemontana mauritiana*), susceptibles de contenir des alcaloïdes des trois classes structurales retenues.

La présentation de ces travaux s'articule comme suit :

- une étude bibliographique descriptive sur les alphavirus arthritogéniques, les solutions actuelles de prise en charge médicale de l'infection et de l'inflammation, ainsi que l'avancée de la recherche dans ce domaine (chapitre 1) ;

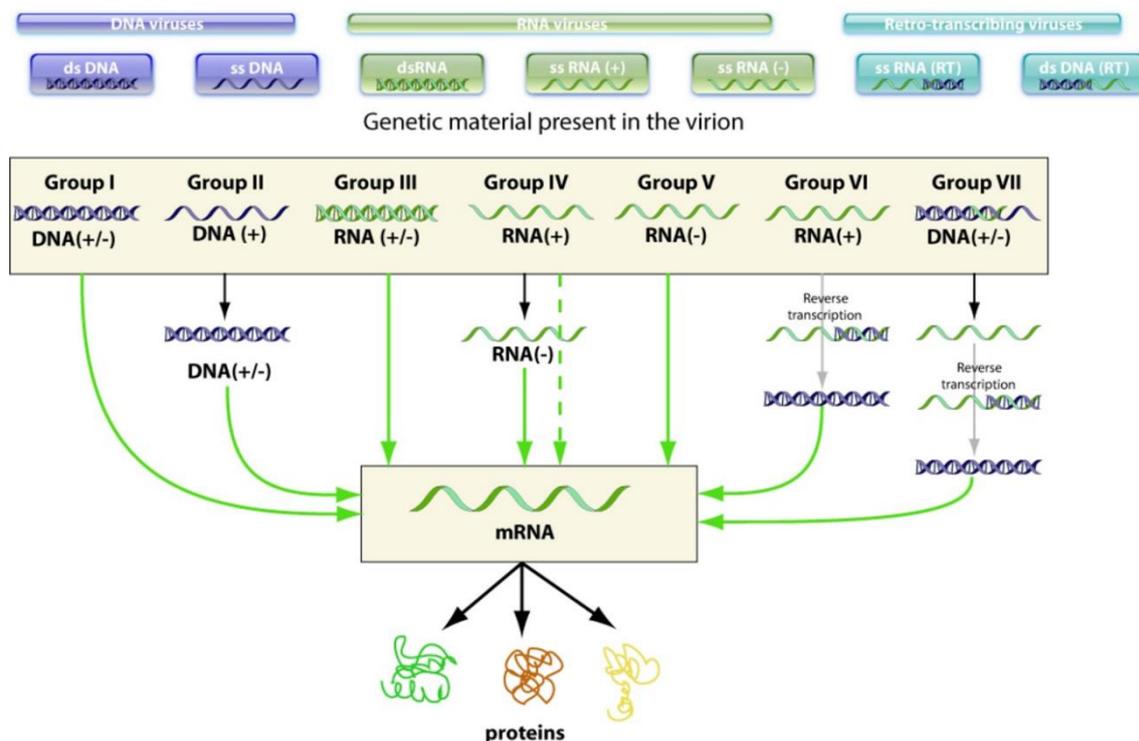
- une analyse bibliographique, à partir de données expérimentales, permettant de soutenir l'intérêt des alcaloïdes en recherche contre les alphavirus arthritogéniques (chapitre 2) ;
- le cadre structuré d'une évaluation *in vitro* qui a été développé avec la chloroquine utilisée comme référence (chapitre 3) ;
- l'évaluation biologique *in vitro* (activités et mécanismes) des alcaloïdes-types (chapitre 4) ;
- la caractérisation chimique et biologique *in vitro* d'extraits obtenus à partir de trois espèces végétales locales (chapitre 5).

# Chapitre 1. Les alphavirus arthritogéniques

Depuis l'épidémie du CHIKV de 2005-2006 dans l'océan Indien et son expansion à travers le monde, une importante activité de recherche dans ce domaine est développée. Cette activité recouvre aussi bien la surveillance des alphavirus à l'échelle planétaire, leurs processus infectieux et physiopathologiques avec les réponses immunitaires associées, ainsi que les solutions thérapeutiques.

## I. Généralités

Selon la classification de Baltimore établie en 1971 [1] à partir des caractéristiques biologiques des virus (génome, type d'acide nucléique, mode d'expression au cours du cycle viral), les alphavirus appartiennent au groupe IV des virus à ARN. Ce sont des virus à ARN simple brin à orientation positive, ainsi la traduction de leur ARN génomique se fait donc par les ribosomes de la cellule-hôte sans intervention des protéines virales, par opposition aux virus à ARN simple brin à orientation négative (**Figure 1**).



**Figure 1.** Classification de Baltimore (1971) d'après [2].

Selon la classification taxonomique internationale de l'ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*), le genre *Alphavirus* représente près de 30 espèces distribuées dans le monde entier et appartient à la famille des *Togaviridae* ~~qui comprend également le genre *Rubivirus* représenté par le virus de la rubéole~~ [3]. Certains alphavirus sont pathogènes pour l'Homme, causant des maladies plus ou moins sévères.

Selon leurs origines géographiques et les pathologies associées, les alphavirus sont dits de l'Ancien (ou Vieux) Monde (*Old World alphaviruses*) ou du Nouveau Monde (*New World alphaviruses*) (**Tableau 1**) [4]. Les espèces du Vieux Monde désignent les virus qui ont été identifiés en Afrique, en Europe, en Asie et en Australie. Ils sont dits arthritogéniques (ou arthritogènes) car ils affectent particulièrement les articulations en causant de l'arthrite (inflammation des articulations) et/ou de l'arthralgie (douleur des articulations). Les alphavirus du Nouveau Monde identifiées sur le continent américain se caractérisent par des atteintes du système nerveux avec des encéphalites (inflammation du cerveau).

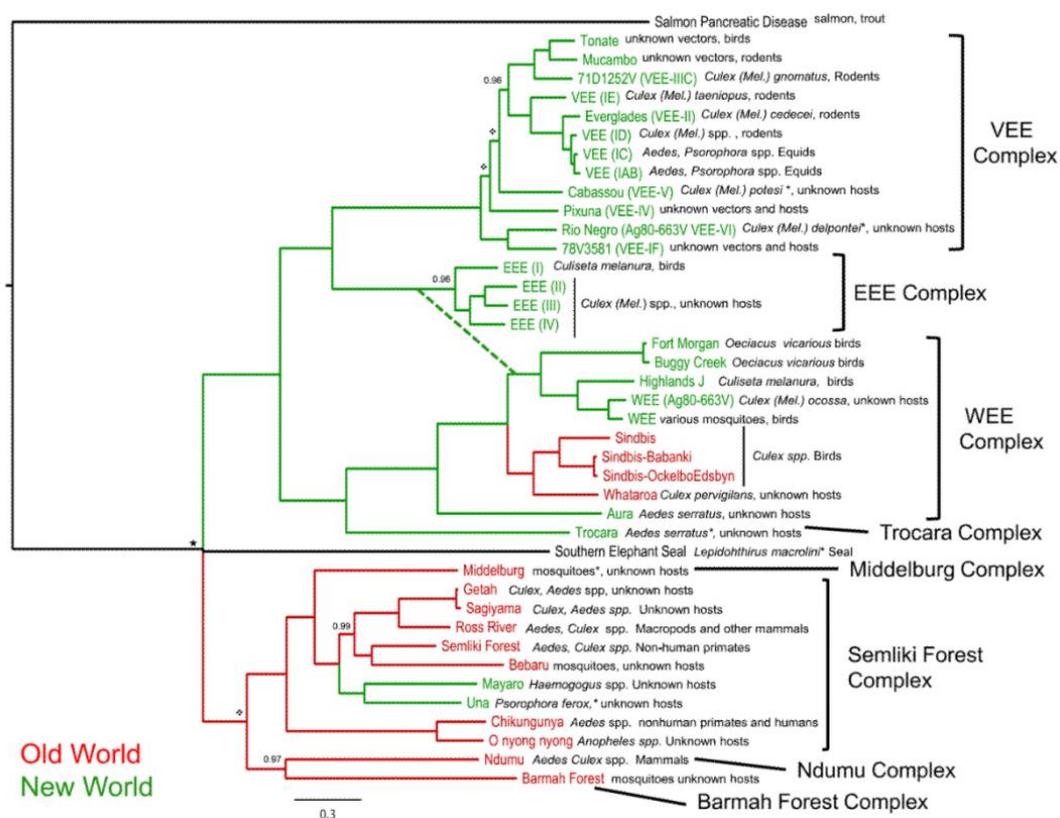
**Tableau 1.** Les principaux alphavirus pathogènes pour l'Homme.

Groupe	Espèce	Origine géographique	Principales manifestations cliniques
Alphavirus arthritogéniques	BFV	Australie	Arthrite et/ou arthralgie
	CHIKV	Afrique	
	MAYV	Amérique du Sud	
	ONNV	Afrique	
	RRV	Australie	
	SINV	Afrique	
Alphavirus encéphalitiques	SFV	Afrique	Encéphalite
	EEEV	Amérique du Nord	
	VEEV	Amérique du Sud	
	WEEV	Amérique du Nord	

Bien que l'origine géographique des alphavirus ne soit pas encore clairement déterminée, plusieurs hypothèses ont été proposées. L'une d'elles suggère que leur introduction dans

l'Ancien et le Nouveau Mondes résulte de leur émergence depuis le Pacifique, à partir d'hôtes vertébrés marins, puis leur transmission à des hôtes vertébrés terrestres et des moustiques vecteurs [5].

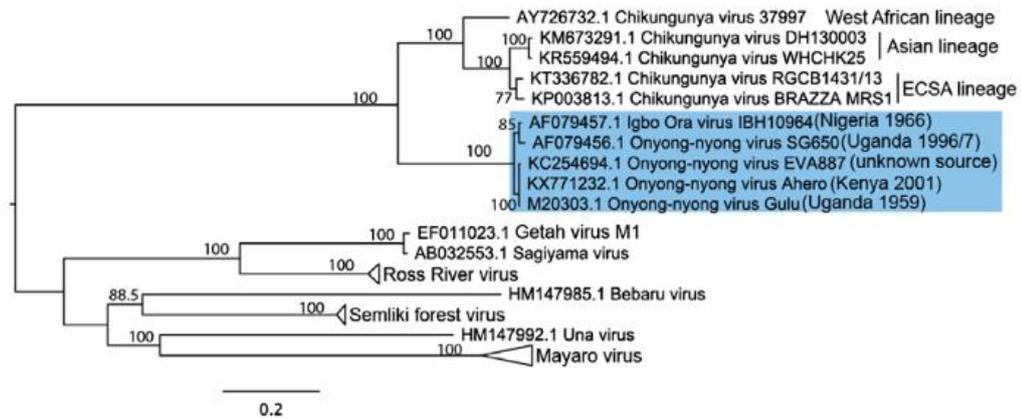
Différentes études ont été menées pour établir une classification plus précise que celle de Baltimore. Une première classification taxonomique des alphavirus remonte à 1988 à partir d'analyses antigéniques fondées sur la réactivité croisée aux anticorps des alphavirus, et sept complexes antigéniques ont été alors mis en évidence [6]. L'analyse antigénique a été ensuite complétée par une analyse génétique. A ce jour, huit complexes phylogénétiques sont décrits [7], comme représenté en **Figure 2**.



**Figure 2.** Arbre phylogénétique des alphavirus d'après [7].

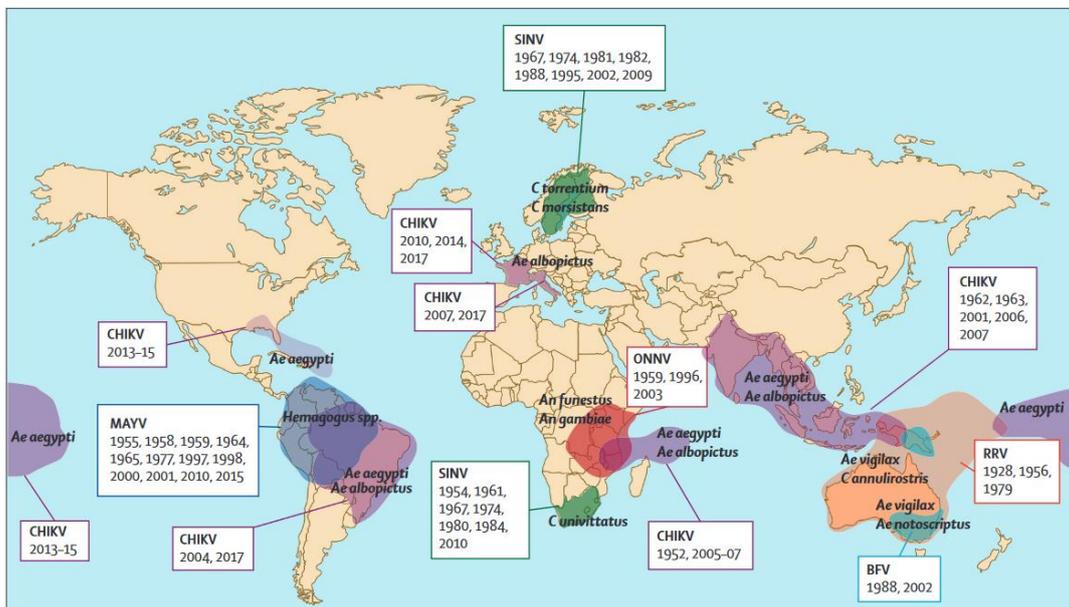
[EEE complex : complexe du virus eastern equine encephalitis ; VEE complex : complexe du virus vénézuélien équien encephalitis ; WEE complex : complexe du virus western equine encephalitis].

Ces avancées majeures dans la caractérisation biologique des virus ont permis de distinguer le CHIKV et ONNV comme deux entités biologiques, tout en ayant une très grande proximité au sein du complexe phylogénétique Semliki Forest [8] (**Figure 3, ci-après**).



**Figure 3.** Arbre phylogénétique du complexe Semliki Forest d’après [9].

Les alphavirus arthritogéniques sont normalement endémiques des régions chaudes, équatoriales et tropicales et leur répartition dépend de la présence de vecteurs et de réservoirs adéquats. Cependant, la mondialisation des échanges et la dynamique des populations vectorielles, accompagnées du réchauffement climatique et de la déforestation, ont facilité l’expansion des alphavirus à travers le monde, comme l’illustrent les vagues épidémiques du CHIKV durant la dernière décennie (**Figure 4**).



**Figure 4.** Distribution spatio-temporelle des épidémies causées par les alphavirus arthritogéniques d’après [10].

[BFV : virus Barmah Forest ; CHIKV : virus du Chikungunya ; MAYV : virus Mayaro ; ONNV : virus O’nyong-nyong ; RRV : virus Ross River ; SINV : virus Sindbis].

CHIKV a été isolé pour la première fois en 1952 en Tanzanie (Afrique), alors que les premières descriptions de l'infection remontent à 1779 à Jakarta (Indonésie) [11]. La plus importante épidémie a débuté en 2004 au Kenya et s'est répandue dans le monde entier (plus de cent pays à travers quatre continents) en affectant plus de dix millions de personnes [12]. Alors que son principal vecteur était jusque-là le moustique *Aedes aegypti* concentré dans les régions tropicales et subtropicales, une mutation de la protéine virale E1 (E1 : A226V) est à l'origine de son expansion mondiale par une nouvelle souche virale adaptée au moustique *Aedes albopictus* plus répandu sur le planète [13].

SINV a été isolé pour la première fois en 1952 en Égypte (Afrique). Ses principaux vecteurs sont les moustiques des espèces *Aedes* et *Culex*. SINV est aujourd'hui l'un des arbovirus les plus répandus dans le monde avec des épidémies récurrentes au Nord de l'Europe, notamment en Finlande et en Suède, en Eurasie, en Afrique et en Océanie [10].

MAYV a été isolé pour la première fois en 1954 en Amérique du Sud. Ses principaux vecteurs sont les moustiques de l'espèce *Heamagogus*. Il a causé des épidémies en Amérique du Sud et en Amérique Centrale [10].

ONNV est endémique de l'Afrique sub-saharienne. Il a été isolé pour la première fois en 1959 en Ouganda (Afrique). Ses principaux vecteurs sont les moustiques de l'espèce *Anopheles* [9]. Plusieurs épidémies ont été recensées en Ouganda, la première sur la période de 1959-1962, la seconde en 1996 [14,15], et la troisième en 2002 [16]. Des cas sporadiques sont régulièrement détectés en Afrique [17–19].

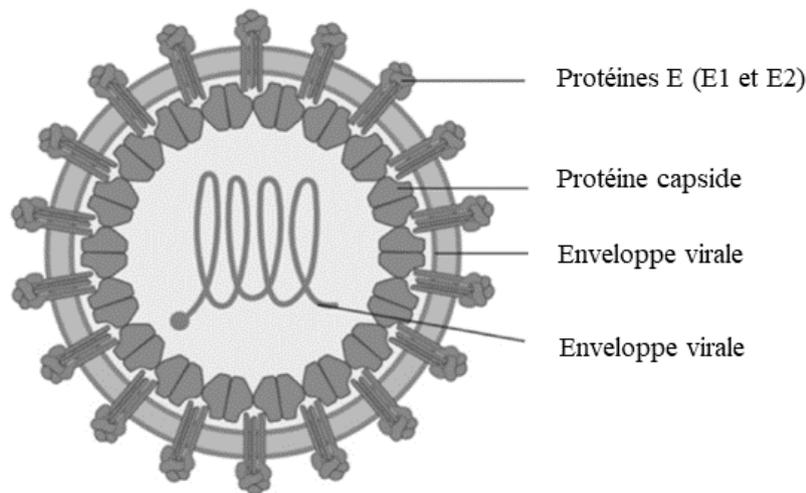
RRV est endémique de l'Australie où il a été isolé pour la première fois en 1959. Ses principaux vecteurs sont les moustiques des genres *Aedes* et *Culex* et ses principaux mammifères hôtes sont les kangourous et les wallabies. Chaque année, des épidémies sont rapportées en Australie et des cas sont aussi identifiés dans les Îles du Pacifique Sud (Papouasie Nouvelle-Guinée, Nouvelle-Calédonie, les îles Fidji, Samoa et Cook) [20].

BFV a été isolé pour la première fois en Australie (Victoria, Forêt de Barmah) en 1974. Ses principaux vecteurs sont les moustiques du genre *Aedes*. Chaque année, il affecte environ un millier de personnes en Australie. Des cas ont aussi été recensés en Papouasie Nouvelle-Guinée [10].

## II. Caractéristiques biologiques des alphavirus

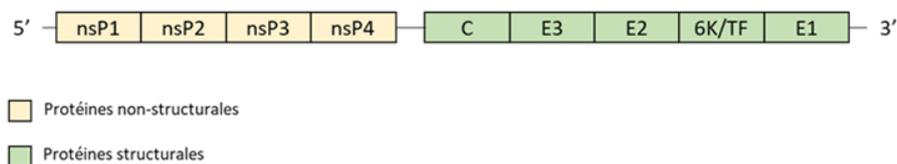
### 1. Morphologie et génome

La caractérisation biologique des alphavirus est bien avancée [4] (**Figure 5**). Ces agents pathogènes sont des virus à ARN simple brin à orientation positive (ARNsb (+)) et mesurant environ 700 Å de diamètre. La particule virale est composée de deux membranes de glycoprotéines, d'une bicouche lipidique dérivée de la cellule-hôte et d'une nucléocapside qui renferme l'ARN viral.



**Figure 5.** Structure des alphavirus *adapté de* [21].

L'étude du génome des alphavirus a débuté il y a presque 50 ans, avec une première avancée majeure en 1984 pour le génome complet de SINV [22]. D'une manière générale, le génome des alphavirus mesure environ 12 kb et code pour 10 protéines virales, dont 4 protéines non structurales (nsP1 à nsP4), et 6 protéines structurales dont les protéines d'enveloppe E1 à E3, la capsidique (C), la protéine 6K et la protéine transférase (TF) [23] (**Figure 6**).



**Figure 6.** Structure génomique des alphavirus.

[C : capsidique ; E : protéine d'enveloppe ; nsP : protéine non structurale ; T : transférase].

### (a) Les protéines non structurales

Les protéines non structurales sont nécessaires à la réplication et à la traduction de l'ARN viral au sein de la cellule-hôte. Elles sont également capables de moduler la réponse antivirale de la cellule-hôte, ce qui peut favoriser l'infection [23].

La protéine nsP1 participe à la traduction des ARNm viraux et protège les ARN viraux néoformés de la dégradation [24]. La protéine nsP2 participe à plusieurs activités essentielles au cours de l'infection virale, comme la réplication virale et la maturation des différentes protéines non structurales. Elle exerce son activité de protéase en clivant la polyprotéine virale initiale en différentes protéines nsP. La protéine nsP2 interfèrerait également avec la machinerie cellulaire en inhibant la réponse antivirale, comme établi *in vitro* durant l'infection au CHIKV, favorisant ainsi l'invasion virale au sein de la cellule-hôte [25]. La protéine nsP2 a été alors décrite comme une cible-clé pour la recherche de traitements antiviraux [26]. Le rôle de la protéine nsP3 est moins décrit, mais elle pourrait réguler la traduction virale [24]. La protéine nsP4 est la protéine la plus conservée chez les alphavirus. Elle assure une activité d'ARN polymérase impliquée dans la réplication et la traduction des ARN viraux.

### (b) Les protéines structurales

Les protéines structurales ont un rôle principal dans l'entrée, le maintien de la structure virale ou la libération des virions [23]. La glycoprotéine E1 contribue au maintien de la structure ainsi qu'à la fusion du virus avec la membrane cellulaire, tandis que la glycoprotéine E2 assure un rôle essentiel dans la reconnaissance et l'attachement du virus à sa cellule-hôte, tout en participant au maintien de la structure. La glycoprotéine E3 intervient dans la fusion des glycoprotéines E1 et E2 avec la membrane cellulaire. La protéine C (capside) s'attache à l'ARN génomique pour former la nucléocapside et participe au bourgeonnement des nouveaux virions. Les protéines 6K et TF sont impliquées dans la maturation des protéines et la structuration des nouveaux virions [27].

## 2. Le cycle viral

Le cycle de vie des alphavirus dans une cellule-hôte reprend les étapes classiques (**Figure 7, ci-après**) de celui des virus à ARN [28]. L'attachement du virus (1) à la cellule-hôte repose sur l'interaction de la protéine E2 avec un ou plusieurs récepteur(s) cellulaire(s) spécifique(s), avant la fusion de la protéine E1 avec l'endosome, pour l'internalisation du virus par endocytose (2), puis la libération de la nucléocapside et de l'ARN viral dans le cytoplasme (3). Ensuite, la

traduction des protéines nsP permet la formation d'une réplicase pour la réplication de l'ARN (-) en ARN (+), composé d'ARN génomique et d'ARN subgénomique (26S) (4). Enfin, la production de nouveaux virions résulte de la synthèse et de la maturation des nouvelles protéines virales. A partir de ces dernières, des ARN génomiques néosynthétisés et de nouveaux virions formés sont alors libérés (5) [26,29].

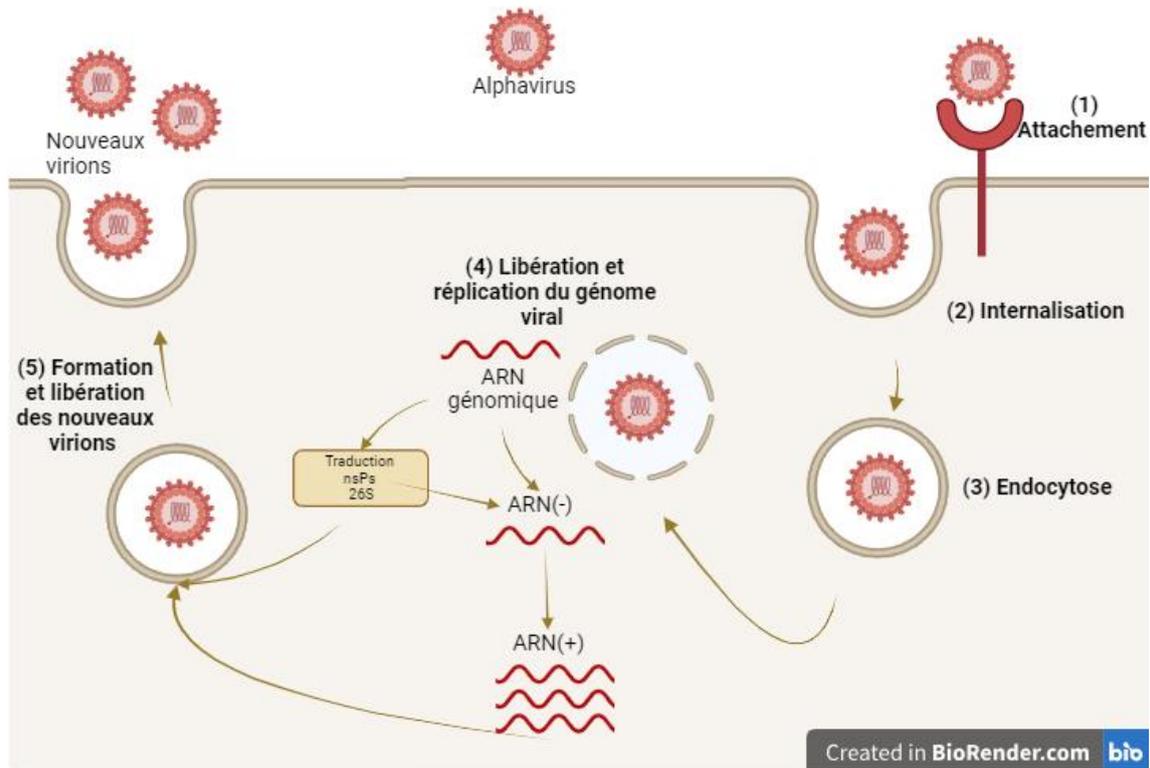
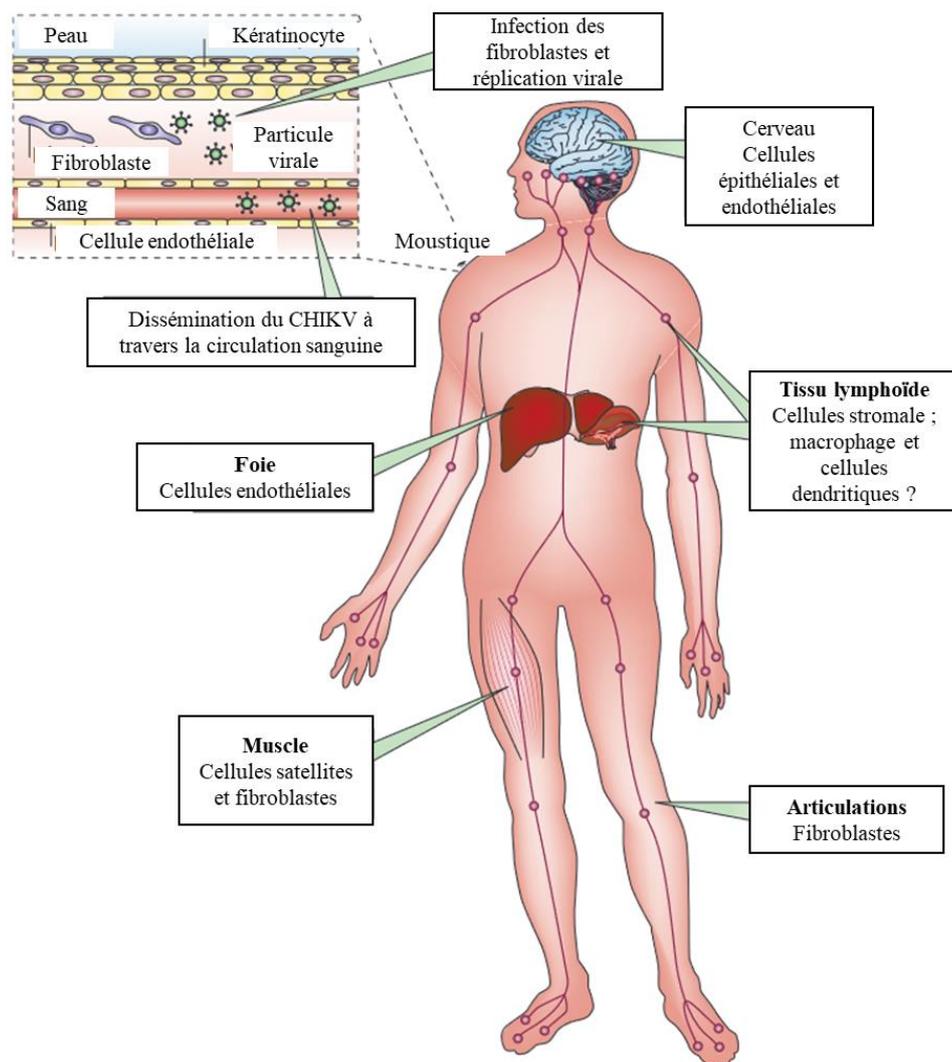


Figure 7. Cycle de vie des alphavirus.

### 3. L'infection

L'infection par un alphavirus commence par l'inoculation du virus à travers la peau par la piqûre ou la morsure d'un arthropode. La peau constitue ainsi la porte d'entrée du virus au sein de l'organisme (**Figure 8, ci-après**). Grâce aux cellules résidentes, le système lymphatique et la circulation sanguine, le virus se dissémine dans l'organisme, de la peau aux organes cibles (nœuds lymphoïdes, foie, rate, os, muscles et articulations) [30]. La physiopathologie de l'infection aux alphavirus arthritogéniques est caractérisée par une phase aiguë pouvant évoluer vers une phase chronique.



**Figure 8.** Dissémination d'un alphavirus chez l'Homme (exemple du CHIKV) *adapté de* [30].

(a) Phase aiguë

En moyenne 3 à 10 jours après infection, les symptômes caractéristiques de la phase aiguë apparaissent avec un tableau clinique associé à de la fièvre, de la polyarthralgie et/ou de la polyarthrite, des éruptions cutanées et des maux de tête. La polyarthralgie et la polyarthrite développées caractérisent les alphavirus arthritogéniques [11].

Le tropisme des alphavirus s'explique par la distribution des récepteurs et des facteurs d'attachement au sein de l'organisme [31]. En effet, ces derniers sont exprimés par différents types cellulaires, comme les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, les fibroblastes synoviaux et dermiques, les cellules endothéliales, les cellules musculaires, le périoste et les kératinocytes. En particulier, les études *in vitro* et *in vivo* chez des souris de l'équipe de Couderc

[32] ont permis de mieux comprendre la dissémination et le tropisme du CHIKV et de faire le lien avec les symptômes spécifiques développés chez l'Homme. En effet, le CHIKV affecte particulièrement les cellules musculaires squelettiques, les cellules des articulations et de la peau, et parmi toutes les cellules-cibles, les fibroblastes apparaissent comme des cellules particulièrement ciblées par les alphavirus. La distribution des fibroblastes au sein de l'organisme, ainsi que la multitude de terminaisons nerveuses nociceptives présentes au sein du tissu conjonctif et des muscles, peuvent expliquer les atteintes articulaires et musculaires caractéristiques des infections par alphavirus arthritogènes. Ce tropisme du CHIKV pour ce type cellulaire, présent dans de nombreux tissus et organes (tissu conjonctif, peau, synovie, périoste...), a été aussi établi *in vitro* par Sourisseau *et al.* en 2007 et Shilte *et al.* en 2010 [33,34].

#### (b) Phase chronique

En général, les symptômes développés s'estompent au bout de quelques jours. Malgré une réponse immunitaire robuste chez certains patients, les atteintes articulaires peuvent persister des mois, voire des années après la phase aiguë, ce qui caractérise alors une infection chronique par les alphavirus arthritogéniques. Cette chronicité pourrait être liée à la persistance du virus au sein des articulations. Sur le plan clinique, l'infection chronique se caractérise, comme la polyarthrite rhumatoïde, par certaines cytokines sécrétées. Alors que l'inflammation liée à la polyarthrite rhumatoïde est d'origine auto-immune (présence de facteurs rhumatoïdes, d'anticorps anti-peptides cycliques citrullinés), aucune preuve ne relie l'inflammation induite par l'infection par un alphavirus à un mécanisme d'auto-immunité avec la présence des facteurs précédemment cités [35–37].

#### **4. La réponse immunitaire innée**

Face à une infection virale, l'organisme déploie diverses stratégies, à travers les réponses immunitaires innée et adaptative, pour contrôler l'invasion virale. La réponse immunitaire innée est la première ligne de défense de l'organisme face à tous types de pathogènes, y compris les alphavirus. Initiée par la détection du pathogène par différents récepteurs, la réponse immunitaire innée implique l'activation de différentes voies de signalisation, aussi bien antivirales qu'inflammatoires. Le but final est la production de médiateurs antiviraux (essentiellement des interférons pour les virus) et inflammatoires [38,39] et l'initiation d'une réponse immunitaire adaptative plus spécifique [40]. La réponse immunitaire a pour rôle de protéger l'organisme, mais contribue au développement des symptômes.

## (a) La réponse antivirale

- Détection

La réponse antivirale est initiée par la détection de motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP pour « *Pathogen Associated Molecular Patterns* ») par différents récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires de la cellule-hôte (PRR pour « *Pathogen recognition receptors* »). Ces récepteurs peuvent être de la famille des *Toll-like receptors* (TLR), comme TLR3, TLR7 et TLR8 spécialisés dans la détection d'ARN endosomal, notamment viral. Le récepteur TLR3 assure un rôle essentiel des réponses immunitaires innée et adaptative comme cela a été établi *in vivo* avec un modèle souris déficiente en TLR3 infectée par CHIKV [41]. Dans ce modèle, la présence de TLR3 a permis de mieux contrôler l'infection et le développement de la pathologie associée. Des données, obtenues *in vivo*, avec des souris déficientes en récepteur TLR7 ou en MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*), décrivent l'association du récepteur TLR7 à la protéine MyD88 comme limitant le développement d'une forme sévère de l'infection au RRV grâce à la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative efficace, par la production d'anticorps neutralisants [42].

Ces récepteurs peuvent aussi être de la famille *des retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) -like receptors (RLR)*, représentée notamment par RIG-I et MDA5 (*Melanoma differentiation-associated protein 5*), qui sont spécialisés dans la détection d'ARN double brin cytosolique, comme les ARN synthétisés lors de la réplication virale. Plusieurs études ont démontré que les récepteurs RIG-I et MDA5 participent à la détection des alphavirus et à la mise en place d'une réponse antivirale efficace [43–45].

Des récepteurs plus spécifiques aux alphavirus sont aussi décrits, comme MXRA8 (*Matrix-remodeling associated 8*), qui est exprimé à la surface des cellules-cibles des alphavirus (CHIKV, RRV, MAYV et ONNV), représentées par les cellules épithéliales, mésenchymateuses et myéloïdes, les fibroblastes, les chondrocytes et les cellules musculaires [46,47].

La famille des *Nod-like receptors* (NLR) est impliquée dans la production de cytokines pro-inflammatoires au cours de l'infection virale, par l'activation des voies NF- $\kappa$ B et MAPK, ou par la formation de l'inflammasome et la production de l'interleukine 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), à travers l'activation de NLRP3 (*NLR family pyrin domain containing 3*) et de la caspase-1 [48]. Les *C-type lectin receptors* (CLR), comme DC-SIGN (*Dendritic cell-specific ICAM3 grabbing*

*non-integrin 1*) et L-SIGN (*Liver/lymph node-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin*), sont impliqués dans la phagocytose, la présentation d'antigène et la migration cellulaire. Klimstra *et al.* ont démontré que l'expression de ces récepteurs, notamment DC-SIGN, est liée à l'infection à SINV dans la lignée cellulaire de monocytes humains THP-1, mais aussi dans une culture primaire de cellules dendritiques humaines [49]. La laminine, la prohibitine-1 (PHB1), TIM-1 (*T-cell immunoglobulin and mucin domain-1*), les glycosaminoglycanes (GAG) participent à l'attachement du virus aux cellules [50].

- Induction d'interférons

L'activation des récepteurs mobilise différentes voies de signalisation et divers facteurs de transcription, pour une réponse antivirale à travers la production d'interférons (IFNs). La voie des IFNs de type 1 ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) est essentielle à la réponse antivirale innée [51]. Les IFNs agissent de manière autocrine (sur la cellule elle-même), en interférant avec la réplication virale au sein de la cellule-hôte, mais aussi de manière paracrine (sur les cellules voisines) en initiant une réponse antivirale dans les cellules voisines, afin de prévenir l'infection [43,51].

L'activation des récepteurs RIG-I et MDA5 entraîne successivement :

- (1) le recrutement de la protéine mitochondriale adaptatrice MAVS (*Mitochondrial antiviral-signaling protein*), aussi connue sous les noms de Cardiff, IPS-1 (*Interferon- $\beta$  promoter simulator 1*) ou VISA (*Virus induced signaling adaptor*) ;
- (2) la phosphorylation des protéines TBK1 (*Tank binding kinase 1*) et IKK $\epsilon$  (*I $\kappa$ B kinase  $\epsilon$* ) ;
- (3) l'activation des facteurs de transcription, plus particulièrement les IRF (*Interferon regulatory factors*) 3 et 7 (IRF3 et IRF7) lors des infections par alphavirus ;
- (4) l'expression des IFNs de type 1 (induction d'IFN- $\alpha$  par IRF7 et d'IFN- $\beta$  par IRF3) [52,53].

Les IFNs de type 1 sont déterminants au cours de l'infection par les alphavirus [54]. En effet, chez des patients infectés par le CHIKV, le niveau d'IFN- $\alpha$  est significativement élevé [55]. Il a été également décrit que des souris déficientes pour la voie des IFNs de type 1 deviennent susceptibles à l'infection au CHIKV [32], à ONNV [56], SINV [57] et à VEEV [58].

Shilte *et al.* ont démontré que les IFNs, dépendant du recrutement de la protéine MAVS, permettent de limiter et de contrôler l'invasion virale lors d'une infection par le CHIKV *in vitro* (notamment dans les fibroblastes) et *in vivo* chez la souris déficiente en récepteurs aux IFNs

$\alpha/\beta$  (IFNAR, « *interferon  $\alpha/\beta$  receptor*) ou en STAT (*signal transduction and activators of transcription*) [33].

Le rôle des facteurs de transcription IRF3 et IRF7 a été aussi démontré pour le contrôle de l'infection au CHIKV sur la souris adulte déficiente en IRF3 et IRF7, notamment par la production d'IFNs de type 1. En effet, l'absence d'IFNs  $\alpha$  et  $\beta$  est associée à une mortalité significative [59]. *In vitro*, l'activation des récepteurs RIG-I et MDA5 entraîne l'expression de MAVS, qui active à son tour les facteurs de transcription IRF3 et IRF7, la voie NF- $\kappa$ B et initie la production d'IFNs de type 1 [60].

En plus de la production des IFNs de type 1, le recrutement de la protéine MAVS mène également à la phosphorylation des protéines IKK de la voie NF- $\kappa$ B, p38 et JNK de la voie MAPK, et à l'activation de différents facteurs de transcription, impliqués dans l'induction de médiateurs de l'inflammation [52].

- Production d'ISGs

Les IFNs de type 1 produits se fixent, par la suite, à des récepteurs spécifiques à la surface des cellules (IFNAR), ce qui entraîne l'activation de la voie de signalisation JAK-STAT, via la phosphorylation des Janus kinases (JAK), telles que les protéines Jak1 et Tyk2 pour les IFNs de type 1. Les protéines STAT sont ensuite activées, notamment STAT1 et STAT2 pour les IFNs de type 1. L'étape finale est la transcription des gènes codant pour des ISGs (*interferon-stimulated genes*). Les ISGs, tels que ISG15 [61,62], ainsi que la protéine kinase R (PKR) [63,64], ou encore la vipérine [65], exercent une activité antivirale directe sur le virus, ou indirecte sur les composants de l'hôte [51,52].

#### (b) Réponse inflammatoire

En plus des effecteurs antiviraux, ceux de l'inflammation permettent aussi de lutter contre l'infection virale. En effet, une réponse inflammatoire est associée à la réponse antivirale. La détection de l'ARN viral par les récepteurs RIG-I et MDA5 et l'activation de MAVS entraînent l'activation de deux voies de l'inflammation : la voie NF- $\kappa$ B, à travers la phosphorylation de IKK et la voie MAPK, par ses composants p38 et JNK [52]. Ces deux voies sont impliquées dans la production de molécules inflammatoires, notamment les interleukines 1 $\beta$  et 10 (IL-1 $\beta$  et IL-10), ou la chimiokine CCL2 (*chemokine ligand 2* ou MCP-1, *monocyte chemoattractant protein-1*).

Après son inoculation à travers la peau, le virus est disséminé dans l'organisme, par l'intermédiaire des cellules résidentes présentatrices d'antigène, telles que les cellules dendritiques. L'inflammation locale, observée au niveau des os, des articulations et des muscles, peut s'expliquer par la mobilisation et l'infiltration des cellules immunitaires (monocytes, macrophages, neutrophiles, lymphocytes ...) au site d'infection, médiée par la sécrétion de divers facteurs inflammatoires, dont des chimiokines (ex. : CCL2, CXCL10, CXCL8) et des cytokines (ex. : IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10) [66,67].

Parmi les cellules de l'immunité, les macrophages sont des cellules phagocytaires qui participent à la clairance virale, mais aussi à la production de médiateurs pro-inflammatoires et contribuent ainsi au développement de la pathologie. Ces cellules peuvent être infectées par les alphavirus [36,68–71]. Chez des souris infectées au RRV, la déplétion de macrophages permet de limiter la production de médiateurs inflammatoires, comme TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  et CCL2 et d'atténuer la sévérité de la pathologie associée [71]. Il en est de même chez des souris infectées par le CHIKV [69,72].

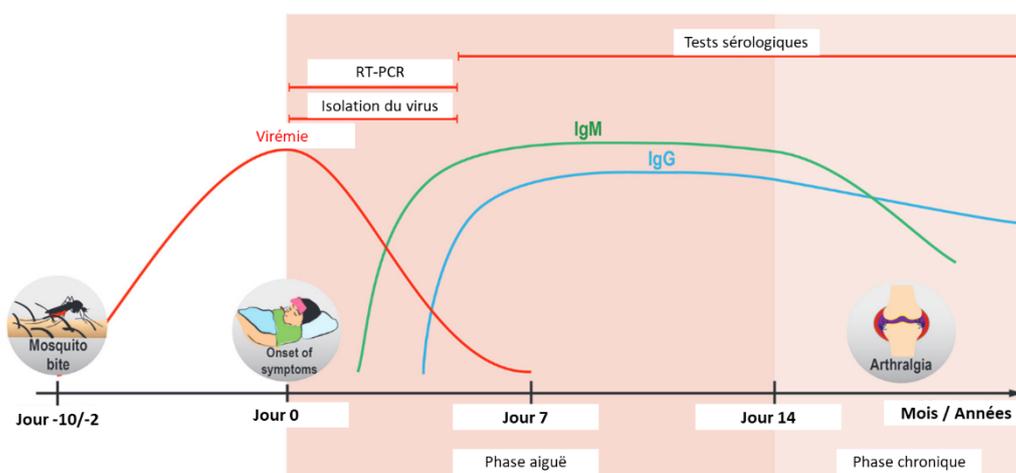
Les médiateurs inflammatoires produits sont impliqués dans différents processus cellulaires. Par exemple, CCL2 est une chimiokine qui participe au recrutement des premières cellules effectrices de l'immunité, les macrophages. TNF- $\alpha$  est un médiateur pro-inflammatoire, principalement produit par les macrophages activés, mais aussi par les lymphocytes, les kératinocytes et les fibroblastes, en réponse à un stress cellulaire, qui se produit notamment lors d'une infection virale. La fixation de TNF- $\alpha$  à son récepteur peut entraîner, soit l'apoptose de la cellule, soit sa survie via la régulation des voies NF- $\kappa$ B et MAPK [73]. La chimiokine CCL5 (ou RANTES pour « *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted* ») participe au recrutement des lymphocytes T et NK (pour « *Natural Killer* ») ou encore des cellules dendritiques [74], tandis que la chimiokine CXCL8 est impliquée dans le recrutement des neutrophiles [75].

### (c) La réponse immunitaire adaptative

La réponse immunitaire innée a largement été étudiée lors des infections par alphavirus. Cependant, l'évolution de l'infection vers une phase chronique révèle le rôle important de la réponse complémentaire retardée et plus spécifique, assurée par l'immunité adaptative. La réponse immunitaire adaptative, au travers des lymphocytes B et T, assure un rôle ambivalent dans l'inflammation induite par une infection par alphavirus. En effet, ces cellules sont capables de participer à la réponse antivirale, mais aussi d'exacerber le processus inflammatoire [76].

Lors de la dissémination du virus dans l'organisme, les lymphocytes B et T sont activés grâce au mécanisme de présentation des antigènes et à la sécrétion des différents médiateurs de l'inflammation. Les lymphocytes B produisent les anticorps. Les lymphocytes T se distinguent en deux groupes, les lymphocytes T CD4+ et les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques. Les cellules T CD4+ sont impliquées dans la production d'anticorps par les lymphocytes B, alors que les cellules T CD8+ entraînent la lyse des cellules infectées par un pathogène [72].

Les lymphocytes B sont impliqués dans la production d'anticorps spécifiques, participant à la clairance virale lors de l'infection. Lors de la phase aiguë de l'infection par CHIKV par exemple, des anticorps neutralisants anti-CHIKV [immunoglobuline M (IgM) et immunoglobuline G (IgG)] sont détectés dans le sérum des patients [77,78] (**Figure 9, ci-après**). Chez des souris infectées, la présence d'anticorps permet de contrôler le développement de la maladie lors d'une infection par le CHIKV [79] ou par le RRV [80]. L'absence de neutralisation du pathogène par les anticorps entraîne la persistance de l'infection [79], voire la mort, lors d'une infection par le MAYV [81]. Les anticorps produits assurent trois principales fonctions : la cytotoxicité cellulaire, l'activation du système du complément (ensemble de protéines de l'immunité innée renforçant la réaction immunitaire) et l'opsonisation (processus favorisant la phagocytose) du virus.



**Figure 9.** Production des anticorps après infection au CHIKV *adapté de* [82].

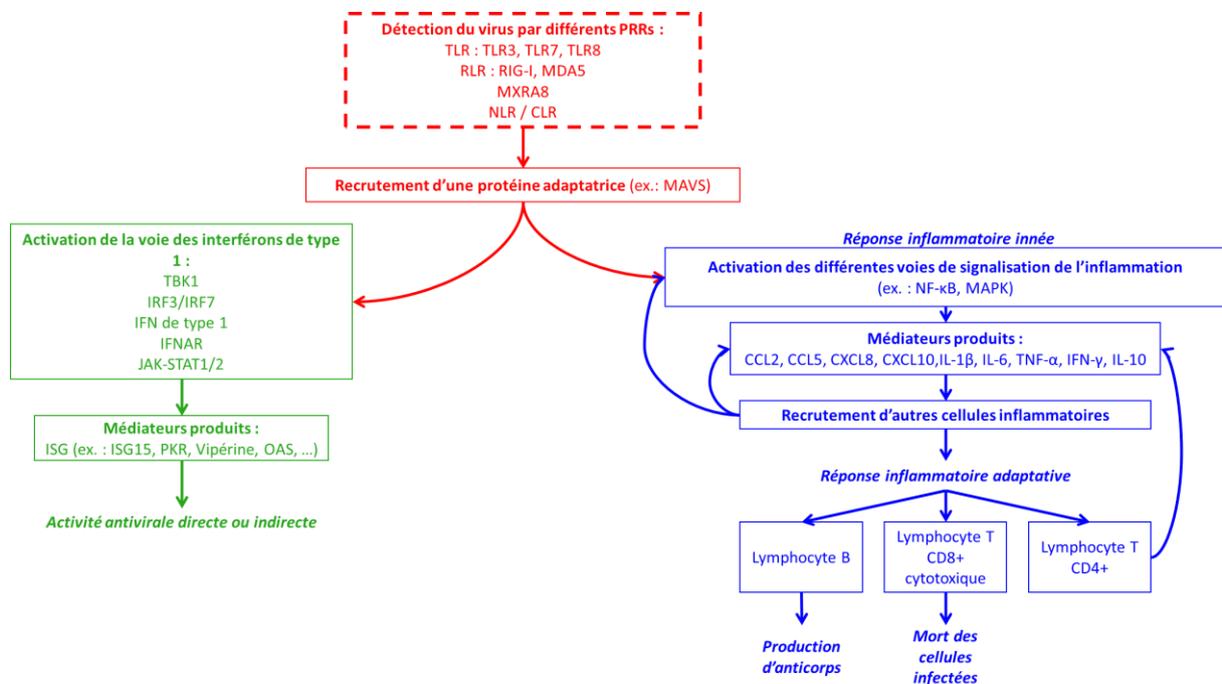
Les lymphocytes T CD4+ sont impliqués dans la production d'anticorps par les lymphocytes B en sécrétant différentes cytokines [72]. Les cellules T CD4+ sont activées par les cellules présentatrices d'antigènes à travers les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) et se différencient, selon l'environnement, en cellules T Helper 1, 2 ou 17 (T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub> ou T<sub>H17</sub>), ou en *regulatory T cells* (T<sub>REG</sub>) [83]. Ces cellules se différencient grâce à

leur profil de production de cytokines [84]. Elles sont capables de moduler les réponses immunitaires innée et adaptative. Les cellules  $T_{H1}$  sont des cellules pro-inflammatoires et produisent des médiateurs pro-inflammatoires, comme l'IFN- $\gamma$ . Ainsi, elles contribuent à la mise en place de la pathologie, comme illustré par Teo *et al.* chez des souris infectées par le CHIKV [85]. Les cellules  $T_{H1}$  assurent une activité antivirale intracellulaire en recrutant les cellules myéloïdes aux sites d'infection. Les cellules  $T_{H2}$  assurent essentiellement une activité antivirale humorale (extracellulaire) en produisant diverses cytokines, comme IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 [72,84]. Il existe un équilibre entre les cellules  $T_{H1}$  et les cellules  $T_{H2}$  pour le contrôle de la maladie, mais les facteurs qui gouvernent cet équilibre restent méconnus. La présence des cellules  $T_{H2}$  aurait un effet bénéfique en contrebalançant les effets néfastes des cellules  $T_{H1}$  [86], ou au contraire néfaste en empêchant la résolution de la maladie [35]. Dans un contexte pro-inflammatoire, la différenciation des lymphocytes  $CD4^+$  en cellules  $T_{H17}$  se fait grâce au facteur TGF- $\beta$  (*Tumor growth factor  $\beta$* ). Les cellules  $T_{H17}$  sont des cellules pro-inflammatoires qui sécrètent les interleukines IL-17, IL-22, IL-23 et le facteur GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*). Ces cellules participent au recrutement des neutrophiles aux sites d'infection et à la mise en place de la pathologie [87,88]. Hors contexte pro-inflammatoire, la différenciation des lymphocytes  $CD4^+$  en cellules  $T_{REG}$  se fait grâce au facteur TGF- $\beta$ . Les cellules  $T_{REG}$  sont des cellules anti-inflammatoires qui sécrètent l'interleukine IL-10 et le facteur TGF- $\beta$  et assurent un rôle protecteur en agissant sur différentes cellules immunitaires [83]. Ce rôle protecteur est lié à une forte concentration de cellules  $T_{REG}$ , est retrouvé lors de l'infection au MAYV et non au CHIKV, ce qui pourrait expliquer la différence des pathologies associées respectivement aux deux infections [89].

Les lymphocytes T  $CD8^+$  exercent une activité cytolytique directe contre les cellules infectées par les virus [72]. Pendant la phase aiguë de l'infection, les lymphocytes T  $CD8^+$  sont activés par la présentation d'antigènes par les molécules du CMH de classe I (CMH-I). Leur quantité augmente dans la circulation et dans les tissus-cibles des alphavirus [90,91]. Chez des souris infectées par le SFV, les cellules T  $CD8^+$  sont impliquées dans le développement de la pathologie. En effet, la présence de cellules T  $CD8^+$  augmente les atteintes neuronales, alors que leur absence diminue l'inflammation et les dommages cérébraux [92,93]. Enfin, contre le CHIKV, le RRV ou encore le MAYV, les cellules T  $CD8^+$  semblent avoir un rôle antiviral limité [90,94].

La réponse immunitaire induite par une infection par les alphavirus est résumée **Fig. 10 ci-après**. Initiée par la détection du virus avec une variété de récepteurs (TLR, RIG, MXRA8,

NLR ou CLR), cette réponse se poursuit par le recrutement de la protéine adaptatrice (MAVS). La réponse antivirale est alors déclenchée principalement par la voie des IFNs de type 1, tandis que la réponse inflammatoire s'engage par différentes voies et médiateurs de l'immunité innée, avant le recrutement de cellules spécialisées de l'immunité adaptative.



**Figure 10.** Résumé de la réponse immunitaire anti-alphavirale.

### III. Échappement immunitaire

Les alphavirus développent diverses stratégies d'échappement pour contourner le système immunitaire et ainsi poursuivre leur invasion cellulaire.

Une de ces stratégies consiste à enfermer les ARN viraux néoformés dans des sphérules au sein de la cellule, empêchant ainsi leur détection par les PRR intracellulaires, comme décrit en 2010 par Frolova *et al.* au cours de l'infection par le SINV [95].

Grâce à leurs protéines [96], nsP2 pour les alphavirus du Vieux Monde [97,98] et la capside [99] pour les alphavirus du Nouveau Monde, les alphavirus peuvent interférer avec la réponse antivirale de la cellule-hôte. En effet, grâce à la protéine nsP2, le CHIKV, le SFV et le SINV sont capables d'inhiber la transcription cellulaire, entraînant la dégradation par ubiquitination d'une sous-unité de l'ARN polymérase II (RNAPII), provoquant des modifications cellulaires majeures et la mort cellulaire [97]. Il a aussi été démontré que la protéine nsP2 des alphavirus

du Vieux Monde, comme le CHIKV et le SINV, est également capable d'inhiber la voie JAK-STAT dépendante des IFN, limitant ainsi la réponse antivirale [25,100,101].

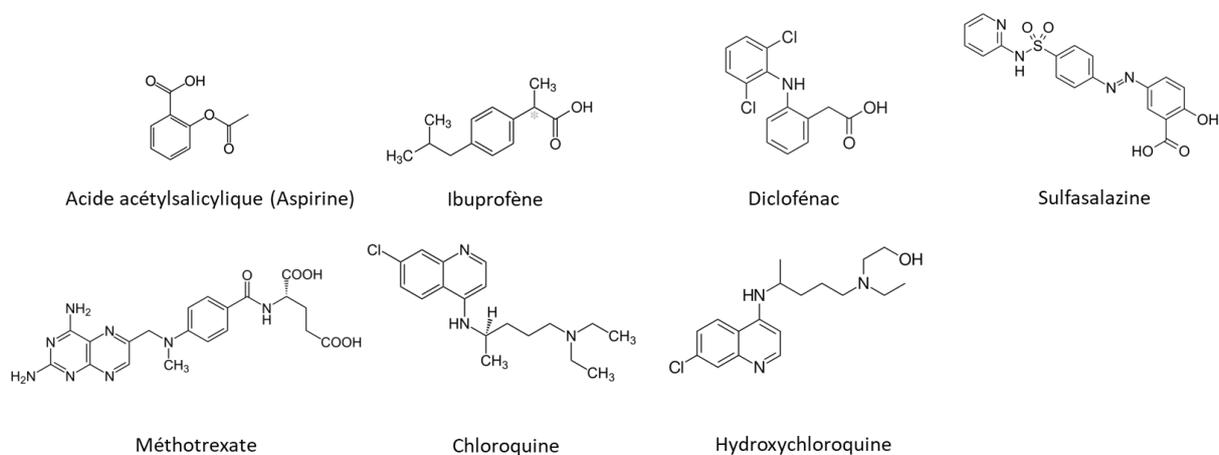
Comme la protéine nsP2 des alphavirus du Vieux Monde, la protéine capsid des alphavirus du Nouveau Monde serait capable d'interagir avec la traduction au sein de la cellule, entraînant des effets cytopathiques importants et *in fine*, la mort cellulaire [99].

## IV. Traitements

A ce jour et malgré les efforts soutenus en recherche depuis la réémergence des alphavirus, il n'existe aucun vaccin autorisé ni traitement spécifique. La prise en charge des patients est dédiée au traitement des symptômes, et la recherche contre l'infection par les alphavirus est orientée vers différentes stratégies thérapeutiques.

### 1. Les traitements symptomatiques

La fièvre et les douleurs sont les symptômes classiques de l'infection aux alphavirus arthritogéniques, avec des manifestations inflammatoires pouvant évoluer vers des formes chroniques. Les médicaments les plus courants sont représentés en **Figure 11**.



**Figure 11.** Principes actifs appliqués en traitement symptomatique.

**Les analgésiques** (ex. : paracétamol) et/ou des anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) tels que l'aspirine, l'ibuprofène et le diclofénac sont utilisés en première intention [10,66]. En particulier, les AINS inhibent de manière non spécifique la cyclooxygénase-1 (COX-1) constitutive et la cyclooxygénase-2 (COX-2), inducible par les facteurs pro-inflammatoires (ex. : lipopolysaccharides, TNF- $\alpha$ , IL-1 ...). Ces deux isoformes sont impliquées dans la production des prostaglandines (PG) pro-inflammatoires et la faible sélectivité des AINS

conduit à des effets secondaires sévères, tels que des lésions gastriques, des atteintes rénales, hépatiques et/ou cardiovasculaires [102,103].

**Les glucocorticostéroïdes ou glucocorticoïdes** sont indiqués lorsque les AINS ne sont pas efficaces. Les glucocorticoïdes agissent sur les récepteurs des glucocorticoïdes (GR) ou les récepteurs des minéralocorticoïdes (MR) et ils régulent alors l'expression de gènes codant pour des médiateurs de l'inflammation, tels que les interleukines IL-1 et IL-10. En ce sens, les glucocorticoïdes sont des immunomodulateurs, mais ils peuvent aussi avoir des activités immunosuppressives, responsables des effets secondaires [104].

**Les médicaments antirhumatismaux** appliqués pour la polyarthrite rhumatoïde, tels que la sulfasalazine, le méthotrexate, la chloroquine ou l'hydroxychloroquine, sont exploités pour les patients atteints d'une infection chronique et réfractaires aux traitements précédents. Ces médicaments entrent dans la catégorie des DMARD (*disease-modifying antirheumatic drugs*), qui sont employés pour limiter le développement des symptômes, mais aussi de la pathologie (gonflement et érosion osseuse au niveau des articulations), en raison de leurs propriétés immunosuppressives, qui peuvent cependant entraîner des effets secondaires [10,66].

## 2. La recherche et le développement

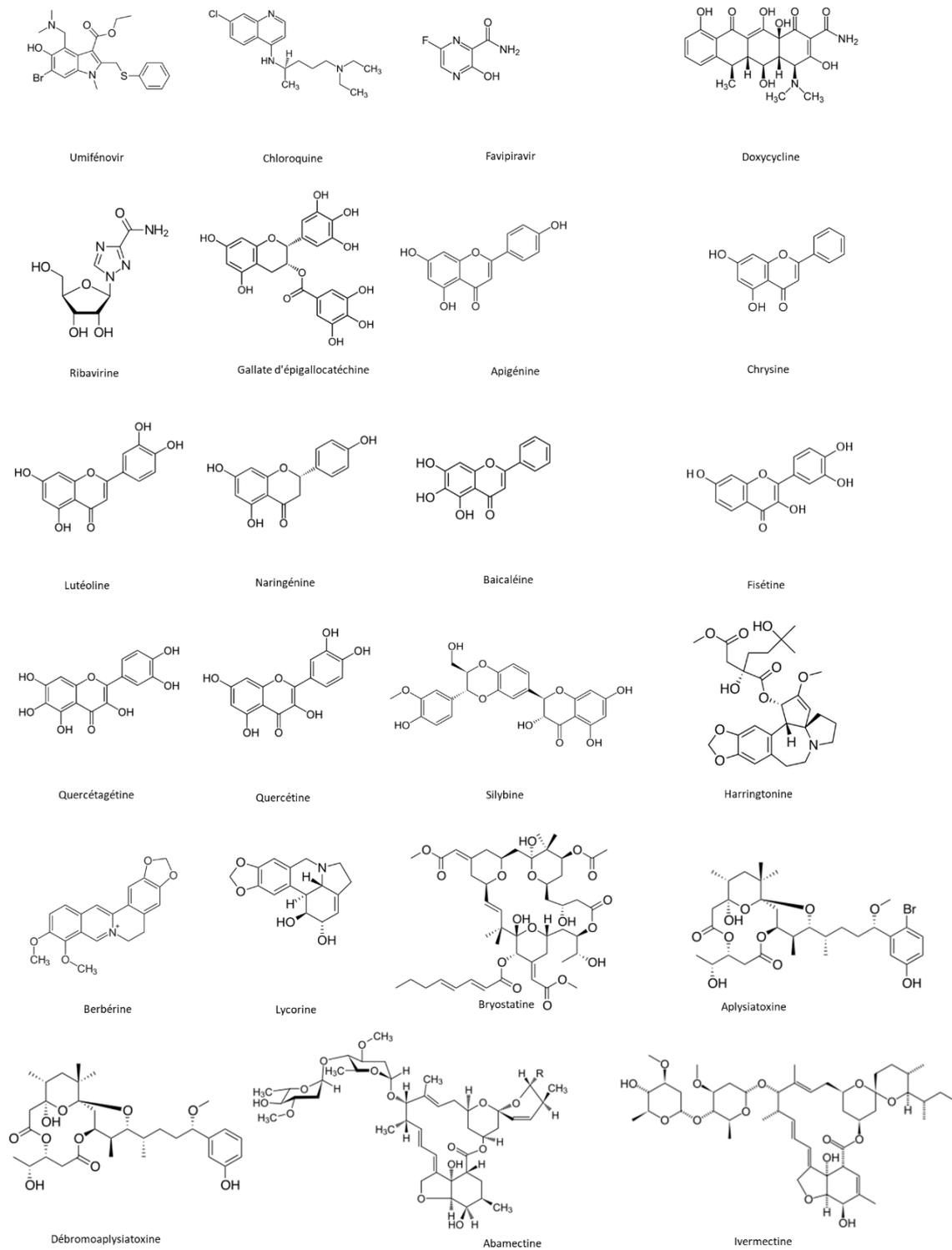
La recherche de solutions thérapeutiques ou vaccinales contre l'infection aux alphavirus est développée de manière très active. Sur le plan thérapeutique, la physiopathologie particulière de l'infection, avec un dérèglement possible du système immunitaire, causant des manifestations inflammatoires chroniques, pose un enjeu particulier. La recherche thérapeutique repose à la fois sur du criblage (*screening*), avec des tests biologiques prédictifs et sur des investigations, avec des évaluations biologiques plus approfondies, qui sont présentées ici.

### (a) Les molécules à activité antivirale directe

Les antiviraux à activité directe se rapportent aux molécules qui interfèrent avec le cycle de vie du virus et/ou des fonctions cellulaires de l'hôte, essentielles à ce cycle [26]. Pour cette stratégie, la recherche a été orientée vers le repositionnement de médicaments existants (*drug repositionning* ou *drug repurposing*), ou l'évaluation de produits naturels, dont les plus représentatifs sont présentés en **Figure 12, ci-après**.

L'**umifénovir** est un dérivé indolique synthétique autorisé en Russie et en Chine (Arbidol) pour le traitement préventif et curatif de la grippe A et B et a démontré une activité inhibitrice contre

d'autres infections majeures (hépatites B et C, gastroentérite, fièvre hémorragique, encéphalite) [105].



**Figure 12.** Principes actifs à activité antivirale directe.

Contre le CHIKV, il inhibe *in vitro* l'attachement/l'entrée du virus à travers la protéine E2 et les récepteurs de surface de la cellule [106], et son optimisation structurale a permis d'identifier des dérivés semi-synthétiques à plus fort potentiel antiviral [107].

La **chloroquine** est une molécule synthétique de la famille des 4-aminoquinoléines, initialement commercialisée en prévention et traitement du paludisme, mais est également étudiée contre des grandes pathologies humaines (cancer, maladies auto-immunes) [108,109] et différents virus dans des études *in vitro* [110–112], dont les alphavirus CHIKV [113], SINV [114] et SFV [115]. La chloroquine s'accumule au sein de la cellule, augmente le pH intracellulaire et dérègle alors de nombreux mécanismes cellulaires dépendants du pH [110], notamment l'autophagie [108]. Une étude chez des souris infectées par le SFV établit que la chloroquine est inefficace et aggrave au contraire la maladie [116]. Une étude chez l'Homme n'a pas révélé d'activité significative pour l'infection aiguë au CHIKV [117].

Le **favipiravir**, ou T-705, est une pyrazine organofluorée synthétique, initialement décrite comme un inhibiteur sélectif du virus de la grippe A. Ce composé, ainsi que son analogue T-1105, reconnu comme substrat par l'ARN polymérase virale, interfèrent *in vitro* avec la réplication des alphavirus arthritogéniques (CHIKV, SINV, SFV, ONNV, MAYV, RRV) et encéphalitiques (VEEV, WEEV et EEEV) et *in vivo*, avec celle de CHIKV [118,119].

La **doxycycline** est un médicament antibactérien d'origine semi-synthétique, de la famille des tétracyclines. L'association de la doxycycline avec la ribavirine, médicament antiviral de la famille des analogues nucléosidiques, a démontré *in vitro* et *in vivo*, une activité inhibitrice contre les alphavirus. Contre le CHIKV, la doxycycline interfère avec la protéine virale E2, pour bloquer l'attachement du virus à la cellule hôte, tandis que la ribavirine inhibe la réplication virale [120]. La ribavirine et l'interféron- $\alpha$ , utilisés comme traitements seuls ou combinés, ont été établis *in vitro*, comme des puissants inhibiteurs de CHIKV et de SFV [121,122].

Les **produits naturels d'origine végétale** et de diverses classes ont été décrits pour leur potentiel anti-alphaviral.

Les **polyphénols d'origine naturelle**, déjà connus pour leur capacité antivirale, ont été très étudiés contre les alphavirus. Le gallate d'épigallocatechine [EGCG : (-)-epigallocatechin-3-O-gallate], qui est la principale catéchine du thé vert, inhibe l'entrée de CHIKV *in vitro* par des interactions probables avec des facteurs d'attachement [123]. Les flavonoïdes apigénine, chrysin, lutéoline et naringénine, présents dans différents aliments consommés régulièrement

(ex. : agrumes, tomates, miel, herbes aromatiques), inhibent l'entrée et la réplication du CHIKV *in vitro* (Pohjala et al., 2011). La baicaléine, isolée de *Scutellaria baicalensis* et *Scutellaria lateriflora*, la fisétine (présente dans la fraise, le concombre, l'oignon ...), ou encore la quercétagine (isolée du genre *Eriocaulon*), sont des potentiels antiviraux contre CHIKV par en raison de leur capacité à interférer avec le cycle de vie du virus *in vitro* (Lani et al., 2016). La quercétine est capable de réduire l'infection par ONNV *in vitro*, comme cela a été démontré par notre équipe [124]. Des dérivés de flavonoïdes, tels que les flavaglines (cyclopenta[*b*]benzofuranes) dérivés d'une structure flavonol-cinnamate), inhibent *in vitro* l'entrée de CHIKV, par interaction avec les prohibitines et notamment la PHB-1, décrite comme l'un des récepteurs cellulaires du CHIKV [125]. Les flavonolignanes, dérivés d'une structure combinant un flavonoïde et un lignane, sont, par exemple, représentés par la silymarine, mélange isolé du Chardon-Marie (*Silybum marianum*, Asteraceae) et contenant principalement la silybine. Celle-ci est utilisée contre les troubles hépatiques et peut agir sur la réplication du CHIKV et MAYV *in vitro* [126]. Les acides tanniques (tanins) sont capables de réduire l'infection par le CHIKV, par interaction avec le cycle de vie du virus [127].

Les **alcaloïdes d'origine naturelle** ont été étudiés contre les alphavirus, mais de manière non approfondie. L'harringtonine (céphalotaxine), isolée de *Cephalotaxus harringtonia* (Cephalotaxaceae), interfère avec l'infection par le CHIKV *in vitro*, en agissant sur la réplication de l'ARN et la synthèse protéique [128]. *In vitro*, la berbérine (isoquinoléine) perturbe la synthèse d'ARN viraux et des protéines virales de CHIKV, SFV et SINV [129]. La lycorine (phénantridine) inhibe la traduction des protéines virales des alphavirus SINV, SFV et CHIKV [130].

Des **produits naturels d'origine marine**, de structures plus ou moins complexes, ont été évalués contre les alphavirus. La bryostatine (lactone macrocyclique), connue pour son activité modulatrice de la protéine kinase C (PKC), a fait l'objet de travaux contre différentes pathologies, telles que la maladie d'Alzheimer [131,132], le cancer [133], le VIH/SIDA [134]. Elle a aussi été décrite, avec ses dérivés, comme des inhibiteurs de la réplication de CHIKV *in vitro* [135]. Des toxines marines de type polyacétates, isolées de cyanobactéries (*Lyngbya majuscula*, *Schizothrix calcicola*, et *Oscillatoria nigro-viridis*), telles que la débromoaplysiatoxine et la 3-méthoxydébromo-aplysiatoxine, dérivées de l'aplysiatoxine, inhibent la réplication de CHIKV *in vitro*, probablement par interaction avec un processus post-entrée virale [136].

Des **composés produits par les microorganismes**, notamment ceux du groupe des avermectines (lactones macrocycliques), produites par l'actinomycète *Streptomyces avermitili* et connues pour leurs activités anthelminthiques et insecticides, ont été également évaluées contre les alphavirus *in vitro*. En particulier, l'abamectine et l'ivermectine inhibent la réplication du CHIKV [129].

#### (b) Les anticorps

Les anticorps sont aussi considérés comme ayant une activité antivirale directe. Le récepteur MXRA8 est exprimé à la surface des cellules cibles des alphavirus [46,47]. L'utilisation d'anticorps monoclonaux neutralisants anti-MXRA8, interagissant avec E2 par compétition, peut empêcher l'attachement du virus à la cellule-hôte [137]. L'anticorps neutralisant C9 est aussi décrit comme capable d'interagir avec la protéine E2 et prévient l'infection *in vitro* et *in vivo* contre le CHIKV [138].

#### (c) Les immunomodulateurs

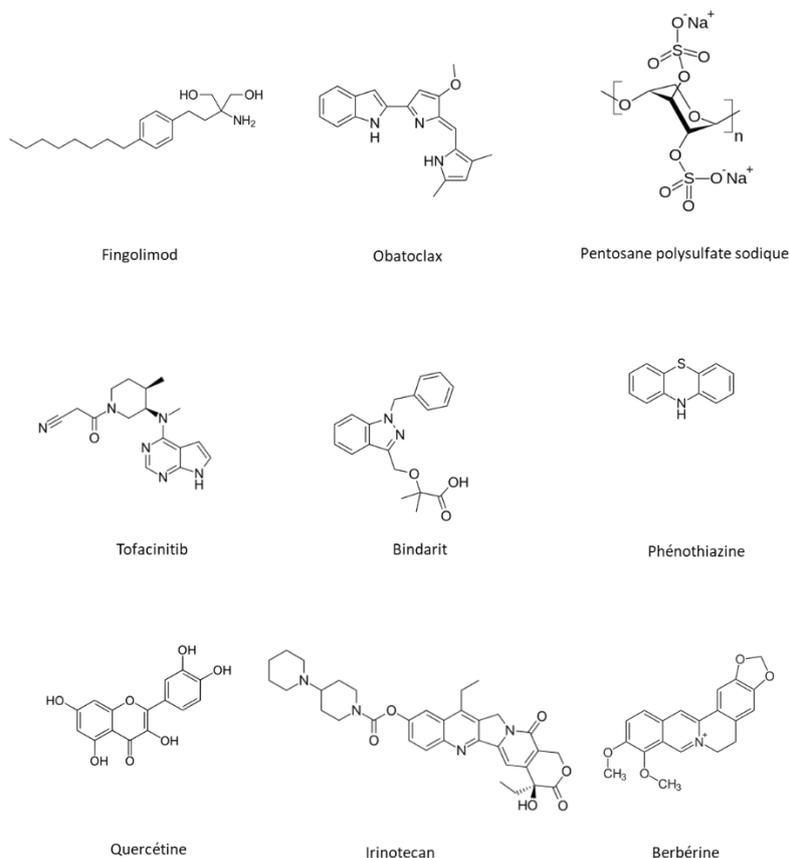
Comme décrit précédemment, le système immunitaire est essentiel au contrôle de l'infection par les alphavirus. Ainsi, la recherche de molécules synthétiques, capables d'agir sur les différents acteurs de la réponse immunitaire et de les réguler (immunomodulateurs), est une seconde piste envisagée (**Fig. 13, ci-après**).

Le **fingolimod** (aminodiol) est indiqué dans le traitement de la sclérose en plaque, par la modulation des récepteurs de la sphingosine-1-phosphate. Chez des souris infectées par le CHIKV, il permet de limiter l'inflammation entraînée par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et les complications associées, en se liant aux récepteurs de la sphingosine-1-phosphate [139].

L'**obatoclastax** (indole bipyrrrole) est un inhibiteur synthétique de la famille des protéines Bcl-2, en développement contre divers types de cancer, en raison de son activité en faveur de l'apoptose des cellules cancéreuses. Appliqué *in vitro* contre le CHIKV et le SFV, il réduit l'infection en interférant avec une étape post-entrée, probablement en augmentant le pH intracellulaire [140].

Le **pentosane polysulfate sodique (PPS)** est un glycosaminoglycane (GAG) semi-synthétique utilisé dans le traitement de la cystite et du syndrome vésical. Chez des souris infectées par le RRV et le CHIKV, le PPS atténue les symptômes arthritiques, musculaires et cartilagineux. Son effet immunomodulateur se caractérise par la réduction du niveau de la cytokine pro-inflammatoire IL-6, et l'augmentation de celui de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 [141].

Le **tofacinitib** (pyrrolopyrimidine synthétique) est appliqué comme inhibiteur de la voie JAK-STAT pour le traitement de différentes maladies, dont la polyarthrite rhumatoïde. Pour une infection par le CHIKV, il a été démontré, chez des souris infectées, qu'il inhibe la production de cytokines et l'infiltration de leucocytes [142].



**Figure 13.** Molécules à activité immunomodulatrice.

Le **bindarit** (indazole synthétique) est étudié pour plusieurs maladies comme un inhibiteur sélectif du recrutement des protéines chimiotactiques monocytes MCP-1 (CCL2), MCP-3 (CCL7) et MCP-2 (CCL8) pro-inflammatoires. Chez la souris infectée par RRV ou CHIKV, il réduit l'arthrite, les destructions tissulaires et l'infiltration cellulaire liée au processus inflammatoire [143–145].

Les **phénothiazines** forment une classe thérapeutique indiquée pour le traitement de maladies psychotiques et des allergies. *In vitro*, ils inhibent l'entrée des alphavirus en interférant avec le mécanisme d'endocytose, comme démontré avec le SFV [146].

L'**abatacept** est un anticorps (CTL4-Ig), utilisé comme médicament immunosuppresseur agissant en limitant l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup>. Chez des souris infectées par le CHIKV, il améliore les symptômes de la maladie, sans toutefois affecter la virémie [142].

Les **produits naturels et/ou leurs dérivés semi-synthétiques** ont aussi été évalués comme immunomodulateurs contre l'infection par les alphavirus arthritogéniques. Au sein de notre équipe et sur le prototype ONNV, l'effet immunomodulateur de la quercétine (flavonoïde) a été établi sur la production des médiateurs pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et CCL2, en plus de son activité antivirale *in vitro* (culture primaire de fibroblastes synoviaux humains) [124], mais aussi de la modulation de la réponse inflammatoire par le médicament anticancéreux Irinotecan, qui est un alcaloïde dérivé de la camptothécine [147]. L'alcaloïde berbérine (isoquinoléine) a été décrit pour ses activités antivirales directes contre les alphavirus et il exerce un effet immunomodulateur remarquable, par l'inhibition de la voie MAPK dans l'infection au CHIKV *in vitro* et *in vivo* [129,148].

#### (d) Molécules à action physiocellulaire

L'importance des canaux ioniques dans le processus infectieux a été établie, notamment pour l'entrée et la réplication de nombreux virus. Les canaux chlorure CLIC1 et CLIC4 (*chloride intracellular channels 1/4*) ont été décrits comme favorisant la réplication du CHIKV, en se liant aux protéines nsP, notamment nsP3. Différents acides, tels que le DIDS (*diisothiocyanostilbene-2,20-disulfonic acid*), le 9-ACA (*9-anthracene carboxylic acid*), ou encore le NPPB (*5-nitro-2-3-phenylpropylamino benzoic acid*) exercent leurs activités antivirales en inhibant le fonctionnement des canaux chlorure *in vitro* [149].

#### (e) Les vaccins

Depuis 1971, plusieurs vaccins inactivés anti-alphavirus ont été élaborés et testés, mais sans développement commercial [137,150–154]. Le principe de ces vaccins repose sur l'injection d'un alphavirus inactivé, pour mimer une infection et stimuler le système immunitaire. Depuis la dernière pandémie de CHIKV, la recherche de vaccins contre les alphavirus a considérablement évolué. Aujourd'hui d'autres classes sont étudiées : les vaccins dits « chimères », les vaccins à ADN, les vaccins recombinants ou encore les vaccins dits « virus-like particle ».

Les vaccins à ADN consistent en l'injection d'ADN modifié, pour déclencher une réaction immunitaire et induire une protection immunitaire. Les données, établies *in vivo* par Muthumani *et al.* en 2008 contre le CHIKV, présentent les vaccins à ADN comme un axe de recherche prometteur [155].

Les vaccins chimères reposent sur l'utilisation d'une construction chimère à partir de portions de génome de différents virus. En 2008, Wang *et al.* ont évalué *in vitro* et *in vivo* (souris) leur vaccin développé contre le CHIKV [156].

Plusieurs vaccins « virus-like particle », qui utilisent des molécules synthétiques similaires aux virus, sans être infectieux, ont été étudiés contre le CHIKV et testés *in vivo* sur des primates [157], avant d'être soumis à des essais cliniques [158].

Les vaccins recombinants utilisent un virus modifié pour mimer le virus et stimuler le système immunitaire, sans être infectieux. Ces vaccins suscitent un intérêt croissant, avec des tests *in vitro* [159] et *in vivo* (souris), par Wang *et al.* en 2011 contre le CHIKV [160], ou encore par Partidos *et al.* en 2012 contre le CHIKV et ONNV [161]. En 2019, un vaccin recombinant contre le CHIKV a été l'objet d'un essai préclinique [162].

Les souches virales atténuées (ou vaccin vivant atténué) représentent un axe important dans la recherche de vaccins contre les alphavirus,[163–165] pour leur capacité à favoriser une immunité plus longue et plus robuste.[166] Ces vaccins utilisent des prototypes de virus dont les protéines sont modifiées, à l'image du premier vaccin récemment autorisé (novembre 2023) contre les infections par le CHIKV, le IXCHIQ®. Ce dernier repose sur l'utilisation d'un prototype du CHIKV dont la protéine nsP3 a été modifiée.[163,167]

**En conclusion**, la (ré)émergence des alphavirus arthritogéniques a affirmé un nouvel enjeu de santé publique à l'échelle planétaire. La recherche intensive développée durant les deux dernières décennies a permis d'acquérir des connaissances sur la biologie des alphavirus, leur processus infectieux, les mécanismes physiopathologiques et la réponse immunitaire engagée contre une infection. L'infection par les alphavirus arthritogéniques chez l'Homme se caractérise notamment par une inflammation, pouvant conduire à des complications chroniques plus ou moins sévères. L'enjeu de la recherche thérapeutique contre les alphavirus arthritogéniques réside alors dans la découverte de molécules qui présenteraient à la fois une activité antivirale et une activité immunomodulatrice, comme celles antérieurement établies au laboratoire avec le flavonoïde quercétine [124] et l'alcaloïde semi-synthétique CPT-11 (dérivé de la camptothécine) [147]. L'identification de nouvelles sources moléculaires ouvrirait alors des nouvelles perspectives thérapeutiques. La diversité chimique naturelle constitue là encore une opportunité et le succès des alcaloïdes pour le traitement de grandes pathologies humaines nous a conduit à explorer cette catégorie de molécules naturelles.

# Chapitre 2. La piste thérapeutique des alcaloïdes<sup>1</sup>

La diversité moléculaire présente au sein de la classe des alcaloïdes suscite un intérêt continu pour la recherche et la conception de nouveaux médicaments obtenus à partir de ces structures, mais leur exploitation comme médicaments anti-alphavirus n'est pas encore établie. Suivant une exploration engagée au laboratoire avec le médicament anticancéreux Irinotecan, dérivé de la camptothécine [147], une analyse des données de la littérature a permis de considérer trois classes d'alcaloïdes (isoquinoléine, quinolizidine, indole), et neuf composés représentatifs pour leurs données expérimentales pertinentes (modèles et mécanismes) par rapport à la physiopathologie des alphavirus arthritogéniques (infection et inflammation).

## I. Les alcaloïdes naturels

### 1. Définitions

Le terme « alcaloïde » a été introduit en 1819 par Carl F. W. Meissner pour désigner des « *composés basiques azotés d'origine végétale et pharmacologiquement actifs* ». Cette définition a évolué à plusieurs reprises [168]. Le terme « alcaloïde » a été ensuite défini comme « *un groupe de composés basiques azotés d'origine naturelle, à faible poids moléculaire, dérivés d'acides aminés et biologiquement actifs* » [169].

Selon leur origine et leur structure chimique, les alcaloïdes peuvent être répartis en trois groupes. Les alcaloïdes vrais désignent des composés dérivés d'un acide aminé et contenant au moins un hétérocycle avec un atome d'azote. Les proto-alcaloïdes correspondent à des composés dont l'atome d'azote, issu de l'acide aminé précurseur, n'est pas inclus dans un système hétérocyclique. Les pseudo-alcaloïdes regroupent des composés qui ne dérivent pas d'un acide aminé et dont l'atome d'azote a probablement été incorporé ultérieurement [170].

---

<sup>1</sup> Publication associée : Sandenon Seteyen A-L, Girard-Valenciennes E, Septembre-Malaterre A, Gasque P, Guiraud P, Sélambarom J. Anti-Alphaviral Alkaloids: Focus on Some Isoquinolines, Indoles and Quinolizidines. *Molecules*. 2022; 27(16):5080. <https://doi.org/10.3390/molecules27165080>

## 2. Sources naturelles

Les alcaloïdes sont des métabolites secondaires dérivés d'acides aminés et qui sont biosynthétisés par divers organismes vivants (bactéries, champignons, insectes, reptiles, amphibiens, oiseaux, mammifères, organismes marins...), dont les plantes [171].

Les alcaloïdes forment le plus grand groupe de métabolites secondaires avec plus de 27 000 molécules connues à ce jour, de motifs moléculaires très variés et parfois très complexes. Ils seraient présents dans environ 500 millions d'espèces. Parmi elles, 30 % sont issus du règne végétal, et représentent 20% des métabolites secondaires. La concentration d'alcaloïdes est variable dans les plantes et peut dépendre de l'origine biosynthétique des alcaloïdes, ainsi que de la disponibilité en azote et autres nutriments [172]. Les alcaloïdes sont localisés dans différents compartiments de la cellule végétale, comme les mitochondries, les vésicules, les chloroplastes ou encore les vacuoles [173].

Les alcaloïdes sont largement distribués au sein du règne végétal. De manière non exhaustive, à titre d'exemple, l'on peut citer des espèces appartenant aux ordres des Ranunculales (familles Berberidaceae, Menispermaceae, Ranunculaceae), des Rutales (famille Rutaceae), des Gentiales (familles Apocynaceae, Loganiaceae, Rubiaceae) ou des Tubiflorae (familles Boraginaceae, Convolvulaceae, Solanaceae)... [174]. Cependant, la composition chimique de nombreuses espèces végétales reste encore à établir, pour éventuellement mieux caractériser de nouvelles structures comme potentiels principes actifs [175].

## 3. Propriétés physicochimiques

Les alcaloïdes sont des composés de basicité variable, qui forment des sels par réaction avec les acides. Ils sont habituellement retrouvés dans les végétaux sous forme de combinaisons salines, d'amines ou encore de *N*-oxydes. Ils sont en général incolores, sans odeur ni goût, mais il existe des exceptions, comme la berbérine qui est de couleur jaune [176]. La grande diversité structurale des alcaloïdes leur confère des propriétés physicochimiques variables, notamment leur solubilité. Les bases libres sont solubles dans l'eau et les solvants organiques, alors que les sels sont relativement solubles dans l'eau, mais peu solubles dans les solvants organiques. Ces différences de solubilité et de propriétés acido-basiques sont exploitées pour l'extraction des alcaloïdes et le fractionnement de leurs mélanges.

#### 4. Fonctions biologiques

Les alcaloïdes assurent diverses activités métaboliques et fonctionnelles chez les organismes producteurs [177].

Ce sont des métabolites secondaires et, contrairement aux métabolites primaires, ils sont *a priori* non essentiels à l'organisme qui les produit, voire toxiques et peuvent être alors retenus dans des structures cellulaires qui les isolent (vacuoles). Les fonctions qu'ils assurent au sein de l'organisme producteur ont été longtemps méconnues. Depuis, de nombreuses études ont été menées pour mieux comprendre les rôles endogènes et exogènes assurés par ces molécules [178].

Les fonctions primaires des alcaloïdes sont celles qui s'exercent au profit de la plante elle-même. Dans un contexte de stress, la production d'alcaloïdes chez la plante peut être augmentée pour réguler différents processus du métabolisme, par exemple en activant et/ou inhibant la production d'autres molécules. Les alcaloïdes peuvent également agir comme des facteurs de croissance chez les plantes, ou encore comme neurotransmetteurs chez les animaux.

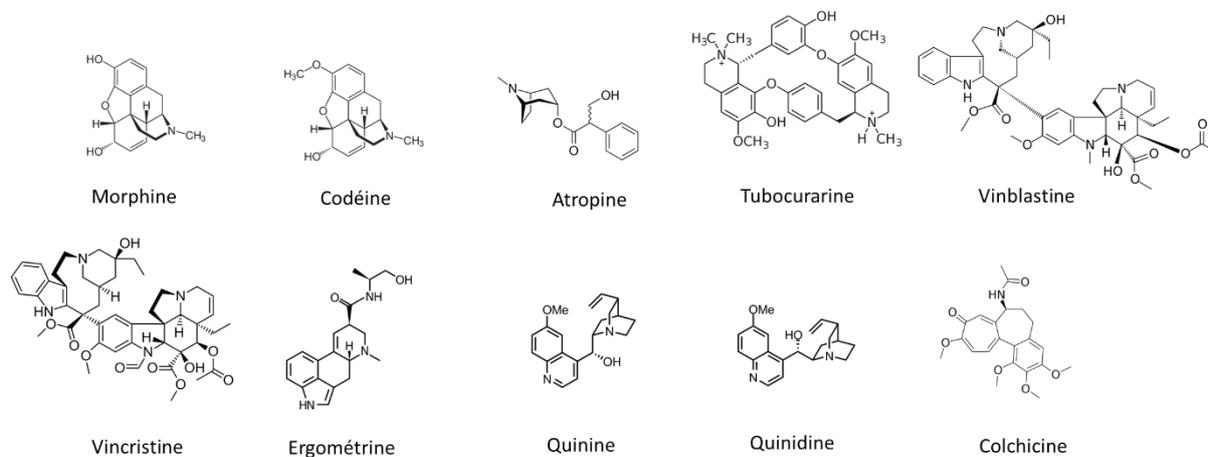
Les fonctions secondaires des alcaloïdes assurent une protection chimique et biologique de la plante, notamment contre les pathogènes, les prédateurs (ex. : goût déplaisant de l'alcaloïde pour les herbivores) et les stress physiques (ex. : rayonnement ultraviolet, chaleur). Ils participent ainsi à l'adaptation de la plante à son environnement [170,179].

#### 5. Activités biologiques

Les plantes contenant des alcaloïdes sont utilisées par l'Homme depuis les Temps Anciens, comme poisons, euphorisants ou stimulants [180,181]. Ainsi, la mort de Socrate aurait été provoquée par l'absorption du poison coniine de *Conium maculatum*, et la morphine, isolée de *Papaver somniferum* vers 1800, est toujours utilisée comme psychotrope. L'usage des plantes à alcaloïdes à des fins esthétiques a aussi été décrit, avec les espèces *Hyoscyamus muticus* ou *Atropa belladonna*, contenant de l'atropine et utilisées par les femmes au Moyen-Âge pour provoquer la dilatation des pupilles [180].

L'avènement de la chimie moderne a permis d'exploiter directement les alcaloïdes isolés pour différentes propriétés thérapeutiques (ex. : antibactérienne, antimétabolique, anti-inflammatoire, analgésique, anesthésiante, hypnotique, psychotrope, antitumorale) [176]. Plus de 27 000 alcaloïdes d'origine végétale ont déjà été identifiés [172], et parmi eux des types structuraux

emblématiques et associés à des usages thérapeutiques majeurs [169,176,177,182]. Quelques exemples remarquables de ces différents types sont présentés ci-après, en **Figure 14**.



**Figure 14.** Alcaloïdes d'intérêt pharmaceutique.

Les **alcaloïdes morphiniques** dérivés de la morphine (opiacés) sont reconnus pour leurs propriétés analgésiques, comme la codéine (éther méthylique).

Les **alcaloïdes tropaniques**, dérivés du squelette chimique tropane et caractéristiques d'espèces des familles des Solanaceae et Erythroxylaceae, sont représentés par l'atropine isolée des espèces *Hyoscyamus muticus* ou *Atropa belladonna* et exploitée pour ses propriétés anticholinergiques.

Les **alcaloïdes de la famille des benzyloisoquinoléines** sont par exemple connus pour leurs propriétés curarisantes, comme la tubocurarine, initialement identifiée comme poison puis appliquée comme myorelaxant en chirurgie.

Les **alcaloïdes indolomonoterpéniques** sont exploités comme anticancéreux, comme la vincristine et la vinblastine (alcaloïdes de type *Vinca*), produites à partir de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*).

Les **alcaloïdes indoliques**, comme l'ergométrine de l'ergot de seigle (*Claviceps purpurea*, champignon parasite de Poaceae), qui possède des propriétés vasoconstrictrices, est par exemple utilisée en médecine pour prévenir les hémorragies.

Les **alcaloïdes quinoléiques** ont trouvé diverses applications, comme la quinine, isolée de l'écorce de quinquinas (*Cinchona officinalis* et *sp.*) et exploitée comme antipaludéen, son isomère la quinidine appliquée contre les troubles cardiaques (anti-arythmique).

La colchicine, qui est un proto-alcaloïde anti-mitotique toxique, a été anciennement exploitée contre les crises de goutte.

Les alcaloïdes représentent près de la moitié des produits naturels d'importance pharmaceutique et biologique, mais ils restent sous-représentés sur le marché pharmaceutique. Cette faible exploitation commerciale s'explique notamment par leurs propriétés physico-chimiques défavorables à un développement pharmaceutique, et par leur distribution naturelle (quantités naturellement faibles) qui réduit leur accessibilité et leur approvisionnement [183].

## **II. Les alcaloïdes comme sources potentielles d'anti-alphavirus**

Des alcaloïdes ont été identifiés comme antiviraux et/ou anti-inflammatoires, mais ils ont été encore peu caractérisés contre les alphavirus. Toutefois, des évaluations biologiques approfondies d'alcaloïdes font ressortir des mécanismes d'action ou des modèles biologiques d'intérêt pour la recherche contre les alphavirus.

### **1. Analyse de données pour des alcaloïdes représentatifs**

Une étude bibliographique, retracée en **Annexe 1**, recense des alcaloïdes d'intérêt en contexte viral et/ou inflammatoire, avec une grande variété moléculaire : benzophénanthridines, indoles, indolizidines, isoquinoléines, pipéridines, pyridines, quinoléines, quinolizines et quinolizidines et alcaloïdes d'origine terpénique. Ils ont été étudiés contre de grandes pathologies humaines (cancer, maladies métaboliques, infections virales et bactériennes), mais aussi contre l'inflammation associée à celles-ci, notamment par les voies majeures des kinases MAPK et NF- $\kappa$ B. Les classes structurales d'alcaloïdes les plus étudiées sont représentées par les structures de type isoquinoléine (~40%), quinolizidine (~20%) et indole (~10%).

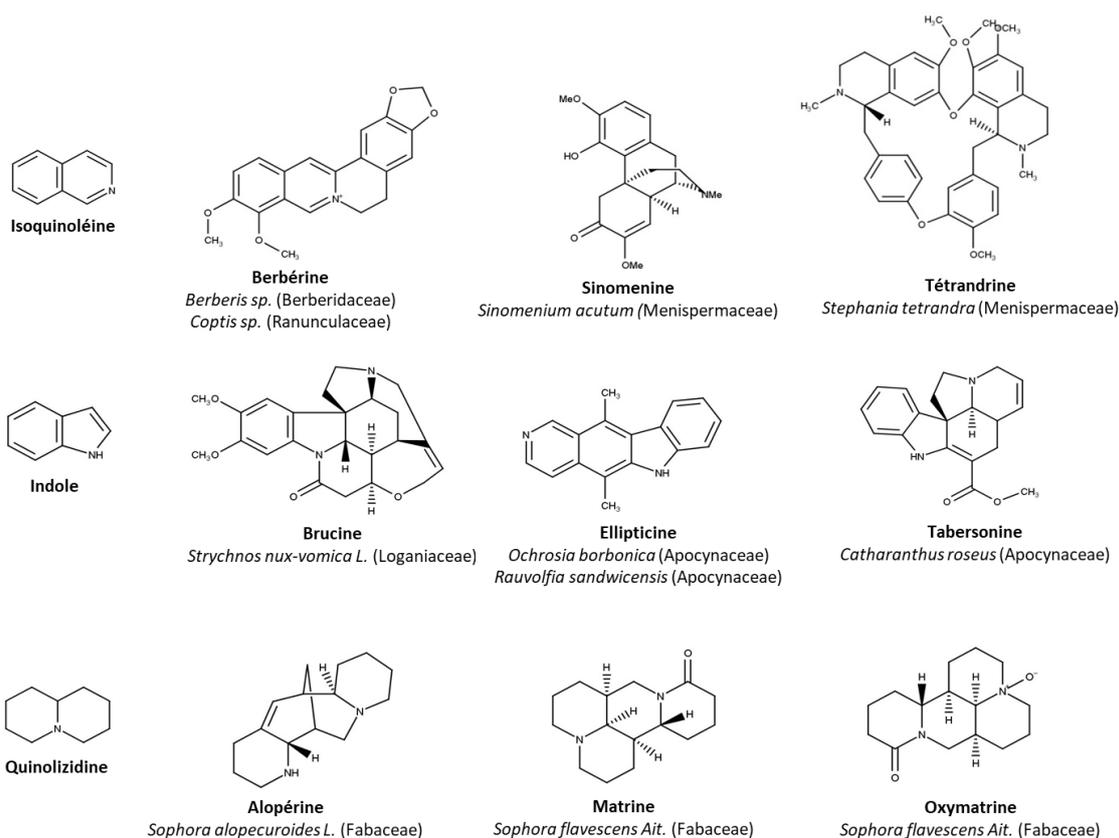
Les isoquinoléines représentent un vaste groupe d'alcaloïdes et sont des molécules d'intérêt très décrites au travers leurs divers cibles et mécanismes d'action dans de nombreuses pathologies, notamment contre les cancers, les infections virales et en contexte inflammatoire [184].

Les alcaloïdes indoliques sont caractérisés par leur cycle benzopyrrole, et présentent une grande variété de structures et des activités très diverses, notamment anti-inflammatoire et anti-tumorale [185,186].

Les quinolizidines sont largement décrites pour différentes activités, notamment anti-inflammatoires, anti-tumorales et antivirales à travers diverses cibles. La matrine et

l'oxymatine sont, par exemple, capables d'inhiber l'activité des cyclooxygénases, limitant ainsi la production de prostaglandines pro-inflammatoires [187]. L'oxymatine a été établie pour son activité anti-tumorale, car interférant avec le cycle cellulaire [188], la balance rédox intracellulaire [189], et induisant l'apoptose des cellules [189,190]. L'alopérine et ses dérivés sont des inhibiteurs de l'entrée du VIH-1 [191] et du VHC [192].

Partant des trois classes d'alcaloïdes remarquables, l'analyse de données expérimentales a alors porté sur neuf molécules présentes dans différentes familles botaniques (**Fig. 15, ci-après**).



**Figure 15.** Alcaloïdes naturels représentatifs de trois classes structurales d'intérêt *adapté de* [193].

## 2. Activités biologiques en contexte viral

L'activité antivirale directe des alcaloïdes sélectionnés a été évaluée contre des virus à ADN et des virus à ARN (**Tableau 2, ci-après**) et ce large spectre d'activités suggère de nouvelles applications potentielles. Ceci est illustré par l'isoquinoléine berbérine, avec ses usages traditionnels et ses développements pharmaceutiques prometteurs, notamment dans la recherche contre le cancer [194], ou les maladies métaboliques [195].

L'intérêt de la berbérine réside en sa capacité à inhiber la réplication de plusieurs virus à ADN [196] et à ARN, dont CHIKV, SINV, SFV [129] et SARS-CoV-2 [197]. Ces données suggèrent une activité antivirale à large spectre pour des virus génétiquement différents, avec une faible cytotoxicité et une efficacité à faible concentration (de l'ordre du micromolaire), comme cela a été illustré contre CHIKV *in vitro* ( $EC_{50} = 1,8 \mu\text{M}$ ;  $CC_{50} > 100 \mu\text{M}$ ;  $SI > 127$ ) [129] et dans le cas de l'inhibition de la transcriptase inverse, lors d'une infection par le VIH-1 *in vitro* ( $IC_{50} = 0,33 \mu\text{M}$ ;  $CC_{50} = 2,09 \mu\text{M}$ ;  $SI = 16,07$ ) [198].

**Tableau 2.** Effets antiviraux et immunomodulateurs en contexte viral *d'après* [193].

Virus	Alcaloïde	Modèle / Doses testées	Efficacité et/ou Toxicité <i>in vitro</i> <sup>(a)</sup>	Effet	Réf.
Virus à ARN					
Virus de la grippe A		<i>In vitro</i> , lignée cellulaire de macrophage murin (RAW 264.7) / 25 $\mu\text{M}$	$IC_{50} = 0,01 \mu\text{M}$	Inhibe la croissance virale / Diminue la production des molécules pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ et PGE <sub>2</sub>	[199]
Virus respiratoire syncytial (VRS)		<i>In vitro</i> , cellule épithéliale basale alvéolaire d'adénocarcinome humain (A549) / 25 ou 100 $\mu\text{M}$	$CC_{50} > 100 \mu\text{M}$	Inhibe la production de la molécule pro-inflammatoire IL-6	[200]
Virus du Chikungunya (CHIKV)	Berbérine	<i>In vitro</i> , cellule d'ostéosarcome humain (HOS) / 0.1–800 $\mu\text{M}$ <i>In vivo</i> , souris / 10 mg/kg	$EC_{50} = 12,2 \mu\text{M}$ $CC_{50} = 429,5 \mu\text{M}$ $SI = 35$	Inhibe les voies de signalisation : MAPK/PI3K-AKT Réduit la charge virale et le gonflement des articulations des souris	[148]
Virus du Chikungunya (CHIKV), Virus Semliki Forest (SFV) et Virus Sindbis (SINV)		<i>In vitro</i> , cellule rénale de hamster nouveau-né BHK) / 3 $\mu\text{M}$	Pour CHIKV : $EC_{50} = 1,8 \mu\text{M}$ $CC_{50} > 100 \mu\text{M}$ $SI > 27$	Inhibe la réplication virale	[129]
Syndrome respiratoire aigu sévère lié au virus du Coronavirus-2 (SARS-CoV-2)		<i>In vitro</i> , cellule épithéliale nasale primaire / 10 $\mu\text{M}$	$EC_{50} = 9,1 \mu\text{M}$ $CC_{50} > 150 \mu\text{M}$ $SI > 16$	Inhibe la réplication virale	[197]
Syndrome respiratoire aigu sévère lié au virus du Coronavirus-2 (SARS-CoV-2)	Matrine	<i>In vivo</i> , homme	-	Diminue le niveau sérique de CRP et de lymphocytes	[201]
Virus de l'hépatite B (VHB)	Oxymatrine	<i>In vivo</i> , souris / 200 mg/kg/jour	-	Augmente le niveau de cytokines-T <sub>H</sub> 1 pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$ and IL-2) Diminue le niveau des cytokines- T <sub>H</sub> 2 anti-inflammatoires (IL-4 and IL-10)	[202]
Virus de la grippe A		<i>In vitro</i> , cellule épithéliale basale alvéolaire d'adénocarcinome humain (A549) / 190 $\mu\text{M}$ <i>In vivo</i> , mouse/60 ou 120 mg/kg	$EC_{50} = 64,47 \mu\text{M}$	Diminue le niveau des molécules pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 et TNF- $\alpha$ Inhibe les voies MAPK et NF- $\kappa\text{B}$	[203]

**Tableau 2.** Effets antiviraux et immunomodulateurs en contexte viral d'après [193] (*suite et fin*).

Virus	Alcaloïde	Modèle / Doses testées	Efficacité et/ou Toxicité <i>in vitro</i> <sup>(a)</sup>	Effet	Réf.
Virus à ARN					
Virus de l'hépatite C (VHC)	Alopérine	<i>In vitro</i> , cellule d'hépatome d'origine humaine (Huh 7.5) / 20 µM	EC <sub>50</sub> = 7,06 µM CC <sub>50</sub> > 200 µM	Inhibe l'attachement et la réplication du virus Bloque la transmission du virus de cellule à cellule	[204]
Virus à ADN					
Virus de l'Herpès humain 1 et 2 (HSV-1 et HSV-2)		<i>In vitro</i> , Cellule Vero / 2400 µM	HSV-1 : IC <sub>50</sub> = 24,4 µM CC <sub>50</sub> = 39,2 µM SI = 161 HSV-2 : IC <sub>50</sub> = 26,7 µM CC <sub>50</sub> = 39,2 µM SI = 141	Inhibe la réplication virale et la synthèse d'ADN	[205]
Virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1)	Berbérine	<i>In vitro</i> , lymphocyte T modifié / 0,29 µM	IC <sub>50</sub> = 0,33 µM CC <sub>50</sub> = 2,09 µM SI = 16,07	Inhibe l'activité de la transcriptase inverse	[206]
Cytomégalo virus humain (CMVH)		<i>In vitro</i> , fibroblaste humain néonatal / 2,65 ± 0,35 µM	EC <sub>50</sub> = 2,65 µM CC <sub>50</sub> = 390 µM SI = 147	Inhibe l'expression de la protéine E virale	[207]
Virus de l'hépatite B (VHB)		<i>In vivo</i> , souris / 200 mg/kg	-	Diminue l'expression de l'antigène	[209]
Virus de l'hépatite B (VHB)	Oxymatine	<i>In vivo</i> , souris / 20 mg/kg	-	Inhibe la réplication virale Diminue la quantité d'antigène Augmente l'expression de IFN-γ	[210]
Virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1)	Alopérine	<i>In vitro</i> , fibroblast-like COS et cellules TZM-bl / 0,01-10 µM	EC <sub>50</sub> = 1,75 µM CC <sub>50</sub> > 86,2 µM	Inhibe la fusion et l'entrée du virus	[191]

Les potentialités antivirales des quinolizidines n'ont pas encore été décrites contre les alphavirus arthritogéniques, mais elles ont été caractérisées pour d'autres virus et pour différents mécanismes. L'alopérine interfère avec l'attachement, la réplication et la transmission de cellule à cellule du VHC (EC<sub>50</sub> = 7,06 µM ; CC<sub>50</sub> > 200 µM) [204], ainsi

qu'avec la fusion et l'entrée du VIH-1 ( $EC_{50} = 1,75 \mu\text{M}$  ;  $CC_{50} > 86,2 \mu\text{M}$ ) [191]. L'oxymatrine inhibe la réplication virale de VHB *in vivo* [210].

Ces données établissent un mode d'action antiviral classique lié à la clairance virale, par interférence avec le cycle de vie du virus (entrée, réplication, assemblage et libération de nouveaux virions) et/ou par des interactions spécifiques entre le virus et la cellule-hôte [211]. Les données révèlent également une activité immunomodulatrice de ces alcaloïdes durant l'infection virale. En effet, cette activité additionnelle des antiviraux permet de prévenir la production excessive de cytokines responsables de l'inflammation et des complications associées [212]. Cette régulation de la réponse immunitaire a été exploitée contre l'infection au VIH [213] et plus récemment, contre les infections au SARS-CoV-2 [214] et aux alphavirus arthritogéniques (CHIKV et RRV) [11].

Les données expérimentales *in vitro* et *in vivo* caractérisent des effets immunomodulateurs sur différentes cibles cellulaires.

La régulation de la signalisation cellulaire, liée au médiateur pro-inflammatoire  $\text{TNF-}\alpha$ , particulièrement impliqué lors d'une infection par les alphavirus, a été établie *in vitro* par la diminution de sa production contre le virus de la grippe A avec la berbérine [215] et l'oxymatrine [203]. A l'inverse, pour l'infection au VHB, l'oxymatrine augmente la production de l' $\text{IFN-}\gamma$ , une cytokine pro-inflammatoire [210], qui active la réponse immunitaire dirigée par les cellules T Helper 1 ( $T_{\text{H}1}$ ) et essentielle contre les alphavirus [85].

La régulation de l'inflammation, associée à une infection virale, est également établie avec l'inhibition des voies de signalisation et/ou de la production de médiateurs pro-inflammatoires. La berbérine inhibe *in vitro* la production de la prostaglandine  $\text{PGE}_2$ , lors de l'infection par le virus de la grippe A [215], ce qui indique une sensibilité de la voie de l'acide arachidonique aux alcaloïdes. L'inhibition d'autres voies de signalisation de l'inflammation est établie *in vitro*, comme celle associée à MAPK, par la berbérine, lors d'une infection par le VRS [200]. Les études *in vivo* caractérisent une activité multikinase (MAPK,  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  et PI3K/AKT) de la berbérine, contre CHIKV [129] et de l'oxymatrine, contre le virus de la grippe A [203]. Chez des patients atteints du SARS-CoV-2, une étude clinique décrit l'activité anti-inflammatoire de la matrine, par la diminution du niveau circulant de la protéine C-réactive (CRP) [201].

Les alcaloïdes peuvent contribuer au développement de la réponse immunitaire durant les infections virales. Dans des études *in vivo*, l'oxymatrine augmente le taux circulant des cytokines pro-inflammatoires ( $\text{IFN-}\gamma$  et  $\text{IL-2}$ ), dépendantes des cellules  $T_{\text{H}1}$  et réduit dans le

même temps, celui des cytokines anti-inflammatoires régulatrices (IL-4 et IL-10), dépendantes des cellules T helper 2 (T<sub>H2</sub>) lors d'une infection par le VHC [202]. Elle augmente le niveau de l'IFN- $\gamma$  dans une infection par le VHB [210]. Dans une étude *in vitro* et *in vivo* de l'infection par le virus de la grippe A, l'oxymatine diminue aussi le niveau de l'interleukine IL-1 $\beta$  [203], qui est impliquée dans la sévérité de l'infections par les alphavirus [216]. La berbérine exerce des effets immunosuppresseurs remarquables *in vitro* contre le VRS, en diminuant le niveau de l'interleukine IL-6 [200], qui exerce un rôle crucial lors des infections alphavirales chroniques [35].

### 3. Activités biologiques hors contexte viral

Les effets immunomodulateurs des alcaloïdes ont aussi été démontrés pour des maladies chroniques non liées à des infections virales, comme le traduisent les effets observés à des doses non-toxiques sur différents médiateurs et voies de l'inflammation (**Tableau 3**).

**Tableau 3.** Effets immunomodulateurs des alcaloïdes dans d'autres modèles d'après [193].

Pathologie	Alcaloïde	Modèle / Doses testées	Effet	Réf.
Cancer	Berbérine	<i>In vitro</i> , cellules cancéreuses buccales / 1, 10 ou 100 $\mu$ M	Inhibe l'expression de COX-2 et la synthèse de PGE2	[217]
		<i>In vivo</i> , rats Wistar / 1, 5 ou 10 mg/kg		
		<i>In vitro</i> , cellule cancéreuse gastrique humaine (SNU-5) / 75 $\mu$ M	Augmente la production de ROS Inhibe la voie NF- $\kappa$ B	[218]
		<i>In vitro</i> , cellule thyroïdienne humaine cancéreuse (C643, OCUT1, TPC1 and Htori3) / 20 ou 80 $\mu$ M	Inhibe la voie MAPK	[219]
		<i>In vitro</i> , cellule cancéreuse du sein (MDA-MB231 and MCF-7) / 3,125-100 $\mu$ M	Inhibe la voie MAPK	[220]
	Tétrandrine	<i>In vitro</i> , cellule cancéreuse du côlon (CT-26) / 0,1–250 $\mu$ M <i>In vivo</i> , souris modèle de tumeur / 50 et 150 mg/kg	Active la voie MAPK pour l'apoptose	[221]
	Ellipticine	<i>In vitro</i> , cellule cancéreuse humaine de l'endomètre (RL95-2) / 0,1–10 $\mu$ M	Augmente la production de ROS et active la voie MAPK pour l'apoptose	[222]
Maladie cardiovasculaire	Matrine	<i>In vivo</i> , rat / 50 ou 100 mg/kg <i>Ex vivo</i> , cardiomyocytes de rats / 200 ou 400 $\mu$ M	Active la voie JAK/STAT	[223]
Athérosclérose	Alopérine	<i>In vitro</i> , inflammation induite dans cellule endothéliale du cordon ombilical (HUVEC) / 50 et 100 $\mu$ M	Réduit de la production de ROS Inhibe les médiateurs pro-inflammatoires IL-6 et CCL2	[224]
Syndromes arthritiques	Sinoméline	<i>In vitro</i> , fibroblaste modèle de polyarthrite rhumatoïde / 0,1 et 1 $\mu$ M	Réduit l'expression des médiateurs pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ and IL-6 Inhibe les voies COX et NF- $\kappa$ B	[225]
		<i>Ex vivo</i> , fibroblaste de rat modèle d'arthrite / 50 - 400 $\mu$ M	Inhibe la kinase ERK de la voie MAPK	[226]
Arthrite chronique	Tétrandrine	<i>In vivo</i> , rat modèle d'arthrite / 25 ou 80 mg/kg/jour	Inhibe les médiateurs pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ et IL-1	[227]

**Tableau 3.** Effets immunomodulateurs des alcaloïdes dans d'autres modèles *d'après* [193] (*suite et fin*).

Syndromes arthritiques	Berbérine	<i>In vivo</i> , rat modèle d'arthrite / 200 mg/kg	Réduit les médiateurs pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-17 Inhibe la voie MAPK	[228]
		<i>In vivo</i> , rat modèle d'arthrite / 75 et 150 mg/kg	Réduit les médiateurs pro-inflammatoires IL-6 et IL-17 Augmente les médiateurs anti-inflammatoires IL-10 et TGF- $\beta$	[229]
	Oxymatrine	<i>Ex vivo</i> , fibroblaste de rat modèle d'arthrite / 15, 30 et 45 $\mu$ M <i>In vitro</i> , monocyte dérivé de la moelle osseuse / 15, 30 et 45 $\mu$ M	Réduit les médiateurs pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-23 Inhibe la voie PI3K/AKT	[230]
		<i>In vivo</i> , rat modèle d'arthrite / 25, 50 et 100 mg/kg	Réduit les médiateurs pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ et IL-17A	[231]
		<i>In vitro</i> , fibroblaste modèle de polyarthrite rhumatoïde / 10–100 $\mu$ M	Réduit les médiateurs pro-inflammatoires IL-6 et IL-8 Inhibe les voies NF- $\kappa$ B et MAPK	[232]
Arthrose	Berbérine	<i>In vitro</i> , fibroblaste / 5-100 $\mu$ M	Inhibe le médiateur pro-inflammatoire IL-1 $\beta$ Inhibe la voie NF- $\kappa$ B	[233]
	Brucine	<i>In vivo</i> , rat modèle d'arthrite / 15 et 30 mg/kg	Inhibe le médiateur pro-inflammatoire PGE2	[234]
Inflammation (autres conditions pathologiques)	Ellipticine	<i>In vitro</i> , macrophages dérivés de la moelle osseuse / 5 $\mu$ M <i>In vivo</i> , modèle souris de choc septique / 20 mg/kg	Réduit les médiateurs pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ et IL-6 Inhibe la voie NF- $\kappa$ B	[235]
		<i>In vivo</i> , souris modèle d'inflammation aiguë / 10, 20 ou 40 mg/kg <i>Ex vivo</i> , macrophage dérivé de la moelle osseuse / 10 $\mu$ M <i>In vitro</i> , cellule rénale embryonnaire humaine (HEK293T) / 10 $\mu$ M	Inhibe les médiateurs pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-1 $\beta$ Inhibe les voies NF- $\kappa$ B et MAPK	[236]
	Oxymatrine	<i>In vivo</i> , rat / 120 mg/kg/jour	Inhibe les médiateurs pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ et IL-6 Inhibe la voie NF- $\kappa$ B	[237]

Dans la recherche contre le cancer, l'intérêt des alcaloïdes a été établi par leur capacité à réguler l'inflammation, qui est reconnue comme un facteur de risque et un promoteur de cette pathologie, via une action sur les mêmes voies et/ou facteurs que ceux impliqués dans une infection [238]. La production de ROS en défense a été démontrée dans différents modèles de cancer avec la berbérine [219] et l'ellipticine [222]. La berbérine régule la voie de l'acide arachidonique à travers l'inhibition de la cyclooxygénase COX-2 et la production de la production de la prostaglandine PGE<sub>2</sub> [217]. L'interférence des alcaloïdes avec les voies majeures des kinases (MAPK, NF- $\kappa$ B et PI3K/AKT) a été démontrée pour la berbérine [219,220], la tétrandrine [221] et l'ellipticine [222]. Les effets immunomodulateurs de la

berbérine sont remarquables à faible concentration dans les cellules thyroïdiennes cancéreuses ( $IC_{50} = 0,891 \mu M$ ) [219], à une concentration modérée dans les cellules cancéreuses du sein ( $IC_{50} = 15 \mu M$ ) [220] et à une plus forte concentration dans les cellules cancéreuses gastriques ( $IC_{50} = 48 \mu M$ ) [218]. L'induction de l'apoptose par les alcaloïdes, comme la tétrandrine, dans les cellules cancéreuses de côlon (SNU-5) [221] et l'ellipticine dans les cellules cancéreuses d'endomètre (RL 95-2) [222], illustrent leur activité anti-proliférative [239].

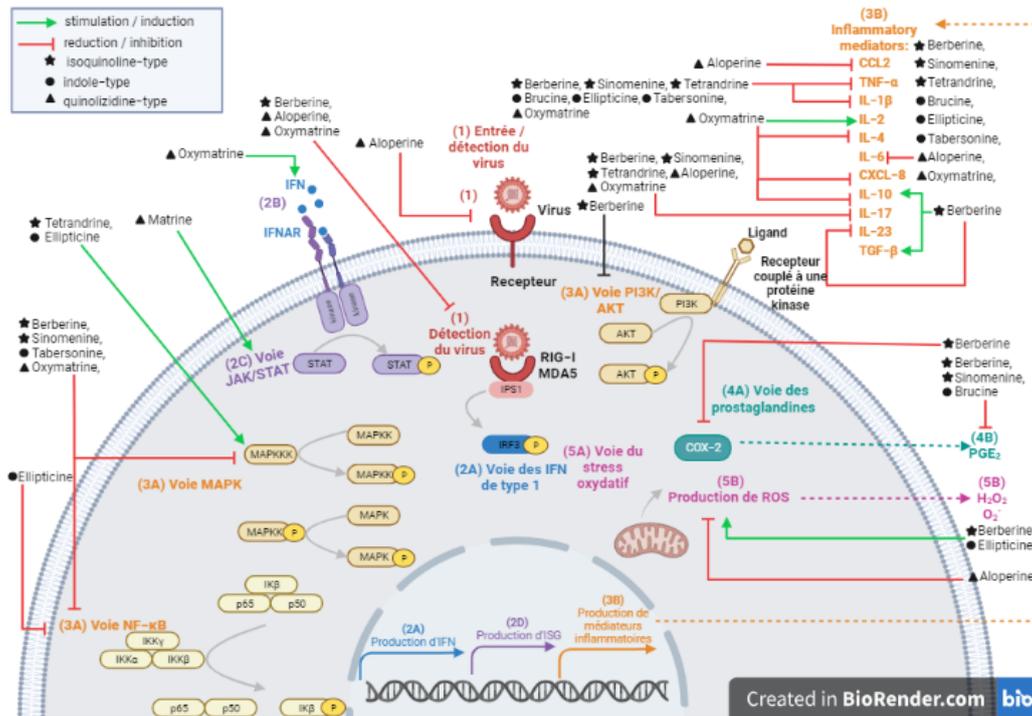
Dans d'autres pathologies complexes, les quinolizidines matrine et alopérine ont démontré des effets immunomodulateurs notables. Dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de pathologies cardiovasculaires, la matrine active la voie de signalisation JAK/STAT via les composants JAK2 et STAT3 [223] et augmente l'expression de la protéine cardioprotectrice HSP70 [240]. Dans un modèle *in vitro* d'athérosclérose, l'aloopérine exerce un effet protecteur en diminuant l'expression de médiateurs pro-inflammatoires (IL-6, CCL2 et des protéines VCAM-1 et E-selectin).

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie systémique chronique inflammatoire qui se caractérise par la destruction des articulations. Les infections par les alphavirus causent des symptômes similaires à ceux de la polyarthrite rhumatoïde et peuvent conduire à des complications plus ou moins sévères. Les effets immunomodulateurs des alcaloïdes ont été décrits avec des modèles robustes : *in vitro* dans les macrophages/monocytes dérivés de la moelle osseuse (BMDM) [241] et dans les fibroblastes synoviaux (OASF) provenant de patients atteints d'arthrose [242], *ex vivo* dans les fibroblastes (RA-FLS) provenant de patients atteints de la polyarthrite rhumatoïde [243] et *in vivo* dans des modèles précliniques d'arthrites (AIA : *adjuvant-induced arthritis* ou FCA : *Freund's complete adjuvant*) [244,245]. Comme cela a été illustré dans les différents contextes arthritiques, les isoquinoléines berbérine [228–230], sinoménine [225,226] et tétrandrine [227], ainsi que la quinolizidine oxymatrine [231,232], entraînent l'inhibition des voies de signalisation de l'inflammation, ce qui se traduit par la diminution des cytokines pro-inflammatoires courantes (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) et particulièrement l'interleukine IL-17, impliquée dans l'inflammation, la destruction osseuse associée à la polyarthrite rhumatoïde, ou encore l'infection par le CHIKV chez des patients [35].

Dans d'autres modèles de l'inflammation, les effets immunomodulateurs des alcaloïdes s'illustrent avec la tabersonine [236], la brucine [234], l'ellipticine [235] et la matrine [237]. Les données démontrent encore les effets précédemment décrits, mais particulièrement l'inhibition des voies de signalisation de l'inflammation associées aux kinases (MAPK et NF- $\kappa B$ )

et la diminution des médiateurs pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  et PGE $_2$ ), également impliqués dans l'infection par les alphavirus et l'inflammation associée.

Comme cela est résumé dans la **Figure 15**, à partir des données retracées dans les **Tableaux 2 et 3**, les alcaloïdes sélectionnés exercent des effets significatifs sur différentes cibles de la cellule-hôte, impliquées dans l'infection et l'inflammation.



**Figure 16.** Mécanismes d'action cellulaire des alcaloïdes représentatifs d'après [193].

La réponse antivirale est initiée avec la reconnaissance du virus à la surface cellulaire (récepteurs) ou dans le cytosol (ex. : RIG-I et MDA5 pour les alphavirus), lors de l'entrée ou la détection du virus (1). L'inhibition des facteurs cellulaires limite l'invasion virale, comme cela a été illustré avec l'isoquinoléine berbérine ou les quinolizidines oxymatrine et alopérine. La quinolizidine oxymatrine est aussi capable de renforcer la réponse antivirale par la production d'IFNs (2A) et leur signalisation par les récepteurs cellulaires associés (2B). Les alcaloïdes mentionnés et plus particulièrement l'isoquinoléine berbérine, peuvent interférer avec des voies de signalisation de l'inflammation, dont la voie JAK/STAT (2C), les voies MAPK et NF- $\kappa$ B (3A), la voie des prostaglandines (4A) associées à la cyclooxygénase COX-2, ainsi que les voies oxydatives (5A). Les effets inhibiteurs et/ou activateurs sont particulièrement intéressants pour une réponse inflammatoire, qui n'est pas exacerbée par une dérégulation du système immunitaire pouvant se produire lors d'une infection. Ainsi, l'intérêt des alcaloïdes mentionnés

réside dans leur action immunostimulante et/ou immunosuppressive des médiateurs-clés de l'inflammation.

#### 4. Relation structure-activité

L'intérêt thérapeutique des alcaloïdes a été reconnu avec des découvertes majeures parmi toutes ses différentes classes structurales, dont les isoquinoléïnes (ex. : l'agent anticancéreux noscarpine), les opioïdes (ou opiacés, ex. : morphine et codéine), les indoles (ex. : les agents anticancéreux vinblastine et vincristine) et les quinolizidines (ex. : oseltamivir et zanamivir contre le virus de la grippe A) [246,247]. Cet intérêt s'étend de plus en plus aux infections et à l'inflammation associée [248]. Mais le développement pharmaceutique des alcaloïdes est souvent confronté à leur faible activité et/ou à leur toxicité [249].

La recherche de structures optimisées a été intégrée pour certaines évaluations précédemment mentionnées (**Tableaux 2 et 3**), notamment par des études de la relation structure-activité (RSA). Ainsi, deux dérivés de l'isoquinoléïne berbérine ont été identifiés parmi ses *O*-esters avec de meilleurs index thérapeutiques pour l'activité antivirale *in vitro* contre le VIH [198], à l'image des développements poursuivis pour les benzyloisoquinoléïnes [250]. L'intérêt pour la quinolizidine alopérine a été renforcé par ses dérivés *N*-substitués qui constituent une nouvelle classe d'inhibiteurs de l'entrée du VIH [247]. Toutefois, les potentialités des alcaloïdes contre les alphavirus restent encore peu étudiées [251] et il n'y a pas de données relatives à de l'optimisation structurale dirigée pour la découverte d'immunomodulateurs efficaces à la fois sur la réponse antivirale et la réponse inflammatoire.

En conclusion, les alcaloïdes représentent une source majeure de solutions thérapeutiques pour des grandes pathologies humaines. L'analyse de données de la littérature révèle une capacité remarquable des alcaloïdes à interférer dans des pathologies complexes et sur des fonctions cellulaires ou immunitaires, également mobilisées dans l'infection par les alphavirus et l'inflammation associée. Ainsi, les alcaloïdes représentent un intérêt particulier pour la recherche d'anti-alphavirus, avec une évaluation biologique structurée qui permettrait de caractériser leur double activité antivirale et immunomodulatrice.

# Chapitre 3. Développement d'un modèle d'évaluation *in vitro* avec la chloroquine<sup>2</sup>

La caractérisation de nouveaux principes actifs comme agents anti-alphavirus a été envisagée avec un modèle *in vitro* qui est facile à reproduire pour le criblage de molécules et qui reste également incontournable en développement pharmaceutique. Ce chapitre décrit le cadre structuré qui a été développé pour l'évaluation biologique d'anti-alphavirus sur un type cellulaire (lignée cellulaire de fibroblastes) et un prototype d'alphavirus arthritogénique (ONNV), avec la chloroquine comme modèle de molécule antivirale et immunomodulatrice.

## I. Approche expérimentale

Les fibroblastes ont été initialement décrits comme des cellules structurales impliquées dans la construction et le remodelage de la matrice extracellulaire, puis comme des cellules immunocompétentes. Les fibroblastes sont capables de détecter les agents pathogènes, et d'activer différentes voies de signalisation dans une réponse immunitaire développée en conséquence [252]. Par ailleurs, il a été établi que les alphavirus arthritogéniques ont un tropisme particulier pour ces cellules [32,34]. Les fibroblastes sont des cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu synovial (sMSC : *synovial mesenchymal stem cells*). Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) d'origine sont des cellules souches non-hématopoïétiques et bien que peu présentes au sein de l'organisme, ce sont des cellules immunocompétentes permettant de réguler de nombreux processus [253]. Les cellules HS633T qui désignent une lignée cellulaire de fibroblastes (fibrosarcome), dont la permissivité au CHIKV a été antérieurement décrite [101], ont été utilisées pour cette étude.

ONNV a été choisi comme modèle d'alphavirus arthritogénique pour ses caractéristiques biologiques et cliniques similaires à celles du CHIKV [7,8], ainsi que pour sa capacité à infecter des cultures primaires de fibroblastes synoviaux humains (ou cellules souches mésenchymateuses humaines dérivées de la synovie) [124]. ONNV présente également

---

<sup>2</sup> Publication associée (article en préparation, pour soumission à *Int. Immunopharm.*) : Chloroquine impairs O'nyong-nyong alphavirus infection and inflammation in the fibroblast cell line HS633T.

l'avantage d'être un agent pathogène de classe 2 plus facile à exploiter en laboratoire, contrairement au CHIKV (classe 3), qui nécessite un niveau de confinement plus élevé [254]. L'infection des cellules est caractérisée par un rapport entre le nombre de virus et le nombre de cellules (MOI 1 à 10).

La permissivité des cellules HS633T au ONNV a été comparée à celle des cellules sMSC, tout comme leurs phénotypes respectifs par immunofluorescence et par qRT-PCR, avec l'expression de différents marqueurs caractéristiques des MSC (CD248, CD90, col1A et  $\alpha$ -SMA) [253].

Une étude préalable de cytotoxicité par les tests LDH et MTT a été conduite pour déterminer la tolérance des cellules HS633T au ONNV et à la chloroquine.

Une cinétique d'infection des cellules HS633T a été ensuite réalisée par l'analyse de l'expression des gènes codant pour des protéines virales d'intérêt (E1, E2, capside et nsP2), par qRT-PCR de 2 à 48 h p.i. et une observation par immunofluorescence (24 h p.i.).

La réponse cellulaire à l'infection a été également suivie de 2 à 48 h p.i., par l'analyse de l'expression des gènes codant pour les récepteurs et effecteurs antiviraux, identifiés dans le cas des alphavirus (MXRA8, RIG-I, MDA5, TLR7, IRF3, IFN- $\beta$ , STAT1, ISG15), ainsi que pour la chimiokine CCL2 qui est un médiateur-clé de l'inflammation.

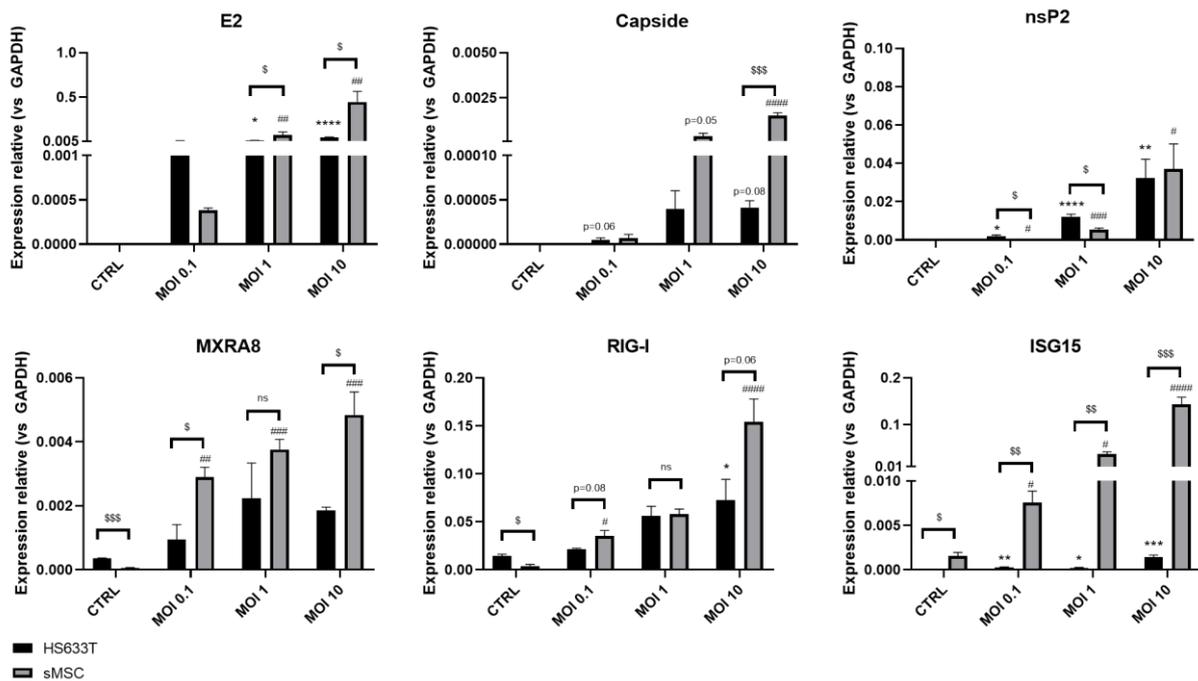
Les effets de la chloroquine sur les composants et facteurs-clés précédemment mentionnés ont été étudiés en suivant leur expression génique par qRT-PCR. En effet, la chloroquine, une 4-aminoquinoléine dérivée de la quinine, initialement développée comme antipaludique [255], a été évaluée comme agent immunomodulateur dans les maladies auto-immunes et les cancers [108,256]. Ses potentialités antivirales ont été établies, notamment contre les alphavirus, *in vitro* contre SFV [115] et SINV [114], ou encore *in vitro* et *in vivo* contre CHIKV [34,113,257].

Les résultats des expériences sont présentés comme la moyenne de trois expériences indépendantes (avec écart-type de la moyenne). La valeur  $p$  a été calculée en utilisant le test Bonferroni de comparaison multiple par rapport aux cellules non infectées et non traitées (CTRL) [\* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ , \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ ] ou par rapport aux cellules infectées (ONNV) [# :  $p < 0,05$ , ## :  $p < 0,01$ , ### :  $p < 0,001$ , #### :  $p < 0,0001$ ]. Les variations relatives des niveaux d'expression (FC : *fold change*) ont été calculées par rapport aux cellules non infectées et non traitées (CTRL).

## II. Résultats

### 1. Caractérisation phénotypique des cellules HS633T

Afin d'établir les cellules HS633T comme modèle d'étude, leur permissivité au ONNV a été comparée à celle des sMSC. Les cellules ont été infectées pendant 24 h et à différentes MOI (0,1, 1 et 10). Les cellules-contrôles (CTRL) sont des cellules non infectées et non traitées (**Fig. 17**). Les analyses ont été réalisées au bout de 24h, sans lavage des cellules.

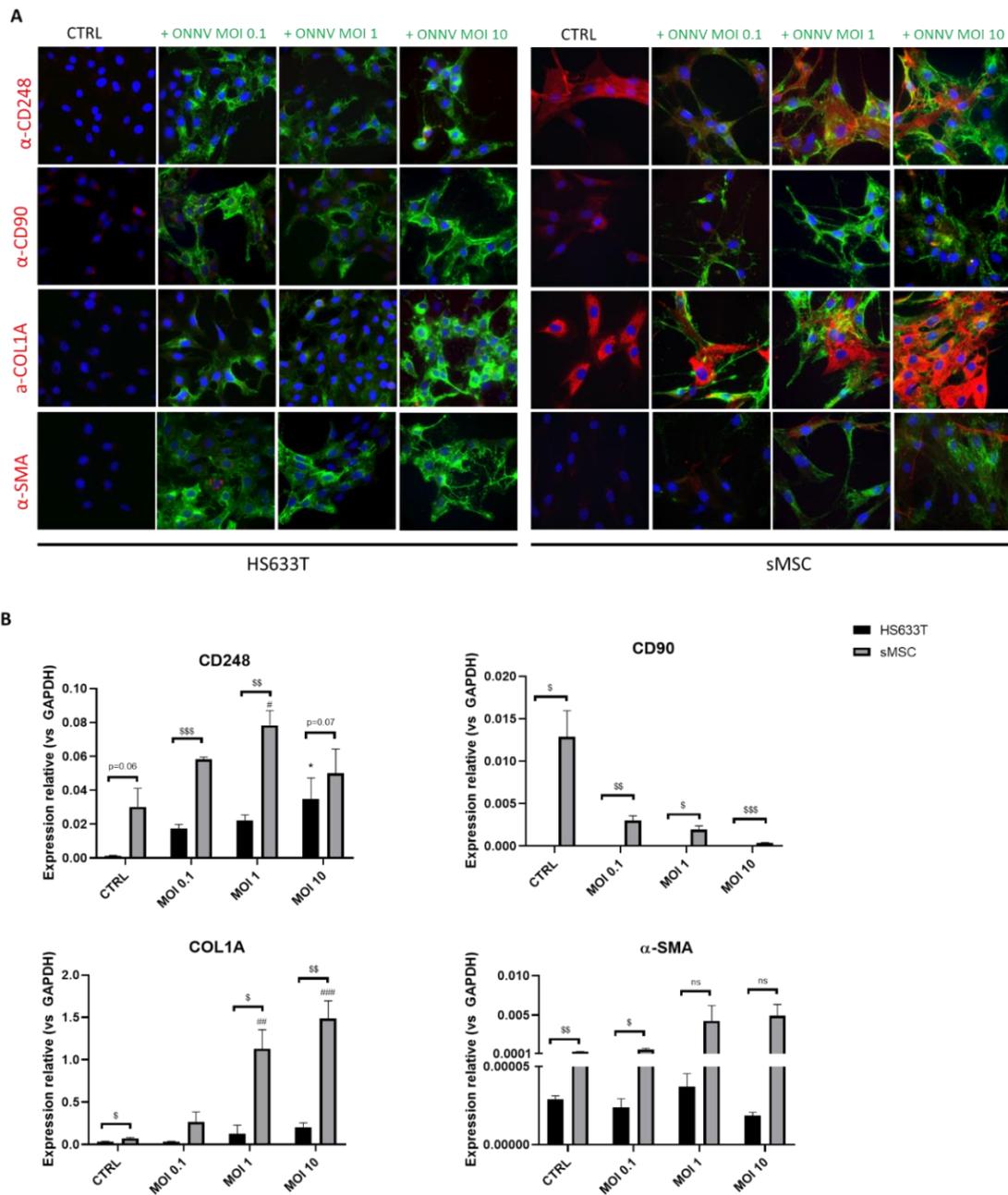


**Figure 17.** Susceptibilité comparée des cellules sMSC et HS633T à l'infection par ONNV. Traitement et infection simultanés, CHL 7,5-60  $\mu$ M ; ONNV MOI=1. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$  comparé aux cellules sMSC non infectées et non traitées (CTRL) ou # :  $p < 0,05$ , ## :  $p < 0,01$ , ### :  $p < 0,001$ , #### :  $p < 0,0001$  comparé aux cellules HS633T non infectées et non traitées (CTRL) ou \$ :  $p < 0,05$ , \$\$ :  $p < 0,01$ , \$\$\$ :  $p < 0,001$ , \$\$\$\$ :  $p < 0,0001$  comparé aux sMSC. (n=3, test de Bonferroni).

Au bout de 24 h p.i. et dès la MOI 0,1, les gènes viraux étudiés (E2, capsid et nsP2) sont exprimés dans les deux types cellulaires, mais à des niveaux relativement plus importants dans les sMSC. L'infection augmente l'expression des gènes codant pour les récepteurs MXRA8 et RIG-I et le facteur ISG15, mais toujours à des niveaux plus élevés pour les cellules sMSC.

Les phénotypes des cellules sMSC et HS633T ont été ensuite caractérisés pour confirmer leur origine à partir des cellules souches mésenchymateuses (MSC), par l'expression des

marqueurs CD248, CD90, col1A et  $\alpha$ -SMA par immunofluorescence et qRT-PCR à 24 h p.i. et à différentes (MOI 0,1 à 10). Les résultats sont présentés en **Figure 18**.



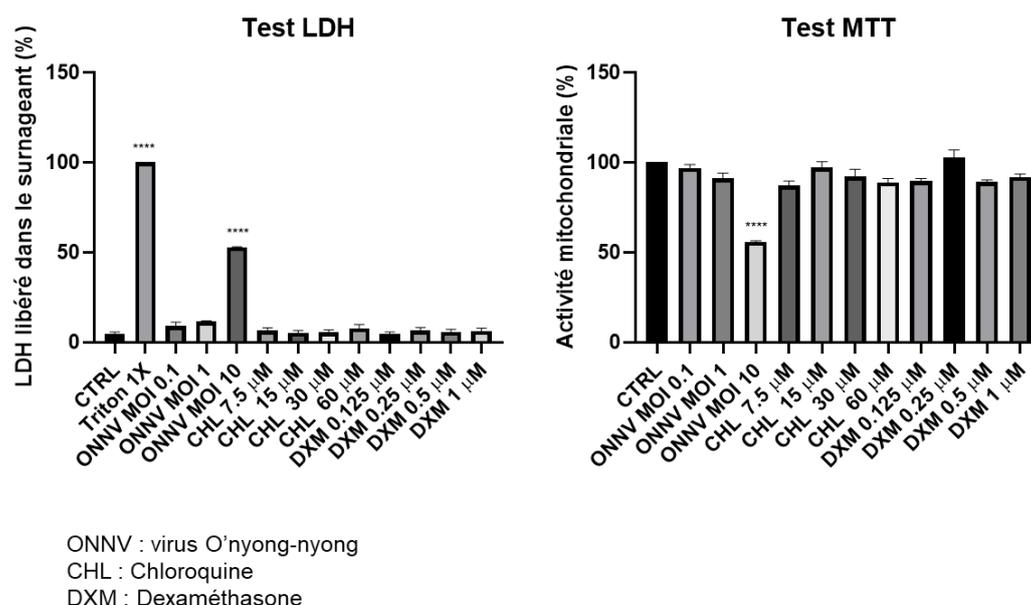
**Figure 18.** Caractérisation phénotypique des cellules HSF et HS633T.

(A) Observation de l'expression des différents marqueurs par immunofluorescence [bleu : noyau cellulaire ; vert : ONNV ; rouge : CD248, CD90, col1A ou  $\alpha$ -SMA, col1A] ; (B) Expression des gènes codant pour les différents marqueurs. [CTRL : cellules non infectées ; ONNV : cellules infectées ; col1A : collagène 1A et  $\alpha$ -SMA : alpha-smooth muscle actin]. ONNV MOI=0,1-10. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$  comparé aux cellules sMSC non infectées et non traitées (CTRL) ou # :  $p < 0,05$ , ## :  $p < 0,01$ , ### :  $p < 0,001$ , #### :  $p < 0,0001$  comparé aux cellules HS633T non infectées et non traitées (CTRL) ou \$ :  $p < 0,05$ , \$\$ :  $p < 0,01$ , \$\$\$ :  $p < 0,001$ , \$\$\$\$ :  $p < 0,0001$  comparé aux sMSC. (n=3, test de Bonferroni).

L'imagerie par immunofluorescence (**Fig. 18A**) révèle nettement l'expression des quatre marqueurs dans les cellules sMSC, mais elle n'est pas décelable dans les cellules HS633T. En revanche, les données de l'analyse par qRT-PCR (**Fig. 18B**) permettent de caractériser ces marqueurs dans les deux types cellulaires, à l'exception de CD90, uniquement exprimé dans les cellules HS633T.

## 2. Cytotoxicité

Afin de déterminer les conditions expérimentales pour la suite des expériences, une étude de toxicité a été conduite sur les cellules HS633T 24 h après exposition au ONNV (MOI 1 à 10), à la chloroquine (7,5-60  $\mu$ M) ou à la dexaméthasone (0,125-1  $\mu$ M) seuls, sur des gammes de concentrations utiles, antérieurement déterminées au laboratoire. Les cellules de référence sont des cellules non infectées et non traitées (CTRL). Les résultats des tests LDH et MTT sont présentés en **Figure 19**.



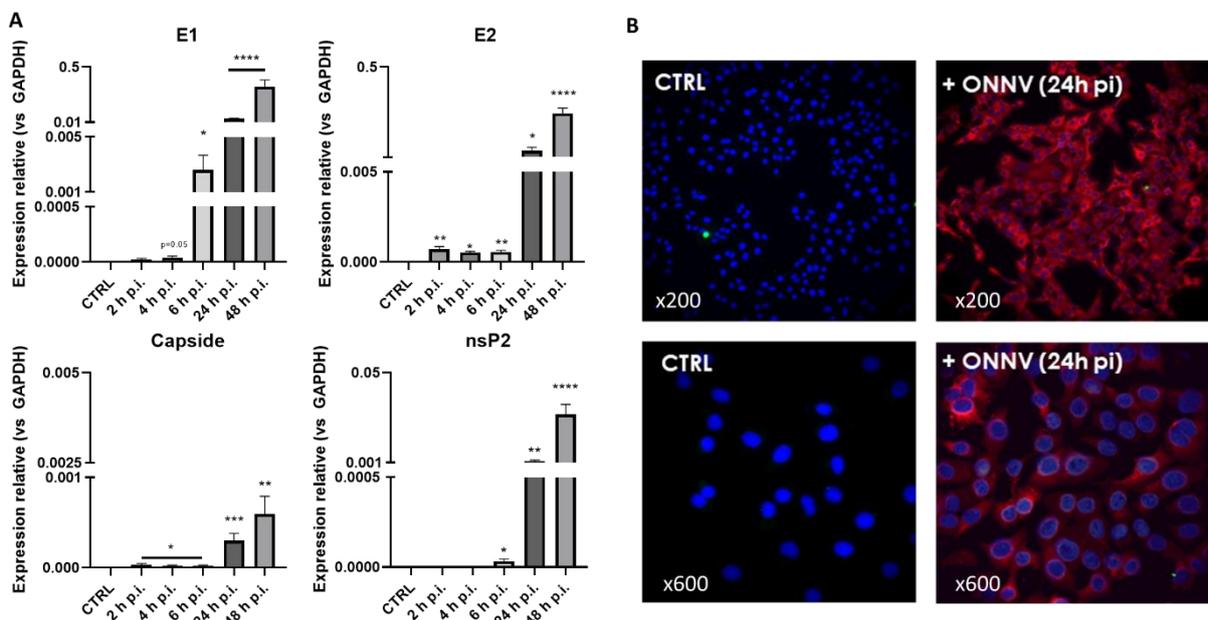
**Figure 19.** Viabilité des cellules HS633T infectées et/ou exposées aux traitements. Traitement seul, CHL 7,5-60  $\mu$ M ; ONNV MOI=1. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$  comparé aux cellules non infectées et non traitées (CTRL). (n=3, test de Bonferroni).

Les tests LDH et MTT révèlent que la viabilité des cellules infectées est affectée d'environ 50% pour la MOI 10 la plus élevée (\*\*\*\* :  $p < 0,0001$ ), alors qu'aucune toxicité significative n'est observée à MOI 1 ou 0,1. Sur des cellules non infectées, les traitements à la chloroquine et à la dexaméthasone n'ont présenté aucun effet significatif aux différentes concentrations appliquées. Pour la suite des expériences, ces résultats ont conduit à retenir la MOI 1 pour

l'infection des cellules par ONNV et des concentrations tolérables pour la chloroquine ( $\leq 60 \mu\text{M}$ ) et la dexaméthasone ( $\leq 1 \mu\text{M}$ ).

### 3. Cinétique d'infection

La cinétique d'infection des cellules HS633T par ONNV (MOI 1) a été étudiée en suivant les niveaux relatifs d'expression des gènes codants pour les protéines virales d'intérêt (E1, E2, capside et nsP2), par qRT-PCR de 2 à 48 h p.i. (**Fig. 20A**). Les cellules infectées ont été également observées par immunofluorescence (**Fig. 20B**), en utilisant un anticorps adapté (anticorps primaire : anticorps de souris anti-capside ; anticorps secondaire : anticorps de lapin anti-souris couplé au fluorochrome Alexa 594), par l'observation de la protéine capside virale (rouge), par rapport aux cellules non infectées (CTRL).



**Figure 20.** Infection des cellules HS633T par le virus O'nyong-nyong.

[bleu : noyau cellulaire ; rouge : ONNV ; CTRL : cellules non infectées et non traitées ; ONNV : cellules infectées]. Traitement et infection simultanés, CHL 7,5-60  $\mu\text{M}$  ; ONNV MOI=1. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$  comparé aux cellules non infectées et non traitées (CTRL). (n=3, test de Bonferroni).

Ces résultats démontrent la permissivité des cellules HS633T au ONNV, avec des niveaux d'expression significatifs dès 2 h p.i. pour les gènes codant pour E2 ( $7,07 \pm 0,41 \times 10^{-4}$ , \*\*:  $p < 0,01$ ) et pour la capside ( $5,60 \pm 1,24 \times 10^{-5}$ , \*:  $p < 0,05$ ). Une expression significative, pour tous les gènes viraux étudiés, est observée à partir de 6 h p.i. : E1 ( $2,61 \pm 1,50 \times 10^{-3}$ ,  $p < 0,05$ ), E2 ( $5,58 \pm 3,22 \times 10^{-4}$ ,  $p < 0,01$ ), capside ( $2,25 \pm 1,30 \times 10^{-5}$ ,  $p < 0,001$ ) et nsP2 ( $3,17 \pm 1,40 \times 10^{-5}$ ,  $p < 0,0001$ ). Ces niveaux d'expression sont plus importants à compter de 24 h p.i. : E1 ( $4,41 \pm$

$2,55 \times 10^{-2}$ ,  $p < 0,0001$ ), E2 ( $4,56 \pm 2,63 \times 10^{-2}$ ,  $p < 0,05$ ), capside ( $3,00 \pm 1,73 \times 10^{-4}$ ,  $p < 0,001$ ) et nsP2 ( $1,86 \pm 0,58 \times 10^{-3}$ ,  $p < 0,01$ ). Les résultats à 24 h p.i. sont confirmés par l'immunofluorescence.

#### 4. Réponse immunitaire

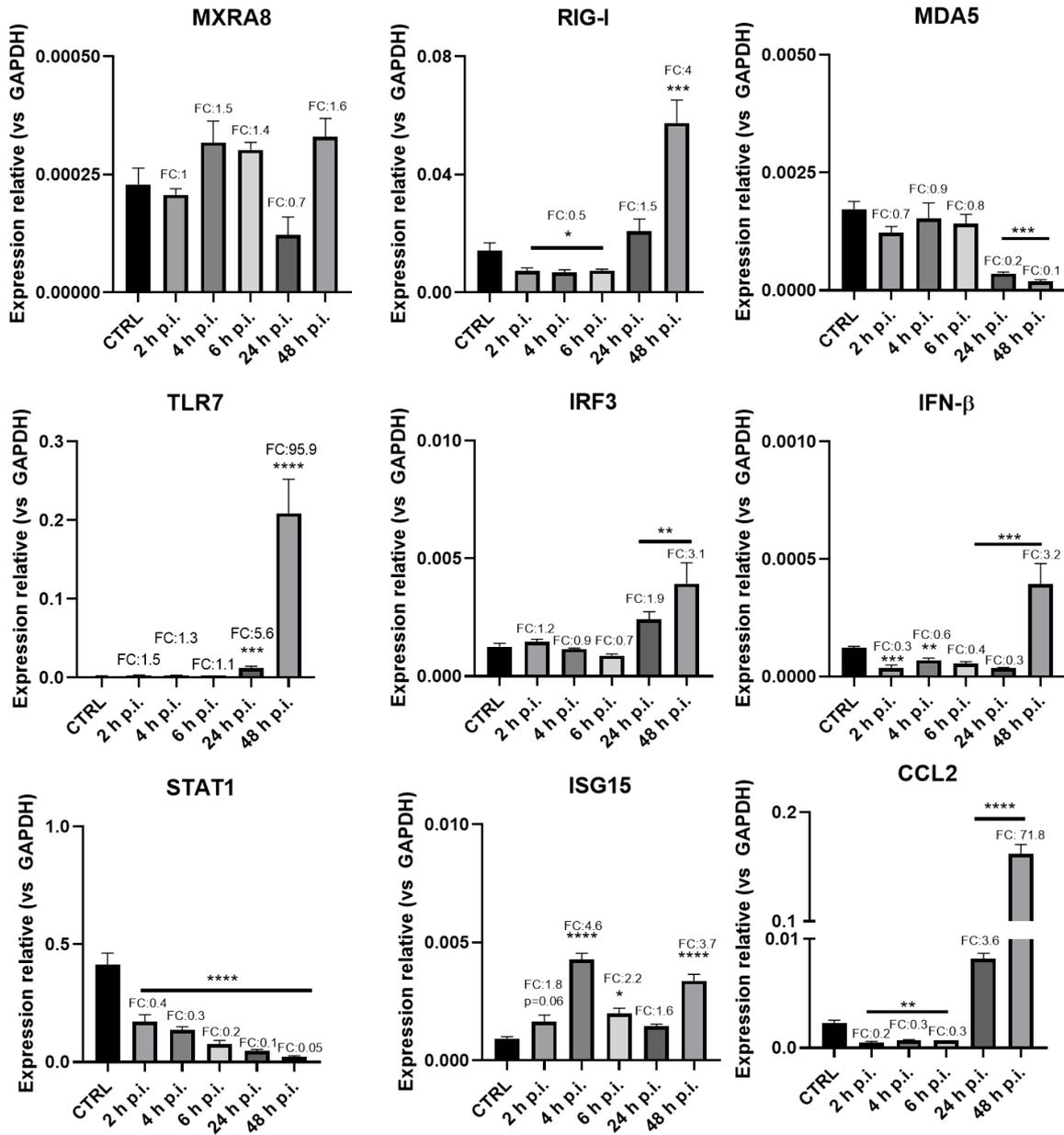
La réponse immunitaire, avec ses composantes antivirale et inflammatoire, est essentielle pour contrôler la réplication et la dissémination virale [51]. Afin de caractériser la réponse des cellules HS633T à l'infection par le ONNV (MOI 1), ont été étudiés les récepteurs impliqués dans la détection des alphavirus (MXRA8, RIG-I, MDA5 et TLR7), les composants de la réponse des IFNs de type 1 (IRF3, IFN- $\beta$ , STAT1 et ISG15), ainsi que le médiateur-clé de l'inflammation CCL2. Les niveaux d'expression génique de ces effecteurs immunitaires ont été suivis par des analyses qRT-PCR de 2 à 48 h p.i. et sont présentés en **Figure 21, ci-après**.

Le récepteur MXRA8 est habituellement impliqué dans la détection des alphavirus, mais les résultats non significatifs de son expression génique ne permettent pas de l'affirmer ici pour les cellules HS633T infectées par ONNV. Par rapport aux cellules non infectées, le niveau d'expression post-infection des autres récepteurs est significativement augmenté à partir de 24 h p.i. pour TLR7 (CTRL :  $2,18 \pm 0,126 \times 10^{-3}$ ; 24 h p.i. :  $1,22 \pm 0,22 \times 10^{-3}$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ , FC = 5,6 et 48 h p.i. :  $2,09 \pm 0,43 \times 10^{-1}$ , \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ , FC = 96) et à partir de 48 h p.i. pour RIG-I (CTRL :  $1,42 \pm 0,27 \times 10^{-2}$ ; 48 h p.i. :  $5,75 \pm 0,77 \times 10^{-2}$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ , FC = 4), alors que l'expression de MDA5 est significativement diminuée à partir de 24 h p.i. (CTRL :  $1,73 \pm 0,16 \times 10^{-3}$ ; 24 h p.i. :  $3,58 \pm 0,30 \times 10^{-4}$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ , FC = 0,2).

Pour la réponse IFNs de type 1, l'expression significative pour IRF3 n'est observée qu'à partir de 24 h p.i. (CTRL :  $1,25 \pm 0,14 \times 10^{-3}$ ; 24 h p.i. :  $2,42 \pm 0,32 \times 10^{-3}$ , \*\* :  $p < 0,01$ , FC = 1,9), avec un niveau plus élevé à 48 h p.i. ( $3,93 \pm 0,89 \times 10^{-3}$ , \*\* :  $p < 0,01$ , FC = 3,1). Pour IFN- $\beta$ , après une diminution du niveau d'expression de 2 à 6 h p.i. (CTRL :  $1,22 \pm 0,07 \times 10^{-4}$ ; 2 h :  $3,64 \pm 1,22 \times 10^{-5}$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ ; 4 h :  $6,92 \pm 0,89 \times 10^{-5}$ , \*\* :  $p < 0,01$  et 6 h :  $5,49 \pm 0,82 \times 10^{-5}$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ ), celui-ci augmente significativement à 48 h p.i. ( $3,94 \times 10^{-4} \pm 0,87 \times 10^{-4}$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ , FC = 3,2), par rapport au contrôle.

Enfin, le niveau d'expression pour STAT1 décroît de 2 à 48 h p.i. (CTRL :  $3,99 \pm 0,32 \times 10^{-1}$ ; 2 à 48 h p.i. : \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ , FC < 0,5), tandis que celui de ISG15 augmente de manière significative à 4 h p.i. (CTRL :  $9,20 \pm 0,82 \times 10^{-4}$ ; 4 h p.i. :  $4,28 \pm 0,26 \times 10^{-3}$ , \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ , FC = 4,6; 6 h p.i. :  $1,99 \pm 0,22 \times 10^{-3}$ , \* :  $p < 0,05$ , FC = 2,2 et 48 h p.i. ( $3,37 \pm 0,27 \times 10^{-3}$ , \*\*\*\* :

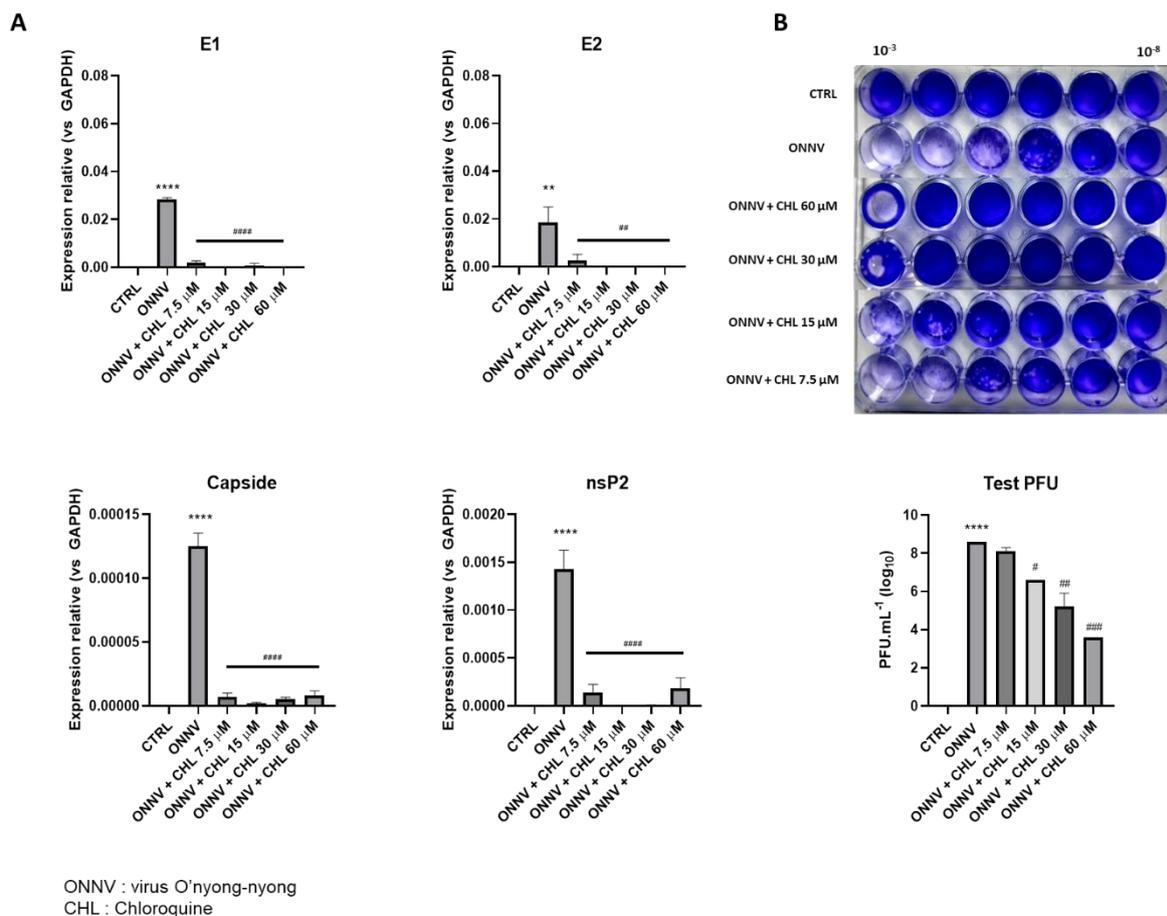
$p < 0,0001$ , FC = 3,7). La réponse inflammatoire, suivie au travers de l'expression du médiateur pro-inflammatoire CCL2, se traduit par une diminution significative de 2 à 6 h p.i. (CTRL :  $2,25 \pm 0,28 \times 10^{-3}$  ; 2 à 6 h p.i. : \*\* :  $p < 0,01$ , FC < 0,5), avant une augmentation significative à compter de 24 h p.i. (\*\*\*\* :  $p < 0,0001$ , FC = 3,6 et 72).



**Figure 21.** Niveaux d'expression des composants de la réponse immunitaire. Traitement et infection simultanés, CHL 7,5-60  $\mu$ M ; ONNV MOI=1. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$  comparé aux cellules non infectées et non traitées (CTRL). (n=3, test de Bonferroni).

## 5. Effets de la chloroquine

L'infection des cellules HS633T par ONNV ayant été établie, les effets de la chloroquine ont été examinés jusqu'à sa concentration maximale précédemment déterminée en cytotoxicité (**Fig. 19**). Les effets de la chloroquine ont été étudiés sur les cellules HS633T infectées par le ONNV (MOI 1) pendant 24 h, à partir des niveaux d'expression des gènes codant pour les protéines virales (E1, E2, capside et nsP2), par la méthode qRT-PCR et à partir de la quantification des particules virales produites dans le surnageant des cellules infectées (**Fig. 22**).



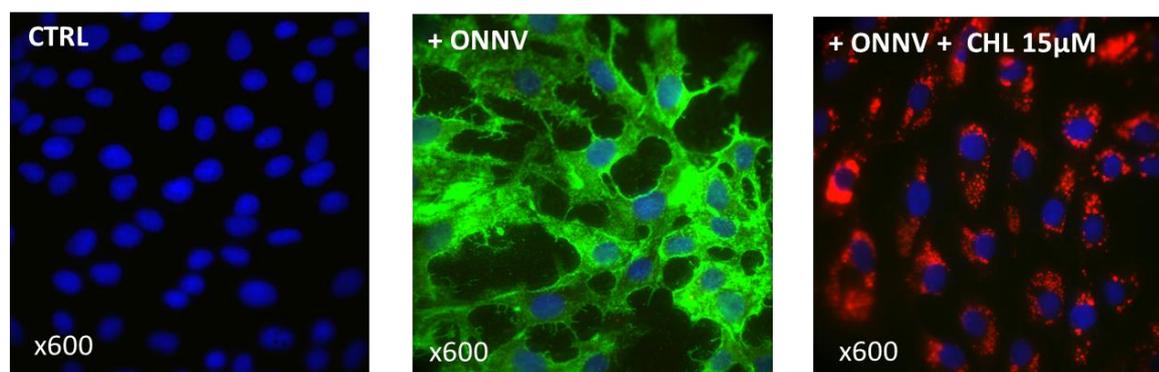
**Figure 22.** Inhibition virale par la chloroquine dans les cellules HS633T.

Traitement et infection simultanés, CHL 7,5-60 μM ; ONNV MOI=1. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$  comparé aux cellules non infectées et non traitées (CTRL). (n=3, test de Bonferroni).

Comme cela a été décrit par l'étude de la cinétique d'infection (**Fig. 20A**), les niveaux d'expression des gènes viraux dans cellules infectées (ONNV) sont élevés [(\*\* :  $p < 0,01$  pour E2 ( $1,87 \pm 1,08 \times 10^{-2}$ ) et \*\*\*\* :  $p < 0,0001$  pour E1 ( $2,82 \pm 1,64 \times 10^{-2}$ ), capside ( $1,25 \pm 0,72 \times 10^{-4}$ ) et nsP2 ( $1,43 \pm 0,19 \times 10^{-3}$ )], par comparaison avec les cellules non infectées (CTRL).

L'utilisation de la chloroquine conduit à un effet inhibiteur significatif dès la concentration de 7,5  $\mu\text{M}$ , pour tous les gènes viraux [(## :  $p < 0,01$  pour E2 ( $2,70 \pm 1,56 \times 10^{-3}$ ) ; ##### :  $p < 0,0001$  pour E1 ( $1,81 \pm 1,05 \times 10^{-3}$ ), capsid ( $7,17 \pm 4,14 \times 10^{-6}$ ) et nsP2 ( $1,37 \pm 0,85 \times 10^{-4}$ )]. Le traitement chimique affecte la production de virions, initialement d'environ  $4 \times 10^8$  PFU.mL<sup>-1</sup> (##### :  $p < 0,0001$ ), pour les cellules infectées et non traitées (ONNV) : elle est réduite de  $4 \times 10^6$  PFU.mL<sup>-1</sup> jusqu'à  $4 \times 10^3$  PFU.mL<sup>-1</sup> par le traitement à la chloroquine à 15  $\mu\text{M}$  ( $4,00 \times 10^6$ , # :  $p < 0,05$ ), 30  $\mu\text{M}$  ( $4,18 \pm 3,82 \times 10^5$ , ## :  $p < 0,01$ ) et 60  $\mu\text{M}$  ( $4,00 \times 10^3$ , ### :  $p < 0,001$ ).

Le mode d'action de la chloroquine a été décrit par l'augmentation du pH intracellulaire qu'elle induit et l'accumulation des autophagosomes révélée par l'augmentation de l'expression de LC3 [258]. L'expression de ce marqueur a été analysée, dans notre cas, par immunofluorescence à 24 h p.i., sur les cellules HS633T infectées par le ONNV (MOI 1) et traitées à la chloroquine (15  $\mu\text{M}$ ). Les résultats sont présentés en **Figure 23**.



CTRL : cellules non traitées et non infectées

+ ONNV : cellules infectées avec ONNV

+ ONNV + CHL 15  $\mu\text{M}$  : cellules infectées avec ONNV et traitées à la chloroquine à 15  $\mu\text{M}$

**Figure 23.** Immunofluorescence du marqueur LC3 dans les cellules HS633T. [bleu : noyau cellulaire ; vert : ONNV ; rouge : LC3].

Par rapport aux cellules non infectées et non-traitées (CTRL), uniquement avec les noyaux cellulaires (couleur bleue), l'infection est nettement visible (couleur verte) dans les cellules infectées (+ ONNV). Par rapport aux cellules infectées et non traitées (+ ONNV), le traitement à la chloroquine (+ ONNV + CQ 15  $\mu\text{M}$ ) révèle une diminution de l'infection et l'augmentation de l'expression du marqueur LC3 (couleur rouge). Ces données indiquent que le mode d'action particulier de la chloroquine, qui favorise l'accumulation intracellulaire des autophagosomes, est également opérant dans les cellules HS633T infectées par le ONNV.

Les effets immunomodulateurs de la chloroquine ont été évalués sur l'expression des gènes codant pour les récepteurs (MxRa8, RIG-I, MDA5 et TLR7), les effecteurs de la réponse des IFN de type 1 (IRF3, IFN- $\beta$ , STAT1 et ISG15) et le médiateur pro-inflammatoire CCL2 précédemment étudiés (**Fig. 24, ci-après**).

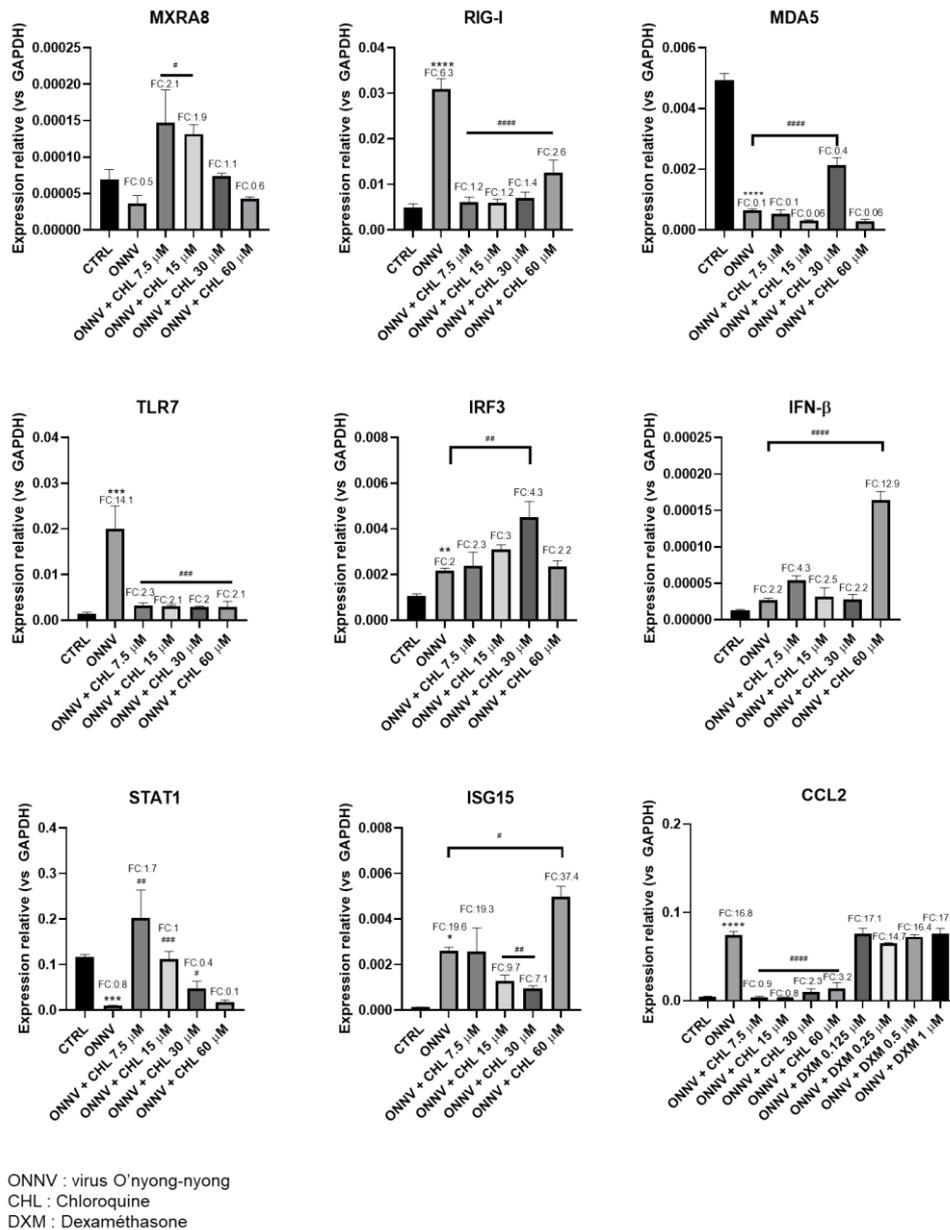
Par rapport aux cellules non infectées et non traitées (CTRL), l'expression génique des récepteurs impliqués dans la détection virale est significativement augmentée dans les cellules infectées (ONNV), pour RIG-I (CTRL :  $4,91 \pm 0,82 \times 10^{-3}$ ; ONNV :  $3,09 \pm 0,23 \times 10^{-2}$ , \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ , FC = 6,3) et TLR7 (CTRL :  $1,43 \pm 0,33 \times 10^{-3}$ ; ONNV :  $2,01 \pm 0,49 \times 10^{-2}$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ , FC = 14,7), mais diminuée pour MDA5 (CTRL :  $4,93 \pm 0,22 \times 10^{-3}$ ; ONNV :  $6,58 \pm 0,39 \times 10^{-4}$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ ).

Par rapport aux cellules infectées et non traitées (CTRL :  $5,17 \pm 0,49 \times 10^{-5}$ ), le traitement aux deux plus faibles concentrations de chloroquine augmente significativement le niveau d'expression de MXRA8, de deux fois par rapport aux cellules non infectées et non traitées (FC = 2) (7,5  $\mu$ M :  $1,14 \pm 0,45 \times 10^{-4}$ , # :  $p < 0,05$ ; 15  $\mu$ M :  $1,32 \pm 0,13 \times 10^{-4}$ , # :  $p < 0,05$ ). L'effet remarquable de la chloroquine se manifeste également par la diminution des niveaux d'expression de RIG-I (##### :  $p < 0,0001$ ,  $1,2 < FC < 2,6$ ) et TLR7 (### :  $p < 0,001$ ,  $2 < FC < 2,3$ ) quelle que soit la concentration utilisée, et par l'augmentation significative du niveau d'expression de MDA5, à la concentration de 30  $\mu$ M ( $2,13 \pm 0,26 \times 10^{-3}$ ,  $p < 0,0001$ , FC = 0,4).

Pour les effecteurs de la réponse antivirale, les données illustrent une augmentation significative du niveau d'expression de IRF3 (CTRL :  $1,05 \pm 0,10 \times 10^{-3}$ ; ONNV :  $2,16 \pm 0,12 \times 10^{-3}$ , \*\* :  $p < 0,01$ , FC = 2) et de ISG15 (CTRL :  $1,33 \pm 0,06 \times 10^{-4}$ ; ONNV :  $2,61 \pm 0,15 \times 10^{-3}$ , \* :  $p < 0,05$ , FC = 19,6) et une diminution du niveau d'expression de STAT1 (CTRL :  $1,71 \pm 0,06 \times 10^{-1}$ ; ONNV :  $9,62 \pm 0,81 \times 10^{-3}$ ,  $p=0,07$ , FC < 1), dans les cellules infectées (ONNV), par rapport aux cellules non infectées (CTRL).

L'effet de la chloroquine est marqué par l'augmentation des niveaux d'expression de IRF3 (## :  $p < 0,01$ , FC > 2), IFN- $\beta$  (### :  $p < 0,001$ , FC = 13) et ISG15 (# :  $p < 0,05$ , FC = 37,4) pour une concentration supérieure ou égale à 30  $\mu$ M, tout comme celle de STAT1 à la concentration la plus faible de 7,5  $\mu$ M ( $2,03 \pm 0,61 \times 10^{-1}$ , ## :  $p < 0,01$ , FC = 1,7) et une diminution aux concentrations intermédiaires de 15  $\mu$ M ( $1,12 \pm 0,17 \times 10^{-1}$ , #### :  $p < 0,001$ , FC = 1) et 30  $\mu$ M ( $4,78 \pm 1,58 \times 10^{-2}$ , # :  $p < 0,05$ , FC < 0,5).

Un potentiel effet anti-inflammatoire de la chloroquine a été enfin examiné, en analysant les niveaux d'expression génique du marqueur CCL2, par qRT-PCR, sur les cellules HS633T infectées par le ONNV (MOI 1) et en utilisant la dexaméthasone pour une activité anti-inflammatoire de référence (**Fig. 24, ci-après**). Par rapport aux cellules non infectées et non traitées (CTRL), l'infection par le ONNV augmente le niveau d'expression de CCL2 (CTRL :  $4,43 \pm 0,89 \times 10^{-3}$ ; ONNV :  $7,45 \pm 0,41 \times 10^{-4}$ , \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ , FC = 17) et la chloroquine exerce un effet inhibiteur, dès la plus faible concentration de 7,5  $\mu\text{M}$  ( $4,06 \pm 0,94 \times 10^{-3}$ , ##### :  $p < 0,0001$ , FC < 3). En revanche, aucun effet significatif n'est observé pour la dexaméthasone, quelle que soit la concentration appliquée (0,125-1  $\mu\text{M}$ ).



**Figure 24.** Effets antiviral et immunomodulateur de la chloroquine. Traitement et infection simultanés, CHL 7,5-60  $\mu$ M ; ONNV MOI=1. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$  comparé aux cellules non infectées et non traitées (CTRL). (n=3, test de Bonferroni).

### III. Discussion

La caractérisation de principes actifs contre les alphavirus arthritogéniques nécessite des modèles biologiques robustes. Pour l'élaboration d'un modèle *in vitro* pour l'infection par ONNV, les cellules HS633T ont été envisagées par rapport au tropisme des alphavirus arthritogéniques pour les fibroblastes [32,34].

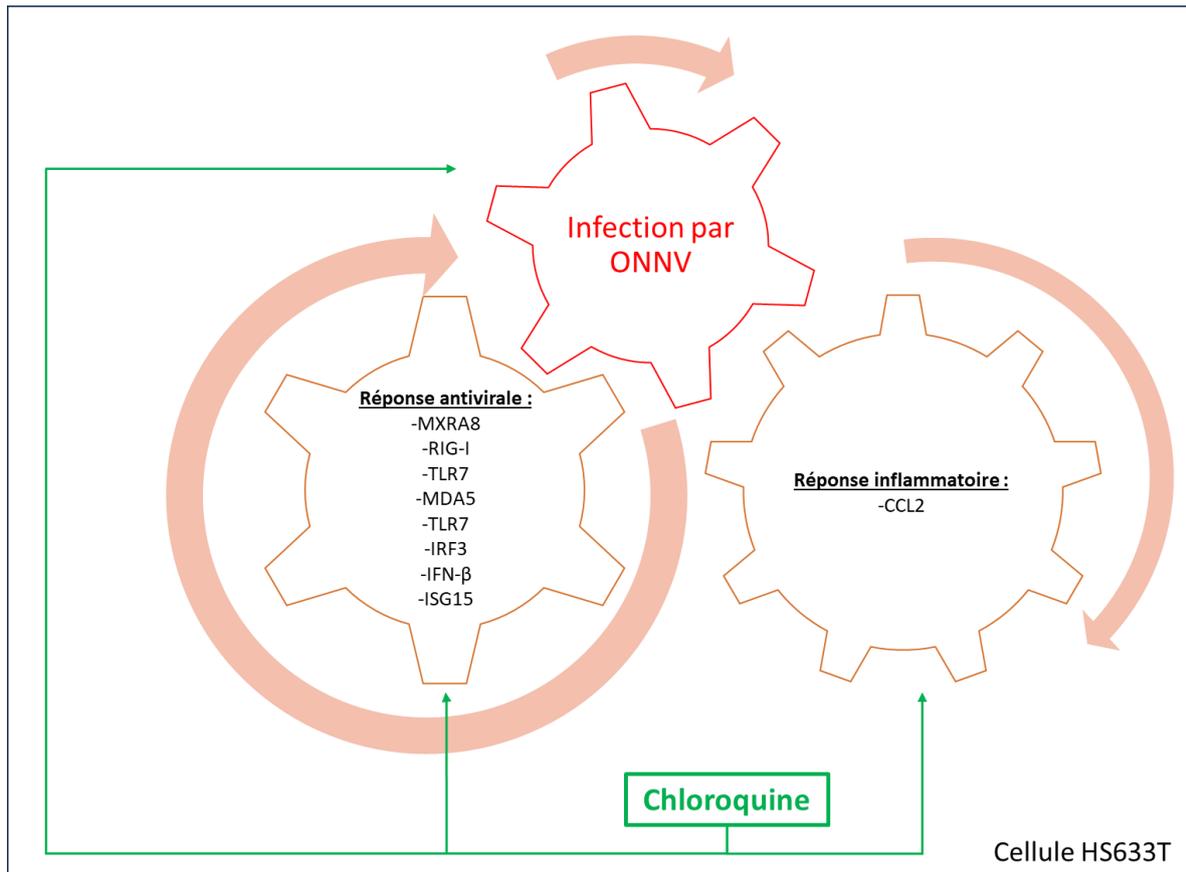
La permissivité des cellules HS633T au CHIKV a été antérieurement décrite [101]. La permissivité des cellules HS633T au ONNV a été comparée à celle des cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu synovial (sMSC) (**Fig. 17**), puis le phénotype des cellules HS633T a été comparé à celui des cellules sMSC (**Fig.18**). Les résultats révèlent une permissivité plus faible des cellules HS633T à ONNV que celle des sMSC. Les cellules HS633T expriment les mêmes marqueurs que les cellules sMSC, ce qui confirme leur origine à partir des cellules MSC. Ces résultats permettent de valider les cellules HS633T comme un modèle cellulaire fiable pour l'évaluation *in vitro* de molécules anti-alphavirales. Les résultats de la cinétique d'infection des cellules HS633T par le ONNV (MOI 1) confirment une permissivité avec un niveau d'expression de gènes viraux déjà significatif à 2 h p.i., notamment pour la protéine-clé E2 qui favorise l'entrée des alphavirus [23] (**Fig. 20A**). L'infection est clairement révélée au bout de 24 h p.i., par l'expression significative de tous les gènes viraux étudiés (E1, E2, capsid, nsP2) et confirmée par l'observation des cellules en immunofluorescence (**Fig. 20B**).

La réponse immunitaire face à l'infection a été suivie au travers de l'expression génique des récepteurs et effecteurs antiviraux, ainsi que du médiateur pro-inflammatoire CCL2. Pour la détection du ONNV par les cellules HS633T, les données ne permettent pas d'établir ici un rôle particulier du récepteur MXRA8, pourtant récemment identifié pour différents alphavirus (CHIKV, ONNV, RRV, MAYV) [46,47]. En revanche, l'implication des récepteurs RIG-I et TLR7 [42,51] est démontrée avec des niveaux d'expression significatifs, respectivement à compter de 24 et 48 h p.i., alors que l'expression du récepteur MDA5 est significativement diminuée à partir de 24 h p.i. (**Fig. 21**). L'augmentation de l'expression de RIG-I est conforme à l'activation de la voie des IFNs de type 1, déjà décrite pour ONNV *in vivo* dans un modèle souris [56]. La mobilisation de la voie des IFNs de type 1 est caractérisée ici par l'augmentation significative des niveaux d'expression pour IRF3 à compter de 24 h p.i., pour IFN- $\beta$ , à 48 h p.i. et pour ISG15, à compter de 4 h p.i.. En revanche, le niveau d'expression pour STAT1, en diminution progressive à compter de 2 h p.i., pourrait indiquer une stratégie d'échappement immunitaire de ONNV, comme cela a été déjà établi pour d'autres alphavirus, tels que le VEEV [259], le CHIKV, le SFV et le SINV [25,97,101,260]. Toutefois, cette observation pour STAT1 n'est pas corrélée avec les niveaux de ISG15. Ce constat peut illustrer la diversité des mécanismes cellulaires impliqués dans l'expression des ISGs et notamment celle de ISG15 [261]. La signalisation pour une réponse inflammatoire développée par les cellules HS633T est

confirmée par les niveaux d'expression relativement élevés pour CCL2, à compter de 24 h p.i. (**Fig. 21**).

Dans les conditions expérimentales ainsi déterminées (MOI 1 et analyses à 24 h p.i.), la chloroquine a été envisagée comme modèle de molécule antivirale et immunomodulatrice contre l'infection des cellules HS633T par ONNV, sans toxicité pour la gamme de concentrations testées (7,5-60  $\mu$ M). L'activité antivirale de la chloroquine a été observée dès la plus faible concentration utilisée, par l'inhibition de l'expression des gènes viraux (**Fig. 22A**) et de la production de nouveaux virions (**Fig. 22B**). Ces résultats suggèrent un mode d'action de la chloroquine après l'entrée du virus dans les cellules, comme le confirme le suivi du marqueur LC3 (**Fig. 23**). La chloroquine permet également de réguler la détection et la réponse antivirale comme l'indique la diminution des niveaux d'expression des récepteurs et effecteurs cellulaires (**Fig. 24**). De manière remarquable, la chloroquine favorise l'expression génique du facteur de transcription STAT1 qui était abaissée par l'infection. Ainsi, la restauration de l'expression de STAT1 par la chloroquine pourrait favoriser la réponse cellulaire antivirale, notamment au travers de la réponse des IFNs de type 1 et la production de diverses ISGs, autres que ISG15. L'activité antivirale de la chloroquine a été également reliée au mécanisme d'autophagie en suivant l'expression du marqueur LC3, qui traduit l'accumulation d'autophagosomes intracellulaires (**Fig. 23**) déjà établie antérieurement [108]. L'activité antivirale de la chloroquine est avantageusement complétée par une activité anti-inflammatoire, qui est observée par la régulation de l'expression génique du médiateur pro-inflammatoire CCL2 (**Fig. 24**). La dexaméthasone, glucocorticoïde synthétique, a été envisagée pour sa capacité à réguler les voies de l'inflammation et la production de médiateurs inflammatoires [262]. Toutefois, elle n'a pas d'activité anti-inflammatoire décelable sur le niveau d'expression de CCL2 à une concentration (1  $\mu$ M), pourtant antérieurement décrite comme efficace dans un modèle *in vitro* d'infection par alphavirus (culture primaire de fibroblaste stimulée avec le PIC) [263].

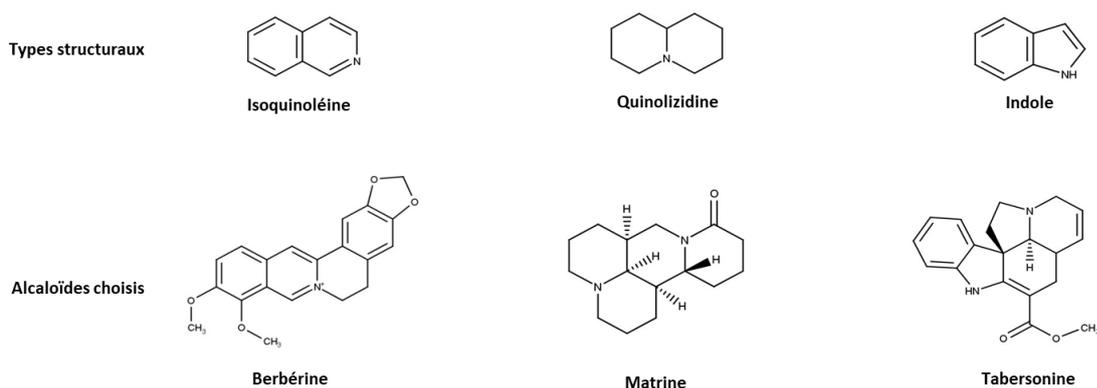
Ces résultats ont permis d'établir l'origine des cellules HS633T à partir de cellules souches mésenchymateuses, leur permissivité à ONNV, le développement d'une réponse antivirale et inflammatoire relativement tardive ( $\geq$  24 h p.i.) de ces mêmes cellules et le contrôle possible de l'infection par la chloroquine à différents niveaux, comme cela est représenté en **Figure 25, ci-après**. Cette étude a ainsi permis de structurer un cadre pour l'évaluation biologique de substances naturelles, qui a été envisagée par la suite.



**Figure 25.** Effet de la chloroquine sur les réponses immunitaires des cellules HS633T contre l'infection par le virus O'nyong-nyong.

# Chapitre 4. Évaluation *in vitro* du potentiel anti-alphaviral d'alcaloïdes-types (berbérine, matrine et tabersonine)<sup>3</sup>

Le potentiel anti-alphaviral des alcaloïdes a été précédemment discuté (**Chapitre 2**) au travers des activités antivirales et immunomodulatrices de trois classes structurales (isoquinoléines, quinolizidines, indoles) dans différents contextes physiopathologiques. Pour vérifier cette hypothèse, trois composés représentatifs de chacune de ces trois classes, respectivement la berbérine, la matrine et la tabersonine (**Fig. 26**), ont été évalués avec le modèle *in vitro* précédemment développé (**Chapitre 3**).



**Figure 26.** Types structuraux des classes d'alcaloïdes sélectionnées et alcaloïdes-types.

## I. Approche expérimentale

La non cytotoxicité des trois alcaloïdes-types pour les cellules HS633T a d'abord été vérifiée par les tests LDH et MTT, pour une concentration de 10  $\mu\text{M}$ , tout comme celle de la chloroquine

<sup>3</sup> Publication associée : Sandenon Seteyen AL, Guiraud P, Gasque P, Girard-Valenciennes E, Sélambarom J. In Vitro Analyses of the Multifocal Effects of Natural Alkaloids Berberine, Matrine, and Tabersonine against the O'nyong-nyong Arthritogenic Alphavirus Infection and Inflammation. *Pharmaceuticals* (Basel). 2023 Aug 9;16(8):1125. <https://doi.org/10.3390/ph1608112>

à 15  $\mu\text{M}$ , utilisée comme référence. Ces composés ont été ensuite appliqués en co-traitement, durant 24 h aux cellules HS633T infectées par le ONNV (MOI 1).

L'activité antivirale des composés a été déterminée par la mesure de l'expression des gènes codant pour les protéines virales (E1, E2, nsP2 et capside), avec la méthode qRT-PCR et la quantification des nouveaux virions, produits par la méthode de réduction des plages de lyse. La modulation de la réponse antivirale de la cellule-hôte a été également étudiée au travers l'expression génique des récepteurs (MXRA8 et RIG-I), des composants de la voie des interférons de type 1 (IRF3, IFN- $\beta$ , STAT1 et ISG15), mais aussi des facteurs de l'autophagie (PI3K et AMPK) qui interviennent dans le contrôle de l'infection virale.

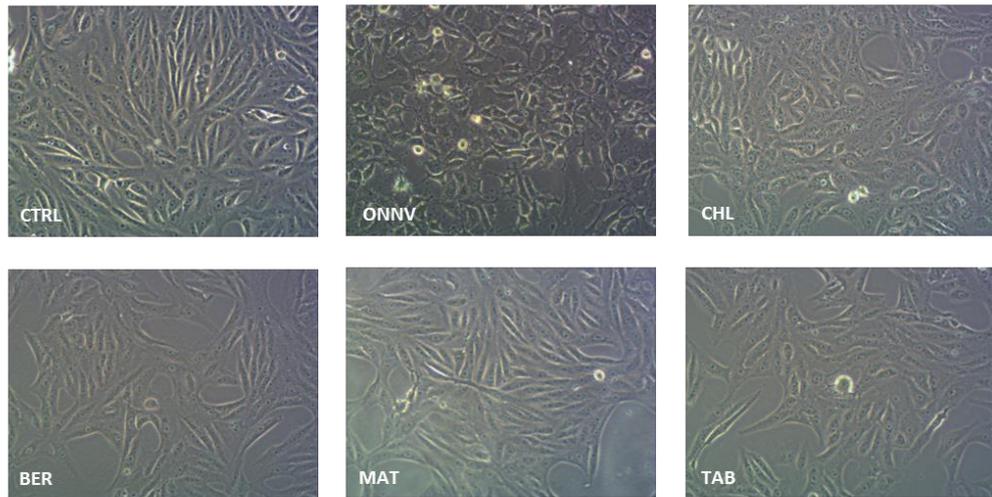
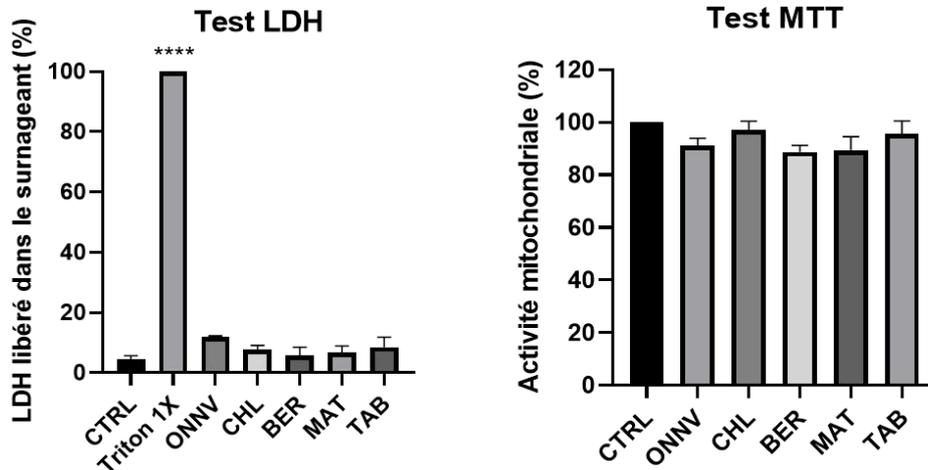
L'activité anti-inflammatoire des trois alcaloïdes-types a enfin été étudiée en mesurant les niveaux d'expression génique et/ou protéique des médiateurs de l'inflammation (CCL2, CCL5, CXCL8 et TNF- $\alpha$ ), ainsi que l'expression génique des différents composants des voies de l'inflammation habituellement mobilisées par les alphavirus (NF- $\kappa\text{B}$ , MAPK, STAT3, NRLP3, Caspase-1 et COX-2).

Les résultats des expériences sont présentés comme la moyenne de trois expériences indépendantes avec l'écart-type de la moyenne. La valeur  $p$  a été calculée en utilisant le test Bonferroni de comparaison multiple par rapport aux cellules non infectées et non traitées (CTRL) [\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$ , \*\*\*\* :  $p < 0.0001$ ] ou par rapport aux cellules infectées (ONNV) [# :  $p < 0.05$ , ## :  $p < 0.01$ , ### :  $p < 0.001$ , #### :  $p < 0.0001$ ]. Les variations relatives des niveaux d'expression (FC : *fold change*) ont été calculées par rapport aux cellules non infectées et non traitées (CTRL).

## II. Résultats

### 1. Cytotoxicité

L'étude de cytotoxicité a été réalisée par exposition des cellules HS633T pendant 24 h, soit au ONNV (MOI 1), soit à la chloroquine (15  $\mu\text{M}$ ), soit encore à chacun des trois alcaloïdes-types (10  $\mu\text{M}$ ). Les cellules de référence sont des cellules non infectées et non traitées (CTRL). La toxicité des traitements sur les cellules a été suivie au microscope et par les tests LDH et MTT, avec les résultats présentés en **Figure 27, ci-après**.

**A****B**

CTRL : cellules non infectées et non traitées  
 ONNV : cellules infectées et non traitées  
 CHL : cellules infectées et traitées à la chloroquine à 15  $\mu$ M  
 BER : cellules infectées et traitées à la berbérine à 10  $\mu$ M  
 MAT : cellules infectées et traitées à la matrine à 10  $\mu$ M  
 TAB : cellules infectées et traitées à la tabersonine à 10  $\mu$ M

**Figure 27.** Viabilité des cellules HS633T après infection par ONNV seul ou en co- traitement avec les alcaloïdes.

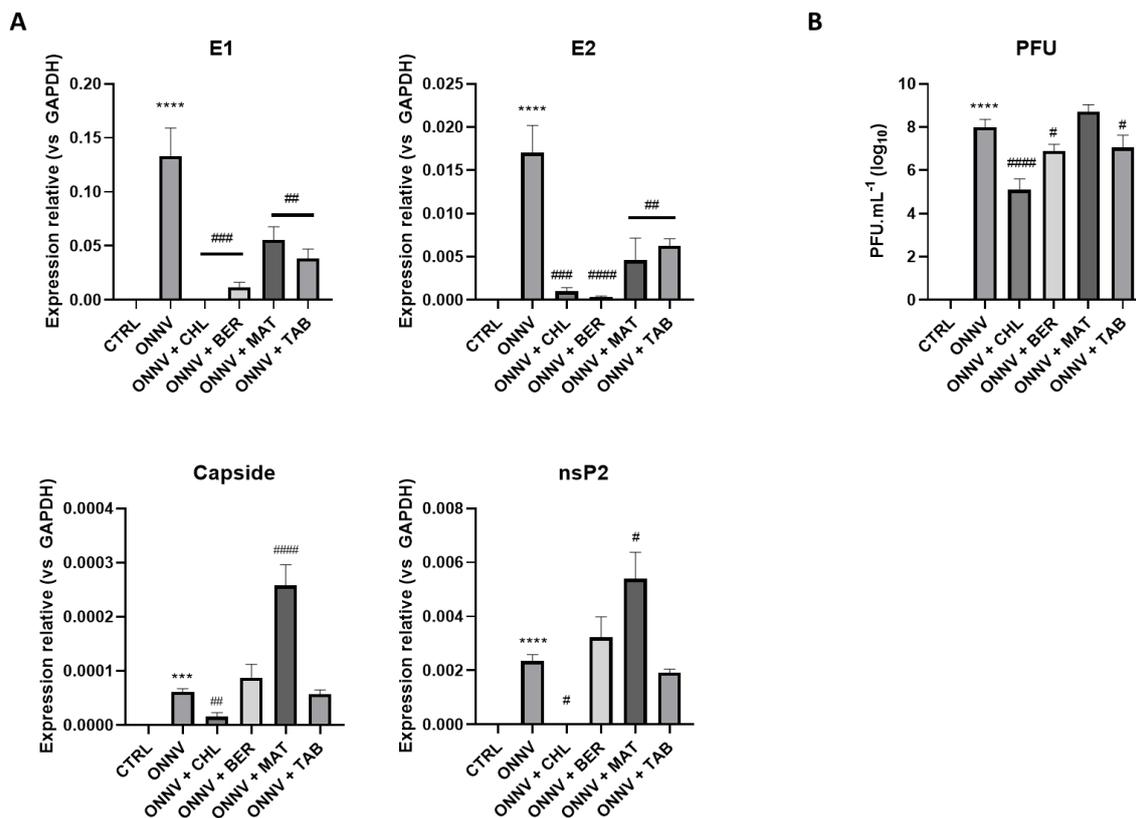
(A) observation microscopique ( $\times 200$ ) ; (B) : tests colorimétriques. Traitement et infection simultanés, CHL 15  $\mu$ M ; BER, MAT et TAB 10  $\mu$ M ; ONNV MOI=1. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$  comparé aux cellules non infectées et non traitées (CTRL). (n=3, test de Bonferroni).

L'observation au microscope (**Fig. 27A**) révèle un changement morphologique des cellules infectées (ONNV), par rapport aux cellules de contrôle ou traitées (CTRL) et aucune mort cellulaire n'est révélée dans toutes les conditions appliquées. Les résultats des tests de toxicité ont confirmé ces observations, par des niveaux comparables de LDH libéré dans le surnageant

et une activité mitochondriale qui n'est pas affectée, après infection ou traitement par rapport aux cellules-contrôles (CTRL) (**Fig. 27B**). Les expériences qui suivent ont été alors réalisées avec le rapport virus/cellules égal à 1 (MOI 1, soit un virus pour une cellule) et une concentration de 10  $\mu\text{M}$  pour chacun des trois alcaloïdes-types. A partir des données obtenues dans le chapitre précédent (**Chapitre 3**), la concentration choisie pour la chloroquine est de 15  $\mu\text{M}$ . Cette concentration est la plus faible ayant permis d'obtenir des résultats pertinents.

## 2. Réduction de l'infection

Dans les conditions précédemment énoncées et en utilisant la chloroquine comme molécule antivirale et immunomodulatrice de référence, les effets de la berbérine, de la matrine et de la tabersonine ont été étudiés sur l'expression des gènes viraux, par analyses qRT-PCR (**Fig. 28A**) et la production de nouveaux virions, par dénombrement des plages de lyse (**Fig. 28B**).



**Figure 28.** Réduction de l'infection par les alcaloïdes.

(A) Effet sur l'expression des gènes viraux ; (B) Effet sur la production de nouveaux virions. Traitement et infection simultanés, CHL 15  $\mu\text{M}$  ; BER, MAT et TAB 10  $\mu\text{M}$  ; ONNV MOI=1. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$  comparé aux cellules non infectées et non traitées (CTRL) ou #:  $p < 0,05$ , ##:  $p < 0,01$ , ###:  $p < 0,001$ , ####:  $p < 0,0001$  comparé aux cellules infectées (ONNV). (n=3, test de Bonferroni).

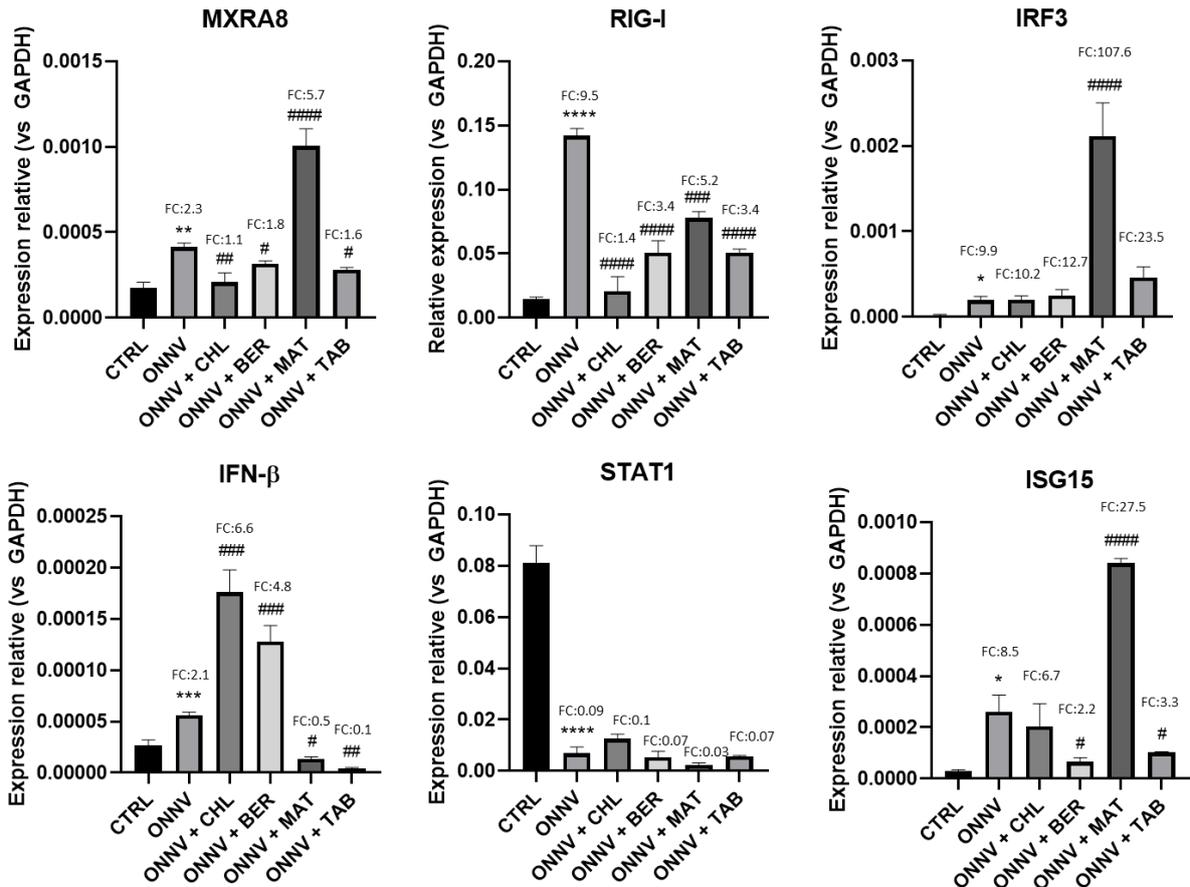
Comme il a été précédemment établi (**Fig. 20**), les cellules HS633T sont infectées au bout de 24 h (**Fig. 28A**), avec une expression significative des gènes viraux par rapport aux cellules-contrôle (CTRL) et sur des niveaux plus élevés pour E1 et E2 (E1 :  $1,33 \pm 0,77 \times 10^{-1}$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$  ; E2 :  $1,70 \pm 0,98 \times 10^{-2}$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ ; capsid :  $6,13 \pm 3,54 \times 10^{-5}$ , \*\*\*:  $p < 0,0001$  et nsP2 :  $2,35 \pm 0,24 \times 10^{-3}$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ).

Par rapport aux cellules infectées et non traitées (ONNV), la chloroquine exerce un effet remarquable sur les quatre gènes viraux dont l'expression est significativement réduite (E1 :  $3,76 \pm 2,17 \times 10^{-4}$ , ### :  $p < 0,001$  ; E2 :  $1,00 \pm 0,58 \times 10^{-3}$ , ### :  $p < 0,001$ ; capsid :  $1,60 \pm 0,92 \times 10^{-5}$ , ## :  $p < 0,01$  et nsP2 :  $7,57 \pm 5,62 \times 10^{-6}$ , # :  $p < 0,05$ ). La berbérine, la matrine et la tabersonine ne réduisent, de manière significative, que l'expression des deux gènes codant pour les protéines E1 (berbérine :  $1,18 \pm 0,68 \times 10^{-2}$ , ### :  $p < 0,001$  ; matrine :  $5,57 \pm 3,21 \times 10^{-2}$ , ## :  $p < 0,01$  ; tabersonine :  $3,86 \pm 2,23 \times 10^{-2}$ , ## :  $p < 0,01$ ) et E2 (berbérine :  $3,35 \pm 1,93 \times 10^{-4}$ , ##### :  $p < 0,0001$  ; matrine :  $4,59 \pm 2,65 \times 10^{-3}$ , ## :  $p < 0,01$  ; tabersonine :  $6,26 \pm 3,61 \times 10^{-3}$ , ## :  $p < 0,01$ ). En revanche, la matrine augmente le niveau d'expression des gènes codant pour la protéine capsid ( $2,58 \pm 1,49 \times 10^{-4}$ , ##### :  $p < 0,0001$ ) et pour la protéine nsP2, ( $5,40 \pm 0,98 \times 10^{-3}$ , # :  $p < 0,05$ ). Les effets inhibiteurs de la chloroquine, la berbérine et la tabersonine se révèlent également par la réduction des plages de lyse, contrairement à la matrine (**Fig. 28B**). Par rapport aux cellules infectées et non traitées (ONNV :  $1,20 \pm 0,46 \times 10^8$  PFU.mL<sup>-1</sup>, \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ), une réduction de l'ordre de  $10^4$  est observée avec la chloroquine ( $8,21 \pm 2,13 \times 10^4$  PFU.mL<sup>-1</sup>, ##### :  $p < 0,0001$ ), de  $10^2$  avec la berbérine ( $9,33 \pm 3,53 \times 10^6$  PFU.mL<sup>-1</sup>, # :  $p < 0,05$ ) et de  $10^1$  avec la tabersonine ( $1,68 \pm 0,72 \times 10^7$  PFU.mL<sup>-1</sup>, # :  $p < 0,05$ ).

### 3. Effets sur la réponse antivirale de la cellule-hôte.

Les effets des trois alcaloïdes-types, sur la réponse antivirale développée par les cellules HS633T, ont été analysés au travers de l'expression génique des récepteurs cellulaires (MXRA8 et RIG-I) et des composants de la voie des IFNs de type 1 (IRF3, IFN- $\beta$ , STAT1 et ISG15), qui ont été précédemment étudiés dans le modèle de l'infection (**Fig. 21**). Les résultats des analyses qRT-PCR sont présentés en **Figure 29, ci-après**.

Par rapport aux cellules-contrôles non infectées et non traitées (CTRL), l'infection par ONNV augmente de manière significative l'expression des gènes codant pour MXRA8 (CTRL :  $1,75 \pm 0,33 \times 10^{-4}$  ; ONNV :  $4,13 \pm 0,24 \times 10^{-4}$ , \*\*:  $p < 0,01$ , FC = 2,3) et pour RIG-I (CTRL :  $1,49 \pm 0,13 \times 10^{-2}$  ; ONNV :  $1,42 \pm 0,05 \times 10^{-1}$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ , FC = 9,5).



**Figure 29. Effets des alcaloïdes sur les composants immunitaires antiviraux.**

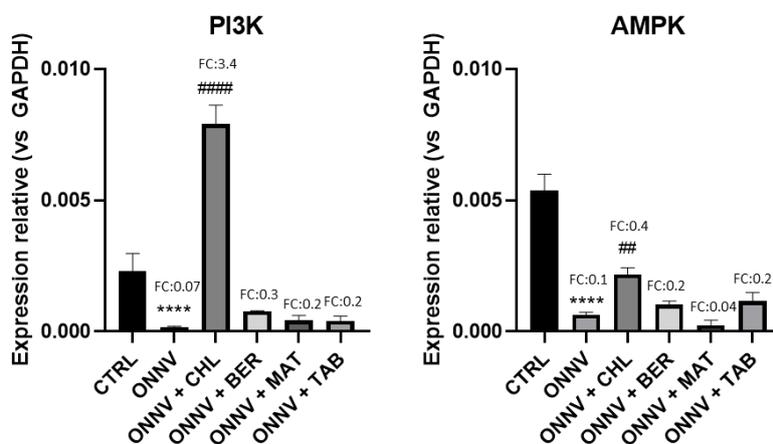
Traitement et infection simultanés, CHL 15  $\mu\text{M}$  ; BER, MAT et TAB 10  $\mu\text{M}$  ; ONNV MOI=1. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$  comparé aux cellules non infectées et non traitées (CTRL) ou # :  $p < 0,05$ , ## :  $p < 0,01$ , ### :  $p < 0,001$ , #### :  $p < 0,0001$  comparé aux cellules infectées (ONNV). (n=3, test de Bonferroni).

Par comparaison avec les cellules infectées et non traitées (ONNV), l'expression de MXRA8 dans les cellules infectées et traitées est significativement réduite avec la chloroquine ( $2,08 \pm 0,55 \times 10^{-4}$ , ## :  $p < 0,01$ ), la berbérine ( $3,17 \pm 0,16 \times 10^{-4}$ , # :  $p < 0,05$ ) et la tabersonine ( $2,81 \pm 0,13 \times 10^{-4}$ , # :  $p < 0,05$ ), mais augmente avec la matrine ( $1,01 \pm 0,10 \times 10^{-3}$ , ##### :  $p < 0,0001$ ), avec un niveau d'expression trois fois supérieur à celui des cellules infectées (ONNV). La chloroquine et les alcaloïdes étudiés diminuent l'expression de RIG-I (chloroquine :  $2,07 \pm 1,14 \times 10^{-2}$ , ##### :  $p < 0,001$  ; berbérine :  $5,09 \times 10^{-2} \pm 0,93 \times 10^{-2}$ , ##### :  $p < 0,0001$  ; matrine :  $7,81 \pm 0,49 \times 10^{-2}$ , ### :  $p < 0,001$  et tabersonine :  $5,07 \pm 0,28 \times 10^{-2}$ , ##### :  $p < 0,0001$ ).

Par rapport aux cellules-contrôles non infectées et non traitées (CTRL), l'infection des cellules HS633T par ONNV augmente de manière significative l'expression génique de IRF3 (CTRL :  $1,75 \pm 0,33 \times 10^{-4}$ ; ONNV :  $1,95 \pm 0,46 \times 10^{-4}$ , \* :  $p < 0,05$ , FC = 9,9), de IFN- $\beta$  (CTRL:  $2,67 \pm 0,52 \times 10^{-5}$ ; ONNV:  $55,63 \pm 0,28 \times 10^{-5}$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ , FC = 2,1) et de ISG-15 (CTRL :

$3,06 \pm 0,47 \times 10^{-5}$  ; ONNV :  $2,61 \pm 0,65 \times 10^{-4}$ , \* :  $p < 0,05$ , FC = 8,5), mais diminue celle de STAT1 (CTRL :  $8,11 \pm 0,67 \times 10^{-2}$  ; ONNV :  $7,00 \pm 2,39 \times 10^{-3}$ , \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ , FC = 0,09). Les traitements chimiques des cellules infectées régulent les effecteurs antiviraux de manières sensiblement différentes. Ainsi, la matrine augmente de manière significative l'expression de IRF3 ( $2,11 \pm 0,39 \times 10^{-3}$ , ##### :  $p < 0,0001$ ) et celle de ISG15 ( $8,41 \pm 0,18 \times 10^{-4}$ , ##### :  $p < 0,0001$ ). L'expression de IFN- $\beta$  est augmentée avec la chloroquine ( $1,76 \pm 0,22 \times 10^{-4}$ , ### :  $p < 0,001$ ) ou la berbérine ( $1,28 \pm 0,16 \times 10^{-4}$ , ### :  $p < 0,001$ ), mais elle est diminuée avec la matrine ( $1,36 \pm 0,19 \times 10^{-5}$ , # :  $p < 0,05$ ) ou la tabersonine ( $4,03 \pm 1,11 \times 10^{-6}$ , ## :  $p < 0,01$ ). Aucun des traitements n'a d'effet sur la diminution de l'expression de STAT1, causée par l'infection par le ONNV.

L'autophagie est un processus impliqué dans les infections par les alphavirus, avec un rôle pro-ou antiviral qui n'est pas encore défini [264]. L'effet des trois alcaloïdes-types sur ce processus a été analysé dans notre contexte par l'expression des gènes codant pour les facteurs cellulaires PI3K et AMPK et les résultats sont présentés en **Figure 30**.



**Figure 30.** Effets des alcaloïdes sur les facteurs cellulaires de l'autophagie.

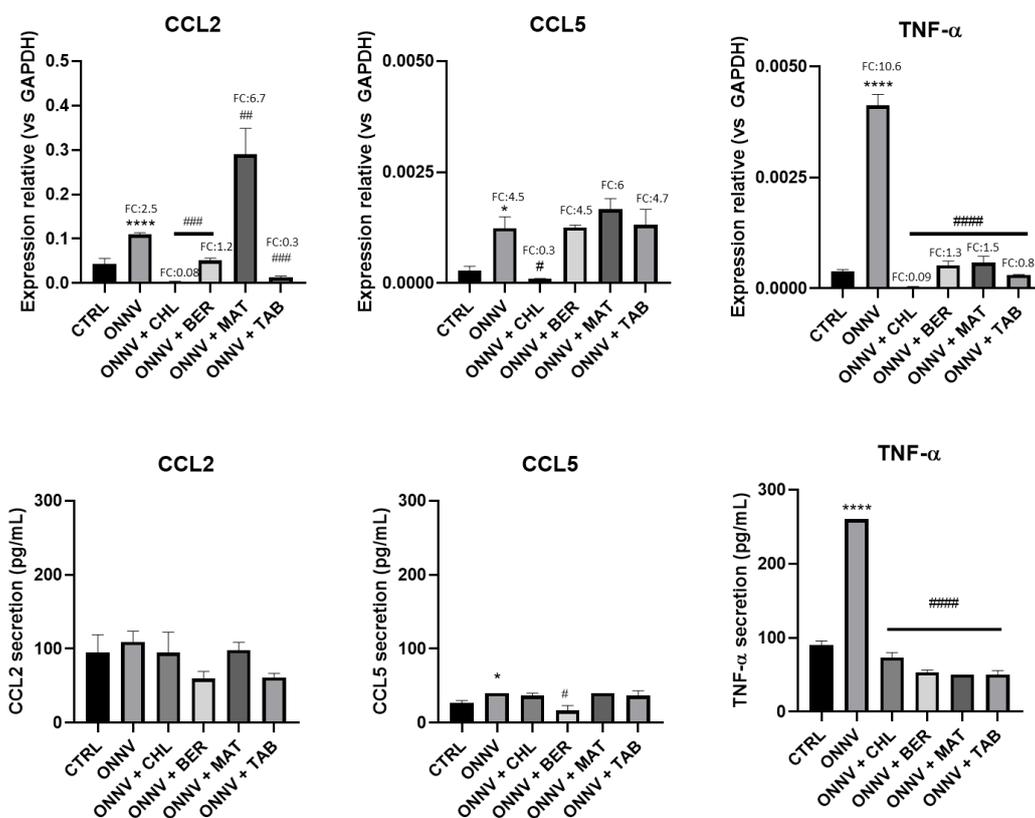
Traitement et infection simultanés, CHL 15  $\mu$ M ; BER, MAT et TAB 10  $\mu$ M ; ONNV MOI=1. \* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ , \*\*\*\* :  $p < 0,0001$  comparé aux cellules non infectées et non traitées (CTRL) ou # :  $p < 0,05$ , ## :  $p < 0,01$ , ### :  $p < 0,001$ , #### :  $p < 0,0001$  comparé aux cellules infectées (ONNV). (n=3, test de Bonferroni).

Dans les cellules infectées et non traitées (ONNV), l'expression de PI3K (CTRL :  $2,29 \pm 0,68 \times 10^{-3}$  ; ONNV :  $1,63 \pm 0,39 \times 10^{-4}$ , \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ ) et celle de l'AMPK (CTRL :  $5,36 \pm 0,63 \times 10^{-3}$  ; ONNV :  $6,44 \pm 0,39 \times 10^{-4}$ , \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ ) sont significativement réduites, par comparaison avec les cellules-contrôles non infectées et non traitées (CTRL). Le traitement à la chloroquine contrebalance cet effet, comme cela est établi avec l'augmentation significative de l'expression génique de PI3K ( $7,89 \pm 0,74 \times 10^{-3}$ , ## :  $p < 0,01$ ) et de l'AMPK ( $2,18 \pm$

$0,25 \times 10^{-3}$ , ## :  $p < 0,01$ ). En revanche, aucun des alcaloïdes-types n'a d'effet significatif sur l'expression de PI3K et de AMPK.

#### 4. Effets sur les médiateurs de l'inflammation

Le potentiel anti-inflammatoire des alcaloïdes-types a été évalué sur les cellules HS633T infectées par ONNV. L'analyse par qRT-PCR a été effectuée pour l'expression de gènes codant pour les médiateurs pro-inflammatoires CCL2, CCL5 et TNF- $\alpha$ . La sécrétion de ces médiateurs a été suivie par la méthode ELISA. Les résultats sont présentés en **Figure 31**.



**Figure 31.** Effets des alcaloïdes sur les médiateurs de l'inflammation.

Traitement et infection simultanés, CHL 15  $\mu$ M ; BER, MAT et TAB 10  $\mu$ M ; ONNV MOI=1. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$  comparé aux cellules non infectées et non traitées (CTRL) ou # :  $p < 0,05$ , ## :  $p < 0,01$ , ### :  $p < 0,001$ , #### :  $p < 0,0001$  comparé aux cellules infectées (ONNV). (n=3, test de Bonferroni).

Par rapport aux cellules non infectées et non traitées (CTRL), l'infection par ONNV augmente significativement l'expression de CCL2 (CTRL :  $4,30 \pm 1,5 \times 10^{-2}$  ; ONNV :  $1,10 \times 10^{-1} \pm 0,04 \times 10^{-1}$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ , FC = 2,5), de CCL5 (CTRL :  $2,76 \pm 1,07 \times 10^{-4}$  ; ONNV :  $1,24 \pm 0,26 \times 10^{-3}$ , \*:  $p < 0,05$ , FC = 4,5) et de TNF- $\alpha$  (CTRL :  $3,87 \pm 0,34 \times 10^{-4}$  ; ONNV :  $4,12 \pm 0,25 \times 10^{-3}$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ , FC = 10,6).

Par rapport aux cellules infectées et non traitées (ONNV), l'expression de CCL2 est réduite par la chloroquine ( $3,40 \pm 1,06 \times 10^{-3}$ , ### :  $p < 0,001$ ), la berbérine ( $5,16 \pm 0,50 \times 10^{-2}$ , ### :  $p < 0,001$ ) et la tabersonine ( $1,30 \pm 0,32 \times 10^{-2}$ , ### :  $p < 0,001$ ). Ces mêmes composés réduisent significativement (#### :  $p < 0,0001$ ) l'expression de TNF- $\alpha$  (chloroquine :  $3,52 \pm 0,80 \times 10^{-5}$  ; berbérine :  $5,24 \pm 0,89 \times 10^{-4}$  ; tabersonine :  $3,04 \pm 0,13 \times 10^{-4}$ ). L'effet de la matrine se singularise par une augmentation du niveau d'expression de CCL2 ( $2,90 \pm 0,59 \times 10^{-1}$ , # :  $p < 0,05$ ), et une diminution de celui de TNF- $\alpha$  ( $5,83 \pm 1,40 \times 10^{-4}$ , #### :  $p < 0,0001$ ). L'expression de CCL5 n'est significativement réduite que par la chloroquine ( $9,90 \pm 1,42 \times 10^{-5}$ , # :  $p < 0,05$ , # :  $p < 0,05$ ). Seule la sécrétion de CCL5 ou de TNF- $\alpha$  induite par ONNV dans les cellules infectées est significativement diminuée, respectivement par la berbérine (# :  $p < 0,05$ ) et par l'ensemble des composés testés (#### :  $p < 0,0001$ ).

## 5. Effets sur les voies de l'inflammation

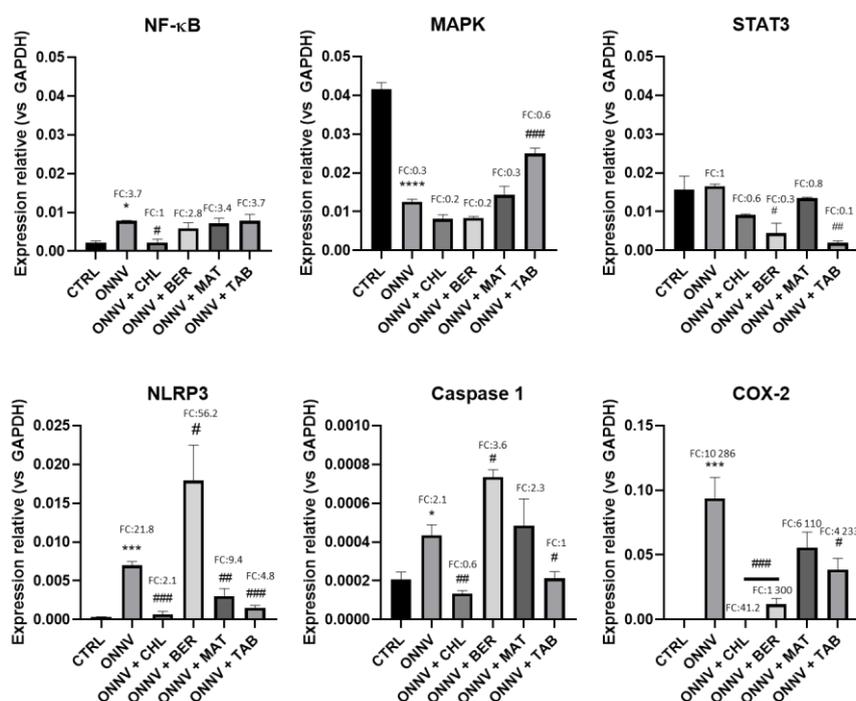
Les effets de la berbérine, de la matrine et de la tabersonine sur différentes voies de l'inflammation ont été étudiés par l'analyse qRT-PCR de l'expression des gènes codant pour NF- $\kappa$ B, MAPK, STAT3 (voie JAK-STAT), NLRP3/Caspase-1 (voie de l'inflammasome) et COX-2 (voie des prostaglandines), dans les cellules infectées par ONNV. Les résultats sont présentés en **Figure 32, ci-après**.

Par rapport aux cellules non infectées et non traitées (CTRL), l'infection par ONNV augmente l'expression de NF- $\kappa$ B (CTRL :  $2,11 \pm 0,51 \times 10^{-3}$  ; ONNV :  $7,78 \pm 0,10 \times 10^{-3}$ , \* :  $p < 0,05$ , FC = 3,7), mais le traitement à la chloroquine diminue significativement son expression ( $2,22 \pm 0,85 \times 10^{-3}$ , # :  $p < 0,05$ ) dans les cellules infectées. L'infection par ONNV diminue significativement l'expression de MAPK (CTRL :  $4,16 \pm 0,17 \times 10^{-2}$  ; ONNV :  $1,25 \pm 0,81 \times 10^{-2}$ , \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ , FC = 0,3) et la tabersonine atténue de manière significative cet effet ( $2,50 \pm 0,14 \times 10^{-2}$ , ### :  $p < 0,001$ ).

L'infection par le ONNV n'a aucun effet sur l'expression de STAT3 (CTRL :  $1,57 \pm 0,35 \times 10^{-2}$  ; ONNV :  $6,96 \pm 0,50 \times 10^{-3}$ ). Les traitements à la berbérine ( $4,47 \pm 2,57 \times 10^{-3}$ , # :  $p < 0,05$ ) et à la tabersonine ( $1,98 \pm 0,46 \times 10^{-3}$ , ## :  $p < 0,01$ ) réduisent de manière significative son expression, par comparaison avec les cellules infectées et non traitées.

L'infection par ONNV augmente de manière significative l'expression de NLRP3 (CTRL :  $3,19 \pm 0,36 \times 10^{-4}$  ; ONNV :  $6,96 \pm 0,50 \times 10^{-3}$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ , FC = 21,8) et de caspase-1 (CTRL :  $2,06 \pm 0,38 \times 10^{-4}$  ; ONNV :  $4,35 \pm 0,54 \times 10^{-4}$ , \* :  $p < 0,05$ , FC = 2,1) et le traitement à la

berbérine accentue cet effet de manière plus importante pour NLRP3 ( $1,79 \pm 0,46 \times 10^{-2}$ , # :  $p < 0,05$ ) et plus modérée pour caspase-1 ( $7,35 \pm 0,37 \times 10^{-4}$ , # :  $p < 0,05$ ). Le traitement par la matrine n'affecte que le niveau d'expression de NLRP3, qui est diminué ( $3,00 \pm 0,99 \times 10^{-3}$ , ## :  $p < 0,01$ ), alors que la tabersonine diminue à la fois les niveaux d'expression de NLRP3 ( $1,52 \pm 0,33 \times 10^{-3}$ , #### :  $p < 0,001$ ) et de caspase-1 ( $2,13 \pm 0,34 \times 10^{-4}$ , # :  $p < 0,05$ ), comme cela est observé avec la chloroquine (NLRP3 :  $6,70 \pm 3,87 \times 10^{-4}$ , #### :  $p < 0,001$  ; caspase-1 :  $1,34 \pm 0,16 \times 10^{-4}$ , ## :  $p < 0,01$ ). Enfin, l'augmentation de l'expression de COX-2 par l'infection par ONNV (CTRL :  $6,28 \pm 5,66 \times 10^{-6}$  ; ONNV :  $9,37 \pm 1,63 \times 10^{-2}$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ , FC > 10 000) est diminuée par les traitements avec la chloroquine ( $3,76 \pm 1,80 \times 10^{-4}$ , #### :  $p < 0,001$ ), la berbérine ( $1,18 \pm 0,47 \times 10^{-2}$ , #### :  $p < 0,001$ ) et la tabersonine ( $3,86 \pm 0,88 \times 10^{-2}$ , # :  $p < 0,05$ ), alors qu'aucun effet n'est observable avec la matrine.



**Figure 32.** Effets des alcaloïdes sur les voies de l'inflammation.

Traitement et infection simultanés, CHL 15  $\mu$ M ; BER, MAT et TAB 10  $\mu$ M ; ONNV MOI=1. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$  comparé aux cellules non infectées et non traitées (CTRL) ou # :  $p < 0,05$ , ## :  $p < 0,01$ , ### :  $p < 0,001$ , #### :  $p < 0,0001$  comparé rapport aux cellules infectées (ONNV). (n=3, test de Bonferroni).

### III. Discussion

Fondée sur le potentiel anti-alphaviral des alcaloïdes (**Chapitre 2**), cette partie visait à évaluer les effets anti-alphaviraux de trois alcaloïdes-types naturellement présents dans les plantes, la berbérine (isoquinoléine), la matrine (quinolizidine) et la tabersonine (indole), avec le modèle biologique précédemment développé (**Chapitre 3**).

Les données montrent à nouveau que les cellules HS633T sont infectées par le ONNV (MOI 1) au bout de 24 h, comme l'illustre l'expression des gènes viraux E1, E2, nsP2 et capsid (Fig. 28A). Les effets des trois alcaloïdes-types sur l'infection ont ensuite été étudiés. Les protéines E1 et E2 sont particulièrement impliquées pour l'entrée du virus dans la cellule-hôte [265,266]. Par ailleurs, l'interaction entre les protéines capsid et d'enveloppe E1 et E2 est déterminante pour la libération des nouveaux virions produits lors d'une infection par les alphavirus [267]. Les protéines non-structurales (nsP1-nsP4) interviennent dans la synthèse de l'ARN viral [268], et la protéine nsP2 est un facteur de virulence capable d'inhiber la voie JAK/STAT dépendante des IFNs au cours de l'infection par les alphavirus [269]. Les alcaloïdes étudiés réduisent de manière significative l'expression des gènes codant pour les protéines E1 et E2 dans les cellules HS633T infectées par le ONNV, mais la matrine augmente significativement l'expression des gènes pour les protéines capsid et nsP2 (**Fig. 28A**). Ces résultats sont concordants avec le dénombrement des plages de lyse, dans le cas de l'utilisation de la berbérine et la tabersonine, qui réduisent de manière significative la production de nouveaux virions (**Fig. 28B**) et suggèrent que la chloroquine, la berbérine et la tabersonine interfèrent probablement sur la réplication virale.

Cette étude décrit également une réponse immunitaire robuste des cellules HS633T infectées par le ONNV, comme cela a déjà démontré (**Chapitre 3**) et comme le traduit encore l'augmentation de l'expression des récepteurs membranaire MXRA8 [270] et cytosolique RIG-I [43], impliqués dans la détection du virus. Comme la chloroquine, la berbérine et la tabersonine diminuent l'expression de ces deux récepteurs, tandis que la matrine augmente l'expression de MXRA8.

L'activation de la réponse antivirale des IFNs de type 1 est établie par l'augmentation de l'expression de IRF3, IFN- $\beta$  et de ISG15 dans les cellules infectées. Les alcaloïdes-types ont des effets différents sur cette principale voie de la réponse antivirale (**Fig. 29**). La matrine augmente l'expression de IRF3 et de ISG15 mais diminue celle de IFN- $\beta$  dans les cellules infectées. La chloroquine, la berbérine et la tabersonine n'affectent pas l'expression de IRF3,

mais exercent un effet sur l'expression de IFN- $\beta$  et ISG15. La chloroquine augmente l'expression de IFN- $\beta$ , la berbérine augmente l'expression de IFN- $\beta$ , mais diminue celle de ISG15, alors que la tabersonine diminue l'expression de ces deux mêmes composants. Ces données suggèrent une activation de la voie des IFNs de type 1 indépendante de IRF3.

Les résultats indiquent également que ONNV interfère avec la réponse antivirale associée à STAT1, comme cela a déjà observé *in vitro* pour le SINV [100] ou le CHIKV [25,101]. La diminution de l'expression de STAT1 au cours de l'infection par les alphavirus résulte de l'action de la protéine virale nsP2 sur les mécanismes cellulaires de l'hôte, notamment sur la voie JAK/STAT [260]. Aucun des composés testés n'est capable de restaurer le niveau d'expression de STAT1 dans les cellules HS633T, infectées avec le ONNV.

L'autophagie est un processus d'auto-recyclage intracellulaire par lequel les composés cytoplasmiques sont dégradés et recyclés grâce à la fusion d'autophagosomes et de lysosomes. Il s'agit d'une voie catabolique qui permet de maintenir l'homéostasie cellulaire, notamment dans un contexte de stress [271]. Le processus d'autophagie, médié par les facteurs cellulaires PI3K et AMPK, participe à la réponse immunitaire innée contre les alphavirus du Vieux Monde comme cela est illustré pour les CHIKV, RRV et SFV [264]. Cependant, la fonction pro- ou antivirale de l'autophagie reste discutable [272,273], comme pour le CHIKV avec son rôle essentiel pour la réplication virale dans une étude *in vitro* [274] et à l'inverse, dans des études *in vitro* et *in vivo* par l'atténuation de l'apoptose et de la dissémination virale [275]. Les résultats indiquent que ce processus est désactivé par le ONNV dans les cellules HS633T et qu'il n'est réactivé que par la chloroquine (**Fig. 30**). Ces données suggèrent un rôle antiviral de l'autophagie dans notre cas et sont concordantes avec l'augmentation de l'expression du marqueur LC3 précédemment observée avec la chloroquine (**Chapitre 3**).

L'inflammation causée par l'infection par les alphavirus arthritogéniques peut entraîner divers troubles plus ou moins sévères [276–279]. Cette étude révèle également l'augmentation attendue des médiateurs de l'inflammation CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES) et TNF- $\alpha$  (**Fig. 31**). TNF- $\alpha$  et CCL2 sont des médiateurs-clés de l'inflammation, respectivement impliqués dans la survie des cellules et le recrutement des macrophages, qui sont les premières cellules effectrices de l'immunité [73]. La chimiokine CCL5 participe au recrutement des cellules immunitaires, notamment les lymphocytes (T, NK) et les cellules dendritiques [74]. Dans les cellules HS633T infectées par le ONNV, l'expression des médiateurs CCL2, CCL5 et TNF- $\alpha$  est augmentée. De manière remarquable, tous les composés ont un effet régulateur sur l'expression de TNF $\alpha$  aux niveaux génique et protéique. La berbérine et la tabersonine régulent

l'expression de CCL2, alors que la matrine l'augmente. Les trois alcaloïdes n'ont pas d'effet significatif sur l'expression de CCL5. Ainsi, les alcaloïdes agissent sur la production des médiateurs pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et CCL2.

L'effet des alcaloïdes-types sur les composants des voies de l'inflammation [NF- $\kappa$ B, MAPK, STAT3 (voie JAK-STAT), NLRP3/caspase-1 (voie de l'inflammasome) et COX-2 (voie des prostaglandines)] a aussi été examiné.

Le composant STAT3 est impliqué dans la production de plusieurs médiateurs pro-inflammatoires [280]. L'infection des cellules HS633T par le ONNV n'a révélé aucun effet significatif sur l'expression de STAT3. Ces résultats contrastent avec ceux de Xu et al., qui ont décrit la diminution de l'expression de STAT3 lors de l'infection par le SINV dans cellules progénitrices neurales humaines (hNPC) [281]. Nos résultats révèlent aussi que la berbérine et la tabersonine diminuent de manière significative l'expression de ce même composant.

L'activation de la voie NF- $\kappa$ B participe à l'invasion cellulaire des alphavirus. En effet, elle favorise la réplication virale dans les neurones matures infectés par le virus Sindbis [282]. Dans le même temps, cette voie contribue à la réponse IFNs de type 1 [283] et à la réponse inflammatoire [284]. Les données sur l'expression des composants des voies de l'inflammation révèlent une augmentation de l'expression de NF- $\kappa$ B dans les cellules infectées, que seule la chloroquine est capable de diminuer. Les alcaloïdes étudiés n'ont aucun effet sur cette voie dans les cellules HS633T infectées.

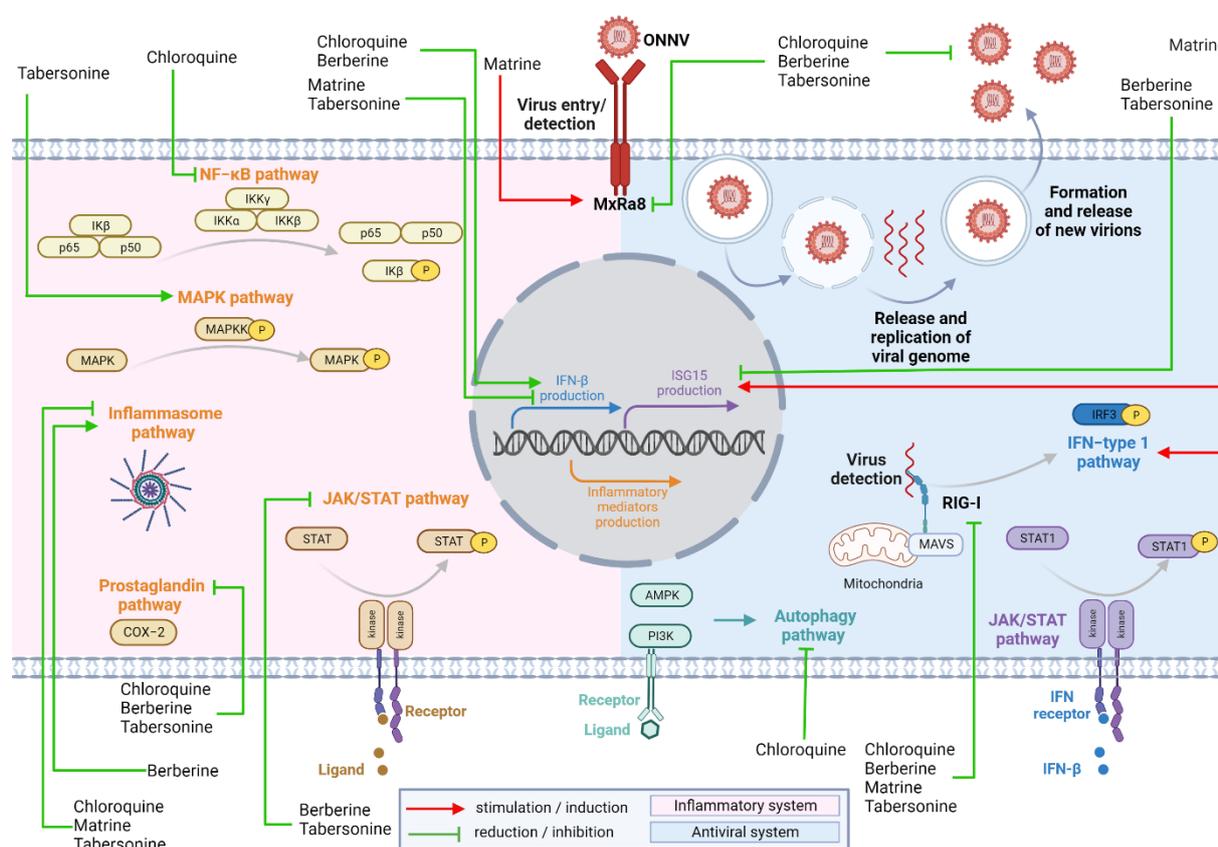
La voie MAPK est impliquée dans plusieurs processus cellulaires comme le cycle cellulaire (croissance, différenciation, apoptose ou encore survie), mais aussi la réponse inflammatoire avec la production de cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1) [285]. L'expression de MAPK est augmentée par le CHIKV dans les cellules humaines d'ostéosarcome (HOS) [148]. Cependant, dans les cellules hNPC, le virus Sindbis diminue son expression [281], comme observé dans les cellules HS633T infectées par le ONNV. Seule la tabersonine restaure le niveau d'expression de MAPK dans les cellules infectées, ce qui souligne particulièrement son effet positif sur la réponse immunitaire engagée contre l'infection.

La voie de l'inflammasome NLRP3/caspase-1 participe à la réponse immunitaire, notamment avec la production de médiateurs pro-inflammatoires IL-18 et IL-1 $\beta$  et l'initiation de la pyroptose [286]. La pyroptose est un processus de mort cellulaire au cours de laquelle des molécules pro-inflammatoires sont libérées [287]. L'activation de la voie de l'inflammasome NLRP3/caspase-1 est aussi associée à la sévérité de l'infection par alphavirus. Nos données

révèlent l'augmentation de l'expression de NLRP3 et de caspase-1 par le ONNV (**Fig. 32**), comme cela est observé *in vivo*, au cours d'une infection par le CHIKV [288] et *in vitro* et *in vivo*, lors d'une infection par le virus Mayaro [289]. Dans les cellules HS633T infectées par le ONNV, la berbérine augmente l'expression de NLRP3 et de caspase-1, alors que la tabersonine diminue l'expression de NLRP3 et de caspase-1 et que la matrine ne diminue que celle de NLRP3. Ainsi, cette voie NLRP3/caspase-1 est affectée différemment selon le traitement appliqué.

La cyclooxygénase 2 (COX-2) est une enzyme impliquée dans la cascade de l'acide arachidonique, pour la production de prostaglandines (PG) pro-inflammatoires impliquées dans les infections virales [290]. Nos données établissent une augmentation du niveau d'expression de COX-2 dans les cellules HS633T infectées avec le ONNV. Ces résultats sont en adéquation avec ceux décrits antérieurement par notre laboratoire, avec l'infection au CHIKV dans les fibroblastes synoviaux humains [291]. Comme la chloroquine, la berbérine et la tabersonine diminuent l'expression de COX-2 dans les cellules infectées. Ces résultats établissent la diversité des mécanismes anti-inflammatoires des alcaloïdes-types.

Comme ceci est résumé en **Figure 33**, les alphavirus (ici ONNV) utilisent MXRA8 pour se fixer et infecter les cellules dérivées de fibroblastes.



**Figure 33.** Effets des alcaloïdes étudiés sur la réponse immunitaire (antivirale en bleu et inflammatoire en rose) *d'après* [292].

Le virus se réplique ensuite à l'intérieur de cellules et les ARNs<sup>b</sup> peuvent être détectés par les PRR comme RIG-I. L'activation de la voie de signalisation dépendante de RIG-I et MAVS active les facteurs de transcription comme IRF3 et participe à la production d'IFNs (ici IFN- $\beta$ ). Les IFNs se fixent à leur récepteur (IFNAR) et activent la voie JAK/STAT et les facteurs de transcription Stat1/2 pour entraîner l'expression d'ISG (ici ISG15). L'infection virale entraîne aussi l'expression de cytokines (comme TNF- $\alpha$ ) et chimiokines (comme CCL2) pro-inflammatoires, notamment par les voies NF- $\kappa$ B et MAPK, mais aussi l'expression des prostaglandines via COX-2. L'inflammasome (NLRP3) participe à l'activation de la caspase-1 et à l'augmentation de la sécrétion de la cytokines canoniques Il-1 $\beta$ . L'autophagie peut moduler la réplication virale sous le contrôle de deux kinases, PI3K et AMPK. La réponse inflammatoire peut contribuer à la réponse antivirale, mais aussi aux atteintes chroniques des articulations si elle est incontrôlée. Les alcaloïdes peuvent moduler différentes étapes de la réponse pro-inflammatoire et ouvrent un nouvel axe de recherche de molécules anti-alphavirales contre les infections aiguës et chroniques par les alphavirus.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats illustre une réponse immunitaire antivirale et inflammatoire robuste des cellules HS633T contre l'infection par le ONNV, notamment à travers la voie des IFNs de type 1 et les voies canoniques de signalisation de l'inflammation. La diminution drastique de l'expression de STAT1 reflète l'échappement du ONNV à la réponse immunitaire de l'hôte. L'ensemble de nos résultats établit le potentiel anti-alphaviral des alcaloïdes-types étudiés, du contrôle de l'infection virale à la régulation de la réponse immunitaire de la cellule-hôte. Pour la recherche de potentiels anti-alphaviraux, cette étude souligne la nécessité d'une évaluation biologique approfondie, pour un profilage de leurs activités sur la réponse immunitaire, comme l'illustrent les effets inattendus de la matrine. Enfin, ces alcaloïdes-types s'établissent comme squelettes moléculaires (*scaffolds* en anglais), pouvant servir de structures de base pour élaborer de potentiels nouveaux médicaments anti-alphaviraux.

# Chapitre 5. Activités anti-alphavirales d'extraits de plantes de La Réunion

Les résultats obtenus sur les alcaloïdes étudiés ont conduit à considérer des espèces végétales de la biodiversité de La Réunion, susceptibles de renfermer les mêmes types d'alcaloïdes précédemment étudiés et de présenter des effets identiques ou tout au moins comparables. Des extraits bruts de trois plantes de La Réunion ont été alors réalisés et testés contre l'infection des cellules HS63TT par le ONNV et leurs potentialités ont été corrélées avec une caractérisation chimique préliminaire.

## I. La biodiversité végétale régionale

### 1. Les caractéristiques remarquables du milieu

La Réunion est une jeune île de l'océan Indien dont l'émersion est due à l'activité volcanique d'un point chaud géologique il y a un peu plus de 3 millions d'années. La diversité de reliefs, de sols et de microclimats offre des conditions d'installation originales et remarquables pour la faune et la flore [293].

La végétation réunionnaise présente une grande diversité avec à ce jour 1889 espèces recensées dont 48,4% d'espèces exotiques (espèces originaires d'une autre région, introduites volontairement ou involontairement par l'Homme), 47,5% d'espèces indigènes (espèces natives du territoire, sans intervention humaine) et 4,1% d'espèces cryptogènes ou cryptogéniques (espèces dont la région d'origine ne peut être déterminée avec certitude et dont le caractère indigène ou exotique est inconnu). Parmi les espèces végétales indigènes, 27,8% sont des espèces endémiques strictes de La Réunion et 17% de la région [294].

Grâce à ces spécificités, La Réunion fait partie de l'un des 36 points chauds (« *hotspots* ») de la biodiversité mondiale avec d'autres îles françaises de la zone océan Indien dont Mayotte, mais aussi les îles Eparses, Madagascar, Maurice, Rodrigues, les Comores et les Seychelles [295–297].

## **2. Les usages thérapeutiques traditionnels des plantes**

Depuis toujours et partout dans le monde, les plantes ou les produits dérivés de plantes sont largement utilisés pour la santé humaine (aujourd'hui près de 80% de la population mondiale) [174,298].

A La Réunion, l'usage des plantes (en décoction, infusion, inhalation, bain et cataplasme) est un héritage de l'Histoire. Le peuplement original de l'île avec les populations venues d'Afrique, d'Asie, de Chine, de France, d'Inde et de Madagascar a donné naissance à une pharmacopée traditionnelle locale spécifique [299–303].

Une étude réalisée de décembre 2005 à janvier 2006 par l'Observatoire du Développement de La Réunion [304] a révélé que 43% des familles réunionnaises utilisent régulièrement des plantes pour leurs propriétés thérapeutiques. L'association APLAMEDOM a depuis recensé près de 150 plantes locales exploitées couramment dont 25 « utilisées par tous » et qui sont pour la plupart des espèces exotiques [305].

Les espèces locales, qu'elles soient médicinales ou non, font l'objet d'une attention particulière, notamment depuis l'inscription des premières espèces médicinales, traditionnellement utilisées, à la Pharmacopée française. Entre 2012 et 2016, 22 plantes réunionnaises ont ainsi été reconnues et inscrites sur la liste A des plantes médicinales utilisées traditionnellement. En 2020, 5 plantes supplémentaires ont été inscrites à la liste portant à 27 le nombre de plantes réunionnaises inscrites à la Pharmacopée française [306]. Aujourd'hui les plantes réunionnaises inscrites à la Pharmacopée française sont au nombre de 31. Depuis les premières inscriptions à la Pharmacopée française, le nombre d'études sur ces espèces et plus largement des plantes de la biodiversité réunionnaise est croissant.

Divers travaux relatifs à l'étude de la composition chimiques d'extraits végétaux, ainsi qu'à l'évaluation d'activités biologiques diverses, ont été réalisés. L'inscription de ces plantes à la Pharmacopée française est une réelle avancée, mais l'apport de preuves scientifiques pour valider leurs usages traditionnels et, de manière plus globale, d'attester du potentiel thérapeutique des espèces végétales réunionnaises reste encore insuffisant.

## **3. Valorisation chimique et biologique des espèces végétales**

Depuis plusieurs décennies et dans le cadre de la valorisation de la biodiversité végétale et de la validation des usages traditionnels, des études phytochimiques et biologiques sont réalisées

sur les plantes de La Réunion. Malgré l'amplification des travaux sur ces espèces de la flore locale, aucune d'entre elles n'a débouché sur un développement pharmaceutique.

L'étude des plantes réunionnaises a été engagée au début des années 1990 avec une caractérisation phytochimique de plus de 300 plantes endémiques ou indigènes de La Réunion, dans le but d'identifier les grandes classes de molécules présentes [307–309]. Ces travaux complètent l'étude ethnobotanique réalisée par le botaniste Roger Lavergne sur les plantes médicinales de l'île prescrites par les tisanieurs [302,310].

Par la suite, à la fin des années 1990, plusieurs études phytochimiques marquantes ont concerné les espèces *Embelia angustifolia*, *Badula barthesia* et *Melicope borbonica* var. *borbonica* (ex *Euodia borbonica* var. *borbonica*) [311–313], puis de *Psiadia dentata* et des espèces du genre *Melicope* au début des années 2000 [314–318], réalisées par Adersen *et al.*, (Université de Copenhague, Danemark). Ces travaux ont conduit dans certains cas à l'isolement de nouveaux métabolites secondaires, présentant parfois des activités biologiques.

En 1997, Lund *et al.*, ont isolé trois nouvelles benzoquinones de l'espèce *Embelia angustifolia* ((Z)-2,5-dihydroxy-3-(pentadéc-8-ényl)-1,4-benzoquinone, (Z,Z)-2,5-dihydroxy-3-(heptadéca-8,11-diényl)-1,4-benzoquinone et (Z)-2,5-dihydroxy-3-(heptadéc-8-ényl)-1,4-benzoquinone)) [312]. Ces trois nouvelles molécules, ainsi qu'une autre benzoquinone (rapanone), issue de *Badula barthesia*, ont démontré des activités antimicrobiennes et inhibitrices sur l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), à l'aide de tests biochimiques prédictifs [311]. En 2001, Jakobsen *et al.*, ont isolé une nouvelle coumarine dans l'espèce *Psiadia dentata* [315].

Les travaux sur les espèces du genre *Melicope* ont permis d'isoler de nouvelles molécules. En 2002, Simonsen *et al.*, ont isolé trois nouveaux composés, la 3,8-diméthoxy-5,7-dihydroxy-3',4'-méthylènedioxyflavone, la 3,6,8-triméthoxy-5,7-dihydroxy-3',4'-méthylènedioxyflavone et la 3,6,8,3',4'-pentaméthoxy-5,7-dihydroxyflavone. En 2007, Adersen *et al.*, ont isolé pour la première fois quatre acétophénones prénylées, la 6-dihydroxy-4-géranxyloxyacétophénone, la 4-géranxyloxy-2,6,b-trihydroxyacétophénone, 2,6-dihydroxy-4-géranxyloxy-3-prénylacétophénone et la 4-géranxyloxy-3-prényl-2,6,b-trihydroxyacétophénone [314]. En 2012, H.T. Simonsen a isolé quatre autres dérivés d'acétophénone et l'un de ces composés, la coodeanone C, a démontré une activité contre *Plasmodium falciparum* [316].

A partir de la fin des années 1990, les études phytochimiques sur les espèces végétales réunionnaises sont complétées par les premières évaluations biologiques. En 1997, le profilage chimique de vingt-quatre espèces végétales réunionnaises, encore non étudiées et susceptibles

de contenir des alcaloïdes, a été réalisé. Cette étude chimique a été complétée par un criblage des activités biologiques avec des tests prédictifs d'activités biologiques anticancéreuses, antimicrobiennes ou antipaludéennes. Les données ont permis de mieux caractériser la composition chimique d'espèces végétales locales, mais aucune activité biologique significative n'a été établie [319].

Par la suite, Adersen *et al.* ont réalisé un criblage d'activité antihypertensive et diurétique de quatre-vingts plantes réunionnaises, dont vingt-six utilisées comme remèdes antihypertenseurs et trente-huit comme diurétiques en médecine traditionnelle [320]. Les résultats ont établi une activité inhibitrice de plusieurs de ces plantes sur l'enzyme de conversion de l'angiotensine et ont ainsi permis de valider les usages traditionnels de ces plantes. Ces investigations ont aussi permis de révéler l'activité biologique de plantes non utilisées dans la pharmacopée traditionnelle.

En 2002, Fortin *et al.* ont étudié l'activité antivirale de trente-six plantes réunionnaises contre le virus de l'herpès (HSV-1) et le poliovirus à l'aide de tests prédictifs [312]. Les deux espèces les plus actives contre le HSV-1 sont *Obetia ficifolia* et *Erythroxylum laurifolium*. *Oxypetalum psittacorum* et *Psiadia dentata* ont présenté des activités inhibitrices contre le poliovirus. L'espèce *Senecio ambavilla* a présenté une activité antivirale contre les deux virus [321].

En 2008, Jonville *et al.* ont évalué, toujours à l'aide de tests prédictifs, les activités antipaludéenne et cytotoxique de neuf plantes de l'île [322]. Les espèces dont les extraits ont présenté la meilleure activité antipaludéenne sont *Aphloia theiformis* et *Terminalia bentzoe*. En 2011, les activités antipaludéenne, anti-inflammatoire, cytotoxique et anti-proliférative de dix-neuf plantes ont été évaluées [323]. *Psiadia dentata* a été décrite pour ses activités antipaludéennes prometteuses. Les espèces *Aphloia theiformis*, *Buddleja salviifolia*, *Eupatorium riparium*, *Hiptage benghalensis*, *Psiadia arguta*, *Psiadia dentata*, et *Scutia commersonii* ont été décrites pour leurs activités anti-inflammatoires à travers l'inhibition de la production de monoxyde d'azote (NO). Ces travaux ont aussi permis d'établir les effets anti-prolifératifs des extraits de *Geniostoma borbonicum* et *Nuxia verticillata*.

En 2005, C. Poullain a étudié soixante-quinze espèces végétales de la région, à la recherche de diverses activités biologiques, telles que des activités antioxydantes et anti-radicalaires, des activités antifongiques, des activités d'inhibition de l'acétylcholinestérase et des activités antivirales contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). En particulier, l'activité antivirale de ces plantes a été évaluée par la fusion du VIH (particule virale modifiée et produite

à partir de cellules BHK) à une cellule receveuse (cellules HeLa modifiée exprimant des récepteurs-clés du VIH) [324]. L'activité anti-radicalaire de trois espèces, *Hypericum lanceolatum*, *Monarrhenus salicifolius* et *Ocotea obtusata* a été établie avec le test DPPH. Le test antioxydant avec l'AAPH a mis en évidence les activités de *Melicope coodeana* et *Philippia montana*. Trois espèces végétales *Ruizia cordata*, *Casearia coriacea* et *Melicope borbonica* ont présenté des effets antifongiques. *Gastonia cutispongia*, *Hibiscus boryanus*, *Psiloxylon mauritianum* et *Ochrosia borbonica* ont présenté les meilleures activités inhibitrices de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Enfin, les activités antivirales de *Hypericum lanceolatum* et *Croton mauritanus* ont été établies contre le VIH et le CHIKV [325].

En 2011, C. Marodon a réalisé ses travaux de thèse de pharmacie sur *Ayapana triplinervis* afin de mieux caractériser l'espèce (composition chimique, toxicité, mutagénicité) et compléter les données déjà existantes reposant essentiellement sur les usages traditionnels [326].

En 2013, S. Técher a réalisé un criblage d'activité biologique de plantes endémiques ou indigènes de La Réunion à l'aide de tests prédictifs à la recherche d'activités antioxydantes, anti-inflammatoires et antivirales contre le CHIKV [327]. L'espèce *Carissa spinarum* a présenté l'activité cytotoxique la plus significative. Les activités antioxydantes des extraits des espèces *Agarista buxifolia* et *Dryopteris wallichiana* et anti-inflammatoires de ceux des espèces *Stillingia lineata* et *Indigofera amnoxylum* ont été établies. Ces travaux ont aussi permis d'établir les activités antivirales des extraits de *Stillingia lineata* contre le CHIKV [328,329].

En 2015, Ledoux *et al.* ont réalisé une étude phytochimique permettant de démontrer le potentiel antipaludéen de *Zanthoxylum heterophyllum*, plante endémique des Mascareignes, à l'aide de tests prédictifs [330]. En 2018, *Zanthoxylum heterophyllum* et 63 autres espèces endémiques des Mascareignes ont été étudiées pour leur potentiel antioxydant, antipaludéen et antiviral contre le CHIKV [331]. Les extraits de *Casearia coriacea*, *Monimia rotundifolia*, *Poupartia borbonica*, *Psiadia retusa*, *Vernonia fimbriifera* et *Zanthoxylum heterophyllum* ont démontré une activité antipaludéenne. Ceux de *Aphloia theiformis*, *Stillingia lineata*, *Croton mauritanus*, *Indigofera amnoxylum*, et *Securinega durissima* ont démontré une activité antivirale contre le CHIKV. Enfin, les extraits de *Bertiera borbonica*, *Erythroxyton laurifolium*, *Erythroxyton sideroxyloides*, *Indigofera amnoxylum*, *Poupartia borbonica*, *Scolopia heterophylla*, *Sophora denudata*, et *Terminalia bentzoe* ont présenté des activités antioxydantes. En 2019, les activités antimicrobiennes et biocides de 20 plantes endémiques ou indigènes de La Réunion, dont *Peperomia borbonensis* et *Zanthoxylum heterophyllum*, ont été établies contre les tiques *Rhipicephalus microplus* [332]. En 2022, Chawech *et al.* ont publié

une étude portant sur les propriétés antioxydantes de l'extrait aqueux de *Hubertia ambavilla*, plante endémique de La Réunion [333].

Par la suite, plusieurs études ont exploré le potentiel antiviral et anti-inflammatoires de divers extraits végétaux à l'aide de modèles biologiques plus élaborés. Ainsi, les travaux de thèse de M. Ralambondrainy ont porté sur l'activité biologique des huiles essentielles de citronnelle (*Cymbopogon citratus*), de géranium (*Pelargonium graveolens*) et de vétiver (*Vetiveria zizanioides*) de La Réunion, contre le RRV [334]. Ces travaux ont permis de mettre en évidence l'inhibition de la réplication virale et de la réponse pro-inflammatoire des huiles essentielles dans les cellules infectées.

M-E. Clain a évalué l'activité antivirale (contre ZIKV et DENV) d'éco-extraits de 7 plantes médicinales réunionnaises inscrites à la Pharmacopée française : *Antirhea borbonica*, *Aphloia theiformis*, *Ayapana triplinervis*, *Dodonaea viscosa*, *Hubertia ambavilla*, *Mussaenda arcuata* et *Psiloxylon mauritianum* [335–337]. Ces travaux ont démontré l'activité antivirale des extraits à travers l'inhibition de l'attachement viral.

J. Haddad *et al.* ont également démontré l'activité antivirale de l'espèce *Doratoxylon apetalum* contre ZIKV et DENV en interférant avec l'internalisation du virus [338].

Plusieurs espèces ont aussi été décrites pour d'autres activités, comme *Phyllanthus phillyreifolius* [339,340] et *Aphloia theiformis* [341], ainsi que *Antirhea borbonica*, *Ayapana triplinervis*, *Dodonaea viscosa*, et *Terminalia bentzoe* pour leurs activités antioxydantes et anti-inflammatoires [342].

E. Checkouri a évalué la bioactivité d'extraits riches en polyphénols de huit plantes médicinales réunionnaises, dans un contexte de maladie cardiovasculaire : *Hubertia ambavilla*, *Ayapana triplinervis*, *Dodonaea viscosa*, *Aphloia theiformis*, *Hypericum lanceolatum*, *Pelargonium graveolens*, *Syzygium cumini* et *Psiloxylon mauritianum* [343–345].

Les travaux de M. Marimoutou ont permis d'établir les effets antioxydants et anti-inflammatoire des extraits de *Antirhea borbonica*, *Doratoxylon apetalum* et *Gouania mauritiana* [346,347]. B. Veeren a décrit les effets néphroprotecteurs (antioxydant, anti-inflammatoire et anti-fibrosant) des polyphénols présents dans la plante médicinale *Antirhea borbonica* [348,349] ; J. Bonneville leurs activités antioxydantes et cytoprotectives [350] ; F. Le Sage, leurs activités anti-inflammatoires et antioxydantes [351] et J. Taïlé leurs effets sur les dérégulations métaboliques *in vivo* chez la souris obèse [352]. B. Ghaddar a étudié les effets

protecteurs de *Antirhea borbonica* et *Psiloxylon mauritianum* dans un modèle *in vivo* de maladies métaboliques (surpoids et hyperglycémie) [353].

Jusqu'ici, bien que l'ensemble de ces données souligne l'intérêt des plantes réunionnaises comme antivirales et anti-inflammatoires, hormis les travaux de M. Ralambondrainy [334], aucune étude approfondie de l'activité biologique des plantes issue de la biodiversité réunionnaise n'a encore été réalisée pour l'infection par les alphavirus.

Depuis les premières inscriptions à la Pharmacopée française, divers travaux relatifs à l'étude de la composition chimique d'extraits végétaux, ainsi qu'à l'évaluation d'activités biologiques diverses, ont été réalisés. Cependant, l'apport de preuves scientifiques pour valider leurs usages traditionnels et, de manière plus globale, d'attester du potentiel thérapeutique des espèces végétales réunionnaises, reste encore insuffisant. La réalisation de travaux de recherche à l'aide de modèles biologiques adaptés est donc nécessaire pour valider le potentiel thérapeutique de ces plantes et des molécules qu'elles renferment.

Afin de contribuer, de manière nouvelle, à la caractérisation des espèces végétales de La Réunion, il a donc été envisagé de réaliser l'évaluation biologique d'extraits susceptibles de contenir les types d'alcaloïdes choisis pour ces travaux, respectivement *Argemone mexicana* Linn pour la berbérine, *Sophora denudata* Bory pour la matrine et *Tabernaemontana mauritiana* Lam. pour la tabersonine. De plus, une étude phytochimique a été entamée, dans la perspective de caractériser chimiquement ces espèces et notamment de confirmer la présence d'alcaloïdes dans leurs extraits.

## **II. Les espèces végétales étudiées**

### **1. Sélection des espèces locales**

L'objectif principal était d'évaluer les activités biologiques d'espèces végétales susceptibles de renfermer des alcaloïdes, afin de pouvoir les comparer à celles observées avec des structures chimiques de référence (**Chapitre 4**). Les travaux ont donc été réalisés à partir d'espèces présentes sur le territoire réunionnais et susceptibles de renfermer les alcaloïdes précédemment choisis (berbérine, matrine, tabersonine) et/ou des alcaloïdes appartenant aux classes correspondantes (isoquinoléine, quinolizidine, indole).

La berbérine est un alcaloïde fréquemment caractérisé dans plusieurs espèces, genres et familles botaniques. Selon les données de la littérature, à La Réunion, quelques espèces des familles

Annonaceae (genres *Xylopia*, *Rolliania*), Rutaceae (genres *Melicope*, *Zanthoxylum*) et Papaveraceae (*Argemone*, *Bocconia*, *Papaver*) pourraient contenir de la berbérine [354]. Cet alcaloïde est décrit pour une seule espèce envahissante exotique de La Réunion, *Argemone mexicana* Linn [355,356]. Si, localement, aucune autre espèce n'est décrite comme susceptible de renfermer de la berbérine, des espèces appartenant aux genres cités précédemment sont présentes, comme *Xylopia richardii* Boivin ex Baill. (Bois de banane) ou *Zanthoxylum heterophyllum* (Lam.) Sm. (Bois de poivre).

La matrine ainsi que plusieurs autres alcaloïdes quinolizidiniques ont été identifiés dans les extraits de diverses espèces appartenant au genre *Sophora*. Celles-ci sont largement étudiées et utilisées pour traiter différents maux (problèmes gastro-intestinaux, hémorroïdes, hypertension, ...) [357]. A La Réunion, seule l'espèce *Sophora denudata* Bory est présente. Cette espèce réunionnaise a déjà été étudiée et la présence de la matrine a déjà été établie [309,319,358,359].

Dans la famille des Apocynaceae, plusieurs espèces, comme celles du genre *Tabernaemontana*, sont décrites comme contenant principalement des alcaloïdes indoliques [360–362]. A La Réunion plusieurs espèces sont retrouvées et notamment l'espèce *Tabernaemontana mauritiana*.

Cette étude s'est alors focalisée sur trois espèces locales, *Argemone mexicana* Linn pour la berbérine, *Sophora denudata* Bory pour la matrine et *Tabernaemontana mauritiana* Lam. pour la tabersonine.

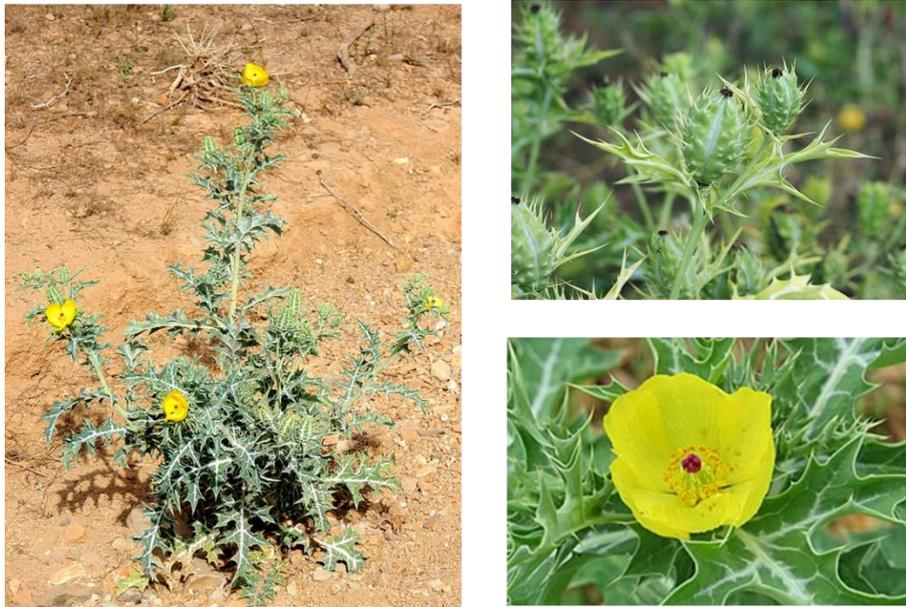
#### (a) Données relatives aux espèces sélectionnées

Le nombre et la diversité des données de la littérature, concernant les espèces sélectionnées, sont variables, en raison de descriptions plus ou moins approfondies déjà réalisées antérieurement. Si les descriptions botaniques sont précises, les données chimiques, biologiques et thérapeutiques sont moins fréquentes et varient selon l'espèce.

- *Argemone mexicana* Linn.

L'espèce *Argemone mexicana* Linn. appartient à la famille des Papaveraceae et à l'ordre des Ranunculales. Il s'agit d'une espèce exotique, souvent naturalisée et connue à La Réunion sous le nom de « Chardon ». Elle est originaire d'Amérique du Sud (Mexique), mais est aujourd'hui largement répandue dans les régions chaudes (tropicales et subtropicales). A La Réunion, elle est présente dans les zones sèches sous le vent et dans l'arrière du littoral. *Argemone mexicana* est une plante herbacée aux racines fibreuses, avec une tige droite, cylindrique, rameuse

(composée de petites branches) et feuillée garnie de petites épines (**Fig. 34**). Ses feuilles ont une forme allongée, des bords découpés, anguleux et épineux. Les fleurs sont solitaires, jaunes, terminales et pédonculées (retrouvée au bout d'une tige). Le fruit est une capsule épineuse allongée et ovoïde pouvant renfermer jusqu'à 400 graines [363].



**Figure 34.** Photos descriptives de l'espèce *Argemone mexicana* Linn d'après [364].

C'est une plante riche en alcaloïdes et toutes ses parties sont toxiques. Malgré cela, *Argemone mexicana* Linn. est utilisée comme plante médicinale partout dans le monde [355,365,366]. En 2020, ses divers usages en médecine traditionnelle et propriétés étaient décrits au travers de plus de 109 références [365]. A La Réunion, toute la plante est utilisée, principalement en usage externe en raison de sa toxicité potentielle. En usage interne, la plante entière est utilisée pour éliminer les impuretés du sang, les racines pour soigner les troubles urinaires. En usage externe, les feuilles sont utilisées pour traiter les hémorroïdes. Le latex produit par la plante est aussi utilisé pour éliminer les verrues [367].

En Inde, cette plante est utilisée depuis plus de 5000 ans pour traiter différents maux en usage interne, tels que les troubles du système digestif ou encore les maladies respiratoires, mais aussi comme analgésique, anti-inflammatoire et antibactérien [365]. Depuis, des travaux de recherche sont menés pour valider ces savoirs ancestraux (**Tableau 4**). *Argemone mexicana* Linn est surtout décrit pour ses propriétés antibactériennes, antioxydantes et anti-inflammatoires.

*Argemone mexicana* Linn contient principalement des alcaloïdes, notamment des isoquinoléines comme la berbérine, mais aussi des composés phénoliques [355,356].

**Tableau 4.** Principales activités biologiques décrites pour *Argemone mexicana*.

Partie(s) utilisée(s) et préparation	Composés isolés et/ou identifiés	Usages / Activités / Effets	Réf.
Feuilles, tiges, fleurs et fruits (extraits acétate d'éthyle, hexane, eau et méthanol)		Anti-oxydant, antibactérien et antiviral (VIH)	[368]
Feuilles (extrait éthanol)		Anti-inflammatoire et analgésique ( <i>in vivo</i> , souris)	[369]
Fruit (fraction acétate d'éthyle réalisé à partir d'extrait brut)	Terpènes, flavonoïdes, alcaloïdes, tanins, glycosides, stéroïdes	Cicatrisant et anti-inflammatoire ( <i>in vivo</i> , rat)	[370]
Plante entière (extrait méthanol)	Alcaloïdes (benzo[ <i>c</i> ]phénanthridine (±)-6-acétonyldihydrochélérythrine)	Antiviral (VIH)	[371]
Racines (extrait éthanol)	-	Antioxydant	[372]
Fruits (extraits acétone, chloroforme et méthanol)		Antioxydant et antimutagène	[373]
Feuilles (extraits méthanol, chloroforme et éther de pétrole)		Antibactérien	[374]
Tige (extraits <i>n</i> -hexane, chloroforme, acétate d'éthyle et éthanol)		Antibactérien	[375]
Graines (Extrait chloroforme)	Alcaloïdes et flavonoïdes	Antibactérien	[376]
Fruits (Extrait brut méthanol)		Antibactérien	[377]
(Extrait brut éthanol)		Antibactérien	[378]
(Extrait eau)		Antibactérien	[379]
Feuilles (extraits acétone, méthanol, éthanol et eau)		Antibactérien	[380]
Feuilles, grains et racines (extraits eau, acétone, éthanol et chloroforme)		Antibactérien	[381]
Parties aérienne et racines (huiles essentielles)		Antibactérien et antifongique	[382]
Graines (extrait chloroforme)	Stéroïdes et terpénoïdes	Antibactérien	[383]
Extrait méthanol		Cytotoxique	[384]
Partie aérienne (extrait chloroforme)	Alcaloïdes (N-déméthylxysanguinarine, pancorine, (+)-argénaxine, (+)-higénamine, (+)-réticuline, angolone et chélérythrine)	Cytotoxique	[385]
Extrait éthanol		Antitumoral	[386]
Feuilles (extrait méthanol)		Antitumoral	[387]
Partie aérienne (extrait eau)		Anti-diabétique	[388]
Partie aérienne (extrait hydro-alcoolique)		Anti-diabétique	[389]
Feuille (poudre)		Anti-hépatotoxique	[390]

**Tableau 4.** *Suite et fin.*

Extrait acétate d'éthyle		Anti-hépatotoxique ( <i>in vivo</i> , rat)	[391]
Feuilles (extrait éthanol et extrait enrichi en alcaloïdes)		Anxiolytique ( <i>in vivo</i> , rat)	[392]

- *Sophora denudata* Bory

*Sophora denudata* Bory est une espèce appartenant à la famille des Fabaceae et à l'ordre des Fabales [294,393,394]. *Sophora denudata* Bory est connue à la Réunion sous le nom de « Petit tamarin des hauts », « Tamarin blanc des hauts » ou encore « Tamarin rouge des Hauts », sans doute à cause de la ressemblance de ses feuilles avec celles du « Tamarin des Hauts » (*Acacia heterophylla*) [393]. C'est une espèce endémique de La Réunion, classée « en danger » [395] et protégée par l'arrêté ministériel du 27 octobre 2017.

Cette espèce est présente dans les forêts de moyenne altitude, à partir de 1400 m d'altitude. *Sophora denudata* est un petit arbre de 3 à 10 m de haut avec un tronc tortueux (Fig. 34). Ses feuilles de couleur gris-bleuté sont constituées de 7 à 15 paires de folioles alternées. Les inflorescences forment des grappes de 8 à 16 fleurs jaunes dorées ayant des parties sexuées hermaphrodites. Les fruits sont des gousses indéhiscentes recouvertes de duvet et ornées de 4 ailes crénelées [393].



**Figure 35.** Photos descriptives de l'espèce *Sophora denudata* d'après [364].

Le genre *Sophora* regroupe une cinquantaine d'espèces, principalement présentes en Eurasie et Amérique du Nord, mais aussi en Amérique du Sud, Pacifique, Australie et océan Indien (régions et forêts tropicales avec saison sèche). Plusieurs espèces sont présentes dans les

Mascareignes. Les alcaloïdes quinolizidiniques sont les principales molécules actives produites par les espèces du genre *Sophora*, mais des flavonoïdes, prénylés ou non et des isoflavonoïdes sont également présents [357]. La présence d'alcaloïdes, notamment la matrine et l'oxymatrine chez *Sophora denudata* Bory, a déjà été détectée lors d'un criblage phytochimique réalisé sur la poudre de la plante, à l'aide de réactifs de détection caractéristiques des alcaloïdes [308,309,319]. Ceci a été récemment confirmé par des travaux réalisés au sein du laboratoire Chembiopro [358]. D'autres espèces du genre *Sophora* présentent des activités intéressantes, indiquées dans le **Tableau 5** : *Sophora flavescens*, *S. victifolia*, *S. japonica*, *S. pachycarpa*, *S. moorcroftiana*.

L'usage d'espèces du genre *Sophora* est très répandu dans le monde, notamment pour des propriétés anti-inflammatoire, antioxydante, antibactérienne, antifongique et antivirale [357]. A La Réunion, peu d'usages sont cités pour *Sophora denudata* Bory, l'espèce étant a priori utilisée pour traiter des maladies de la peau, voire le cancer de la peau [310]. Les espèces du genre *Sophora* sont largement utilisées traditionnellement. Par exemple dans la médecine traditionnelle chinoise, *S. flavescens*, *S. tonkinensis* et *S. alopecuroides* sont régulièrement utilisées pour soigner différents maux comme la fièvre, la dysenterie, l'asthme, ou encore les problèmes de peau tels que l'eczéma ou les brûlures [396].

**Tableau 5.** Principales activités biologiques décrites pour des espèces du genre *Sophora*.

Espèces	Partie(s) utilisée(s) et préparation	Composés isolés et/ou identifiés	Usages / Activités / Effets	Réf.
<i>Sophora denudata</i>	Feuilles (extraits acétone, éthanol, eau)		Antihypertensif et antidiurétique	[320]
	Feuilles et graines (extrait dichlorométhane et méthanol)		Anti-oxydant	[397]
	Ecorce (extrait acétate d'éthyle)		Acaricide, antibactérien, antioxydante	[331,332]
<i>Sophora flavescens</i>	Entière (extrait acétate d'éthyle)		Antioxydant, anti-inflammatoire, antidiabétique	[357]
	Extrait eau		Anti-inflammatoire	
	Racines		Antioxydant, activité immunomodulatrice, cytotoxique	
	Racines (extrait acétate d'éthyle)		Anti-diabétique	
	Racines (extrait eau-éthanol)		Antitumorale	[398]
	Racines (eau-acide sulfurique)	Alcaloïde ((+)-12a-hydroxysophocarpine)		Anti-HBV

**Tableau 5. Suite et fin.**

Espèces	Partie(s) utilisée(s) et préparation	Composés isolés et/ou identifiés	Usages / Activités / Effets	Réf.
<i>Sophora flavescens</i>		Alcaloïdes (anagrine, oxymatine et sophoranol)	Anti-RSV	[400]
<i>Sophora viciifolia</i>	Fleurs		Anti-oxydant	[357]
<i>Sophora japonica</i>	Racines (extrait méthanol)		Cytotoxique	[357]
	Fleurs (huile essentielle)		Antibactérien	[357]
	Fleurs (extrait éthanol)		Anti-diabétique	[357]
<i>Sophora pachycarpa</i>	Racines (extraits acétate d'éthyle, dichlorométhane)		Antiproliférative	[357]
<i>Sophora moorcroftiana</i>	Parties aériennes (extrait éthanol)		Antibactérien	[357]
	Graines (extrait éthanol)		Antiparasitaire	[357]
	Graines (extrait éthanol)		Antitumorale ( <i>in vivo</i> , souris)	[401]
	Graines (extrait éthanol)		Antitumorale	[402]
<i>Sophora tonkinensis</i>		Alcaloïde (de type matrine)	Antivirale	[403]
<i>Sophora exigua</i>		Composé phénolique (sophoraflavanone G)	Antimicrobien	[404]
		Composés phénoliques (kurarinone, sophoraflavanone G et kuraridine)	Antimicrobien	[405]
		Composés phénoliques (kuraridine, sophoraflavanone D et sophoraisoflavanone A)	Antimicrobien	[406]

- *Tabernaemontana mauritiana* Lam.

L'espèce *Tabernaemontana mauritiana* Lam. appartient à la famille des Apocynaceae et à l'ordre des Gentianales. Elle est connue sous le nom de « Bois de Lait » ou « Petit Bois de Lait » en raison de la richesse en latex de ses tissus végétaux. C'est une espèce indigène et endémique des Mascareignes (Maurice et La Réunion), classée quasiment en danger et présente en région humide ou sèche, à basse altitude [395,407,408].

*Tabernaemontana mauritiana* Lam. est un arbuste à ramifications dichotomiques de 4 à 5 m de hauteur, avec un tronc de 20 cm à 30 de diamètre couvert d'une écorce rugueuse (Fig. 35). Les

feuilles sont simples, opposées, entières et pétiolées. Le limbe est elliptique, obtu, aigu à acuminé (pointe fine et allongée) au sommet, en coin, arrondi ou parfois décurrent à la base. La nervure médiane blanche, plate à canaliculée en dessus est proéminente en dessous. Les nervures latérales parallèles sont plus ou moins saillantes sur les deux faces. Les inflorescences sont en cymes axillaires. Les fleurs sont bisexuées blanches à jaunâtres et odorantes. Les pétales sont fusionnés en tube puis divisées en une étoile à 5 branches sinueuses. Les fruits sont composés de deux follicules verts et lisses, contenant de nombreuses graines brunes [407].



**Figure 36.** Photos descriptives de l'espèce *Tabernaemontana mauritiana* [364].

Les espèces de la famille des Apocynaceae sont généralement caractérisées par la présence d'alcaloïdes, notamment indoliques. Le genre *Tabernaemontana* regroupe plus de 100 espèces, renfermant des alcaloïdes, principalement indoliques, mais aussi des lactones sesquiterpéniques, des stéroïdes et des flavonoïdes [409]. L'espèce *Tabernaemontana mauritiana* a déjà été décrite comme plante à alcaloïdes [309] et était utilisée auparavant contre la blennorragie, la dysenterie, ou encore comme vermifuge et astringent [410,411]. Plusieurs espèces du genre *Tabernaemontana* ont démontré des potentiels activités biologiques présentés dans le **Tableau 6, ci-après.**

**Tableau 6.** Activités biologiques décrites pour des espèces du genre *Tabernaemontana*.

Espèce	Partie utilisée et préparation	Composés isolés	Usages / Activités / Effets	Réf.
<i>Tabernaemontana catharinensis</i>	Partie aérienne (extrait éthanol)	Alcaloïdes (16-épi-affinine, coronaridine-hydroxyindolénine, voachalotine, voacristine-hydroxyindolénine, 12-méthoxy-N-méthyl-voachalotine, dérivé de voacristine ou voacangine)	Anticholinestérase	[412]
<i>Tabernaemontana divaricata</i>	Extraits bruts de feuilles, d'écorce et de fleurs		Antibactérien	[360]
	Fleurs, feuilles, écorce, racine	Alcaloïdes (19,20-dihydrotabernamine, 19,20-dihydroervahanine A, conodurine, et tabernaélégantine A)	Anticholinestérase	[413]
<i>Tabernaemontana ventricosa</i>			Fièvre, hypertension, cicatrisation	[414]
	Feuilles, tiges et exsudat de latex (extraits chloroforme extrait méthanol)		Antioxydant	
<i>Tabernaemontana pandacaqui</i>	Racine (décoction)		Anti-douleur et anti-inflammatoire	[415]
	Tige (extrait alcoolique et fraction alcaloïdes totaux)		Anti-inflammatoire, antipyrétique et antinociceptif ( <i>in vivo</i> )	
<i>Tabernaemontana ventricosa</i> et <i>Tabernaemontana pandacaqui</i>	Extrait éthanolique		Analgésique et antipyrétique	[416]
<i>Tabernaemontana elegans</i>	Racine	Alcaloïdes (drégamine et voacangine)	Antimicrobien	[417]

### III. Traitements du matériel végétal

#### 1. Collecte et échantillonnage du matériel végétal

Pour les trois espèces étudiées, la matière végétale a été récoltée sur plusieurs sites de l'île et botaniquement identifiée par le Pr Dominique Strasberg de l'UMR PVBMT (Peuplement Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical) de l'Université de La Réunion. Un échantillon de chaque espèce a été déposé à l'Herbier de l'Université. Les plantes ont été séchées puis

broyées (la plante entière pour *A. mexicana* et seulement les feuilles pour *S. denudata* et *T. mauritiana*), afin de permettre le traitement ultérieur de poudres végétales. Les détails de collecte et d'échantillonnage de la matière végétale sont précisés en **Méthode 9** de la partie « Matériel et Méthodes ».

Les poudres végétales obtenues ont, par la suite, été extraites à l'aide de deux méthodes, afin d'obtenir leurs extraits bruts éthanoliques et extraits alcaloïdes totaux.

#### (a) Extraits bruts éthanoliques

Les extraits bruts éthanoliques ont été réalisés à l'aide d'un extracteur de type Soxhlet, au laboratoire Chembiopro. Il s'agit d'une extraction à chaud, à la température de reflux du solvant. La redistillation en continu du solvant permet d'extraire la matière végétale, contenue dans une cartouche, par percolation avec du solvant renouvelé et, parallèlement, de concentrer, dans le ballon, un résidu extractif liquide progressivement concentré. L'extraction a été conduite avec 750 mL de solvant pendant 3 heures. La méthode utilisée est détaillée dans la partie « Matériel et Méthodes », **Méthode 10**.

**Tableau 7.** Bilan des extraits bruts éthanoliques.

Espèce	Partie utilisée	Masse initiale	Masse récupérée	Rendement
<i>Argemone mexicana</i>	Plante entière	30 g	3,05 g	10,1%
<i>Sophora denudata</i>	Feuilles		1,4 g	4,7%
<i>Tabernaemontana mauritiana</i>			5,05 g	16,8%

#### (b) Extraits « alcaloïdes totaux »

Du fait de leurs propriétés physico-chimiques diverses, les alcaloïdes peuvent être extraits selon différentes procédures, la plupart d'entre elles étant fondées sur les propriétés particulières de ces composés. De manière générale, les formes bases libres sont solubles dans les solvants organiques, tandis que les formes salines sont hydrosolubles. A partir des extraits bruts éthanoliques réalisés, un second type d'extraction a été effectué pour obtenir des extraits « alcaloïdes totaux » des trois espèces.

La réalisation d'une extraction d'alcaloïdes peut être perturbée par la formation d'émulsions à cause de la présence de composés tels que les graisses, les cires, les terpènes, les pigments ou encore les substances lipophiles. Ainsi, une étape de « délipidation » à l'aide de solvants apolaires est parfois nécessaire avant l'extraction « alcaloïdes totaux ». L'acétate d'éthyle a été

alors utilisé pour diminuer la quantité de composés apolaires dans la matière végétale à extraire. L'extraction « alcaloïdes totaux » des végétaux est fondée sur la basicité des alcaloïdes ainsi que leur présence sous forme de sels au sein des plantes. Les bases sont en général peu ou non hydrosolubles, mais solubles dans les solvants organiques apolaires et les alcools de titre élevé. Grâce à leur basicité, les alcaloïdes peuvent former des sels avec des acides qui sont eux solubles dans l'eau et les alcools dilués et insolubles dans les solvants organiques. L'extraction « alcaloïdes totaux » peut être réalisée en milieu basique ou acide. En milieu alcalin, les bases sont libérées de leur combinaison saline, puis solubilisées dans un solvant organique, chloré par exemple. L'extrait est ensuite concentré par évaporation du solvant. En milieu acide, une solution aqueuse acide est utilisée pour faire passer tous les alcaloïdes à l'état de sels solubles de l'acide employé. Les alcaloïdes sont ensuite libérés par alcalinisation de la solution et extraits avec un solvant organique. L'extrait est ensuite concentré par évaporation du solvant [170].

Dans cette étude nous avons d'abord resolubilisé l'extrait dans une solution aqueuse diluée d'acide sulfurique, puis procédé aux étapes successives de « délipidation » à l'aide de l'acétate d'éthyle (AcOEt) et d'alcalinisation avec une solution saturée d'hydrogencarbonate de sodium (NaHCO<sub>3</sub>). La solution a ensuite été desséchée à l'aide d'une solution de sulfate de magnésium (MgSO<sub>4</sub>), filtrée et concentrée par évaporation. La méthode utilisée est détaillée dans la partie « Matériels et Méthodes », **Méthode 11**.

**Tableau 8.** Bilan de rendement massique des extraits « alcaloïdes totaux » (AT)

Espèce	Masse d'extrait EtOH initial	Masse d'extrait AT final	Rendement
<i>Argemone mexicana</i>	2 g	240 mg	12%
<i>Sophora denudata</i>	1,3 g	19,5 mg	1,5%
<i>Tabernaemontana mauritiana</i>	3 g	20,9 mg	0,7%

#### IV. Evaluation biologique des extraits végétaux

L'évaluation des activités biologiques d'intérêt des extraits bruts éthanoliques et « alcaloïdes totaux » des trois plantes précédemment étudiées a été réalisée. Pour cela, les extraits ont été évaporés puis remis en solution dans du DMSO après avoir vérifié au préalable sa non cytotoxicité sur les cellules.

La tolérance des cellules HS633T aux extraits réalisés a d'abord été étudiée par les tests LDH et MTT. Les extraits bruts végétaux ont ensuite été appliqués en co-traitement pendant 24 h aux cellules HS633T infectées avec le ONNV à une MOI 1.

Le potentiel antioxydant a été par les tests de Folin-Ciocalteu et ORAC. L'activité antivirale des composés en mélange dans l'extrait a été déterminée par la mesure de l'expression des gènes codant pour les protéines virales d'intérêt (E1, E2, capsid et nsP2) avec la méthode qRT-PCR. La modulation des réponses antivirale et inflammatoire de la cellule-hôte a été également étudiée au travers de l'expression des gènes codant pour les récepteurs (MXRA8, RIG-I), les composants de la voie des interférons de type 1 (IRF3, IFN- $\beta$  et ISG15), les acteurs du processus d'autophagie (PI3K, AMPK) et les acteurs de l'inflammation (CCL2, CCL5 et TNF- $\alpha$ , MAPK, STAT3, NLRP3 et Caspase-1), déjà étudiés dans les chapitres précédents.

Les résultats des expériences sont présentés comme la moyenne de trois expériences indépendantes  $\pm$  erreur standard de la moyenne. La valeur  $p$  a été calculée en utilisant le test Bonferroni de comparaison multiple par rapport à la quercétine [ \$:  $p < 0,05$  et \$\$\$\$:  $p < 0,0001$  ] ; aux cellules non traitées (CTRL) [\*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$  ] ou aux cellules infectées (ONNV) [# :  $p < 0,05$ , ## :  $p < 0,01$ , ### :  $p < 0,001$ , #### :  $p < 0,0001$ ]. Les variations relatives des niveaux d'expression (FC : *fold change*) ont été calculées par rapport aux cellules non infectées et non traitées (CTRL).

### 1. Activité antioxydante

Au cours d'une infection virale, la balance rédox est affectée et son contrôle permet de limiter l'infection au sein de la cellule, en maintenant les fonctions intracellulaires intactes [418]. Le test de Folin-Ciocalteu a été utilisé pour doser la quantité de composés phénoliques contenus, exprimée en « micromolaire équivalent acide gallique » ( $\mu\text{M AGE}$ ) dans chacun des extraits, et le test ORAC pour évaluer le potentiel antioxydant, exprimé en « micromolaire équivalent Trolox » ( $\mu\text{M equiv. Trolox}$ ) des échantillons à une concentration de  $10 \mu\text{M AGE}$ . Ces méthodes sont détaillées dans le « Matériel et Méthodes », **Méthodes 7 et 8**. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 9, ci-après**. La quercétine, composé phénolique, a été utilisée comme antioxydant de référence.

Le test de Folin-Ciocalteu met en évidence des teneurs variables de composés phénoliques pour les extraits étudiés, avec les extraits AT qui présentent les valeurs plus élevées que les extraits Eth. Les valeurs obtenues ont permis de définir une concentration d'extrait à utiliser pour les tests biologiques, soit  $10 \mu\text{M AGE}$  de composés phénoliques. D'après le test ORAC, seul l'extrait éthanolique de *Sophora denudata* ( $110,24 \pm 2,37 \mu\text{M éq. Trolox}$ ) présente un pouvoir anti-oxydant comparable à celui de la quercétine ( $111,75 \pm 1,22 \mu\text{M éq. Trolox}$ ).

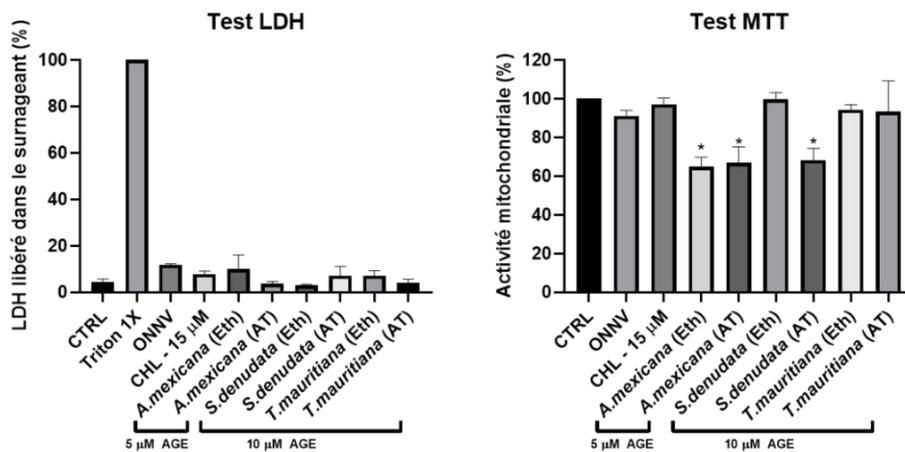
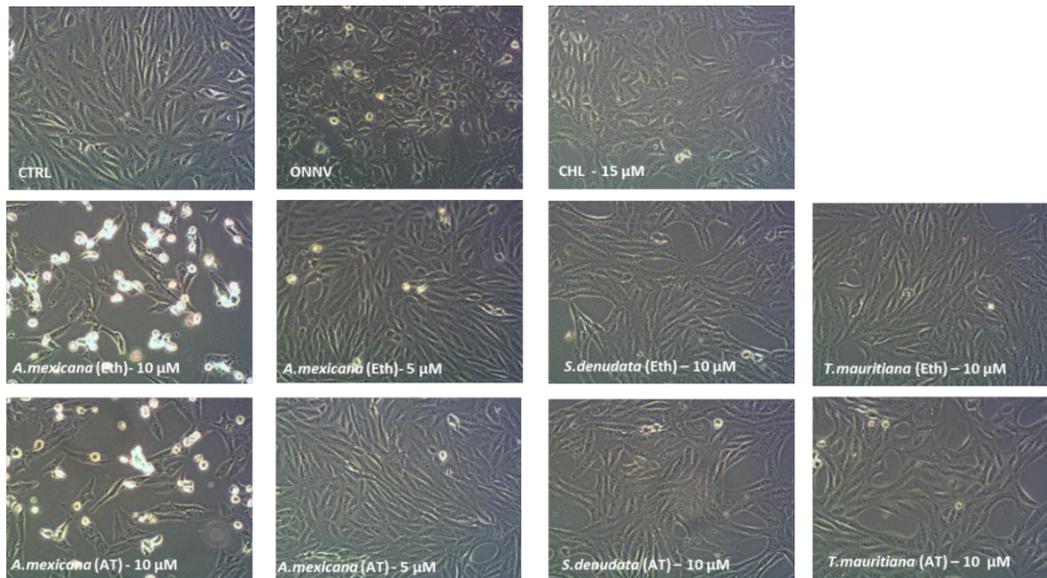
**Tableau 9.** Potentiel anti-oxydant des extraits réalisés (Eth : extrait brut éthanolique ; AT : extrait « alcaloïdes totaux »). \$\$\$\$ :  $p < 0,0001$  comparé à la quercétine. (n=3, test de Bonferroni).

Échantillon	Folin ( $\mu\text{M}$ équivalent acide gallique)	ORAC ( $\mu\text{M}$ équivalent Trolox)
Quercétine	-	111,75 $\pm$ 1,22
<i>A. mexicana</i> (Eth)	314,04 $\pm$ 11,54	44,05 $\pm$ 1,73\$\$\$\$
<i>A. mexicana</i> (AT)	388,96 $\pm$ 11,03	28,64 $\pm$ 0,89\$\$\$\$
<i>S. denudata</i> (Eth)	1077,72 $\pm$ 33,70	110,24 $\pm$ 2,37
<i>S. denudata</i> (AT)	2158,23 $\pm$ 227,16	88,70 $\pm$ 0,57\$\$\$\$
<i>T. mauritiana</i> (Eth)	972,53 $\pm$ 33,23	58,88 $\pm$ 2,34\$\$\$\$
<i>T. mauritiana</i> (AT)	6213,94 $\pm$ 371,17	65,55 $\pm$ 2,45\$\$\$\$

## 2. Cytotoxicité

Une étude de cytotoxicité a été effectuée sur une durée de 24 h sur les cellules HS633T, pour le ONNV à une MOI 1, la chloroquine à une concentration de 15  $\mu\text{M}$  et les extraits bruts éthanoliques et « alcaloïdes totaux » à une concentration de 10 et 5  $\mu\text{M}$  AGE pour *Argemone mexicana* et de 10  $\mu\text{M}$  AGE pour *Sophora denudata* et *Tabernaemontana mauritiana*. La cytotoxicité a été déterminée par microscopie et par les tests LDH et MTT. Les résultats sont présentés en **Figure 37, ci-après**.

Par rapport aux cellules-contrôles non infectées et non traitées (CTRL), l'observation en microscopie (**Fig. 37A**) révèle un changement morphologique pour les cellules infectées (ONNV) et les cellules infectées et traitées avec les extraits d'*Argemone mexicana* Eth et AT à une concentration de 10  $\mu\text{M}$  AGE. En effet, pour ces conditions une importante mort cellulaire est observée. Avec une concentration réduite à 5  $\mu\text{M}$  AGE pour ces deux extraits, aucun changement morphologique ou mort cellulaire n'a été observé. Les tests LDH et MTT ont été alors réalisés avec les concentrations tolérables de chaque extrait avec les résultats présentés **Fig. 37B**. Le test LDH ne révèle aucune toxicité du virus ou des extraits appliqués sur les cellules infectées. En revanche, le test MTT met en évidence une diminution significative de l'activité mitochondriale pour les extraits d'*Argemone mexicana* Eth et AT et de *Sophora denudata* AT (\*:  $p < 0,05$ ). Pour la suite des expérimentations, la chloroquine a été alors appliquée à une concentration de 15  $\mu\text{M}$ , les extraits d'*Argemone mexicana* à une concentration de 5  $\mu\text{M}$  AGE et les extraits de *Sophora denudata* et *Tabernaemontana mauritiana* à une concentration de 10  $\mu\text{M}$  AGE.



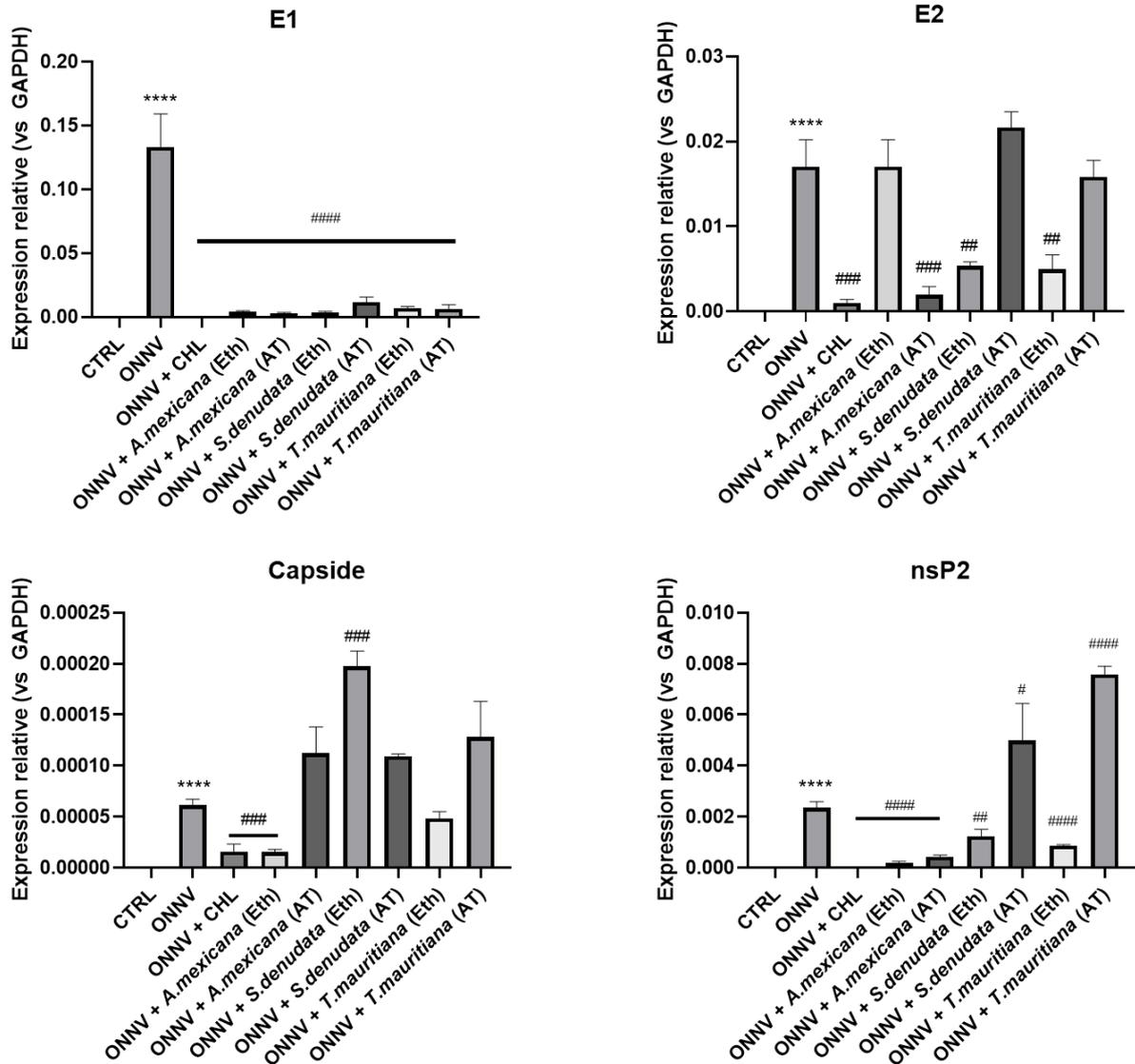
CTRL : cellules non infectées et non traitées  
 ONNV : cellules infectées et non traitées  
 CHL : cellules infectées et traitées à la chloroquine à 15 μM  
 Eth : extrait éthanolique  
 AT : extrait « alcaloïdes totaux »  
 A. mexicana : *Argemone mexicana*  
 S. denudata : *Sophora denudata*  
 T. mauritiana : *Tabernaemontana mauritiana*

**Figure 37.** Viabilité des cellules HS633T après infection par ONNV ou traitement par les extraits de *A. mexicana*, *S. denudata* et *T. mauritiana*.

(A) : observation microscopique ; (B) : tests colorimétriques. Traitement seul, CHL 15 μM ; extraits *A. mexicana* 5 μM AGE et extraits *S. denudata* et *T. mauritiana* 10 μM AGE ; ONNV MOI=1. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$  comparé aux cellules non infectées et non traitées (CTRL) ou # :  $p < 0,05$ , ## :  $p < 0,01$ , ### :  $p < 0,001$ , #### :  $p < 0,0001$  comparé aux cellules infectées (ONNV). (n=3, test de Bonferroni).

### 3. Effets des extraits sur l'expression des gènes viraux

En utilisant la chloroquine comme référence, les effets des extraits végétaux ont été étudiés sur l'expression des gènes viraux, par qRT-PCR, avec les résultats présentés en **Figure 38**.



**Figure 38.** Effets des extraits de *A. mexicana*, *S. denudata* et *T. mauritiana* sur l'expression des gènes viraux.

Traitement et infection simultanés, CHL 15  $\mu\text{M}$  ; extraits *A. mexicana* 5  $\mu\text{M}$  AGE et extraits *S. denudata* et *T. mauritiana* 10  $\mu\text{M}$  AGE ; ONNV MOI=1. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$  comparé aux cellules non infectées et non traitées (CTRL) ou # :  $p < 0,05$ , ## :  $p < 0,01$ , ### :  $p < 0,001$ , #### :  $p < 0,0001$  comparé aux cellules infectées (ONNV). (n=3, test de Bonferroni).

Comme cela a déjà démontré précédemment (**Chapitres 3 et 4**), les cellules HS633T sont infectées au bout de 24 h, ceci étant révélé ici par l'expression significative des gènes viraux (E1 :  $1,33 \pm 0,77 \times 10^{-1}$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$  ; E2 :  $1,70 \pm 0,98 \times 10^{-2}$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  ; capsid : 6,13

$\pm 3,54 \times 10^{-5}$ , \*\*\*:  $p < 0,0001$  ; nsP2 :  $2,35 \pm 0,24 \times 10^{-3}$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ), par rapport aux cellules-contrôles (CTRL).

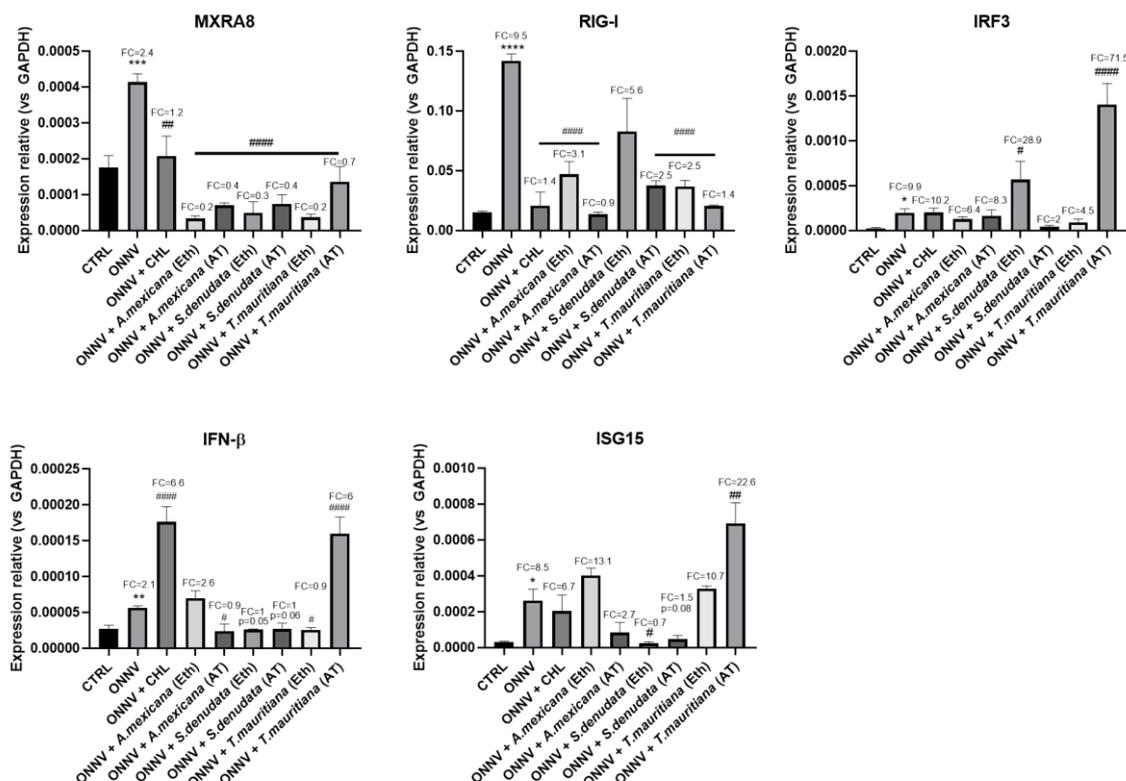
L'effet de la chloroquine sur l'expression des gènes viraux se traduit par la diminution de l'expression des gènes codant pour les protéines virales (E1 :  $3,76 \pm 2,17 \times 10^{-4}$ , ### :  $p < 0,001$ ; E2 :  $1,00 \pm 0,58 \times 10^{-3}$ , ### :  $p < 0,001$ ; capsid :  $1,60 \pm 0,92 \times 10^{-5}$ , ## :  $p < 0,01$  ; nsP2 :  $7,57 \pm 5,62 \times 10^{-6}$ , # :  $p < 0,05$ ). Tous les extraits testés réduisent de manière significative l'expression du gène codant pour la protéine virale E1 (*A. mexicana* Eth :  $3,93 \pm 2,27 \times 10^{-3}$ , ##### :  $p < 0,0001$  ; *A. mexicana* AT :  $2,70 \pm 1,56 \times 10^{-3}$ , ##### :  $p < 0,0001$  ; *S. denudata* Eth :  $3,27 \pm 1,89 \times 10^{-3}$ , ##### :  $p < 0,0001$  ; *S. denudata* AT :  $1,16 \pm 0,67 \times 10^{-2}$ , ##### :  $p < 0,0001$  ; *T. mauritiana* Eth :  $7,09 \pm 4,09 \times 10^{-3}$ , ##### :  $p < 0,0001$  ; *T. mauritiana* AT :  $6,38 \pm 3,69 \times 10^{-3}$ , ##### :  $p < 0,0001$ ). Pour l'expression du gène viral E2, l'extrait « alcaloïdes totaux » d'*Argemone mexicana* ( $1,95 \pm 9,83 \times 10^{-3}$ , ##### :  $p < 0,0001$ ), les extraits bruts éthanoliques de *Sophora denudata* ( $5,34 \pm 3,08 \times 10^{-3}$ , ## :  $p < 0,01$ ) et *Tabernaemontana mauritiana* ( $4,97 \pm 2,87 \times 10^{-3}$ , ## :  $p < 0,01$ ) la réduisent de manière significative. L'expression du gène codant pour la capsid n'est significativement diminuée que par l'extrait brut éthanolique d'*Argemone mexicana* ( $1,53 \pm 0,88 \times 10^{-5}$ , ### :  $p < 0,001$ ). A l'inverse, l'extrait brut éthanolique de *Sophora denudata* augmente significativement cette expression ( $1,98 \pm 1,14 \times 10^{-4}$ , ### :  $p < 0,001$ ). L'expression du gène codant pour la protéine nsP2 est diminuée avec les extraits (*A. mexicana* Eth :  $1,95 \pm 0,54 \times 10^{-4}$ , ##### :  $p < 0,0001$  ; *A. mexicana* AT :  $4,41 \pm 0,58 \times 10^{-4}$ , ##### :  $p < 0,0001$  ; *S. denudata* Eth :  $1,24 \pm 0,27 \times 10^{-3}$ , ## :  $p < 0,0001$  ; *T. mauritiana* Eth :  $8,61 \pm 0,45 \times 10^{-4}$ , ##### :  $p < 0,0001$ ), exceptés les extraits « alcaloïdes totaux » de *Sophora denudata* et *Tabernaemontana mauritiana* qui augmentent son expression (*S. denudata* AT :  $4,99 \pm 1,45 \times 10^{-3}$ , # :  $p < 0,05$  ; *T. mauritiana* AT :  $7,58 \pm 0,32 \times 10^{-3}$ , ##### :  $p < 0,0001$ ).

#### 4. Effets des extraits sur la réponse antivirale

Les effets des extraits ont été évalués sur la réponse antivirale à travers l'analyse par qRT-PCR de l'expression des gènes précédemment identifiés comme acteurs de la réponse antivirale (MXRA8, RIG-I, IRF3, IFN- $\beta$  et ISG15), avec les résultats présentés en **Figure 39, ci-après**.

Par rapport aux cellules-contrôles (CTRL), l'infection par ONNV augmente de manière significative l'expression de MXRA8 ( $4,13 \pm 0,24 \times 10^{-4}$ , \*\*:  $p < 0,01$ ) et de RIG-I ( $1,42 \pm 0,05 \times 10^{-1}$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ). Par comparaison avec les cellules infectées et non traitées (ONNV), l'expression de MXRA8 est significativement réduite par le traitement à la

chloroquine (CHL :  $2,08 \pm 0,55 \times 10^{-4}$ , ### :  $p < 0,01$ ), ou avec tous les extraits, avec des FC inférieurs à 1 (*A. mexicana* Eth :  $3,36 \pm 0,70 \times 10^{-5}$ , ##### :  $p < 0,0001$  ; *A. mexicana* AT :  $6,98 \pm 0,72 \times 10^{-5}$ , ##### :  $p < 0,0001$  ; *S. denudata* Eth :  $4,91 \pm 3,06 \times 10^{-5}$ , ##### :  $p < 0,0001$  ; *S. denudata* AT :  $7,38 \pm 2,61 \times 10^{-5}$ , ##### :  $p < 0,0001$  ; *T. mauritiana* Eth :  $3,65 \pm 0,92 \times 10^{-5}$ , ##### :  $p < 0,0001$  ; *T. mauritiana* AT :  $1,36 \pm 0,42 \times 10^{-4}$ , ##### :  $p < 0,0001$ ).



**Figure 39.** Effets des extraits de *A. mexicana*, *S. denudata* et *T. mauritiana* sur les composants de la réponse antivirale.

Traitement et infection simultanés, CHL 15  $\mu\text{M}$  ; extraits *A. mexicana* 5  $\mu\text{M}$  AGE et extraits *S. denudata* et *T. mauritiana* 10  $\mu\text{M}$  AGE ; ONNV MOI=1. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$  comparé aux cellules non infectées et non traitées (CTRL) ou # :  $p < 0,05$ , ## :  $p < 0,01$ , ### :  $p < 0,001$ , #### :  $p < 0,0001$  comparé aux cellules infectées (ONNV). (n=3, test de Bonferroni).

L'expression réduite de RIG-I est établie par tous les traitements appliqués (CHL :  $2,07 \pm 1,14 \times 10^{-2}$ , ##### :  $p < 0,0001$ , FC = 1,4 ; *A. mexicana* Eth :  $4,70 \pm 1,06 \times 10^{-2}$ , ##### :  $p < 0,0001$ , FC = 3,1 ; *A. mexicana* AT :  $1,36 \pm 0,19 \times 10^{-2}$ , ##### :  $p < 0,0001$ , FC = 0,9 ; *S. denudata* AT :  $3,74 \pm 0,42 \times 10^{-2}$ , ##### :  $p < 0,0001$ , FC = 2,5 ; *T. mauritiana* Eth :  $3,67 \pm 0,53 \times 10^{-2}$ , ##### :  $p < 0,0001$ , FC = 2,5 ; *T. mauritiana* AT :  $2,04 \pm 0,07 \times 10^{-2}$ , ##### :  $p < 0,0001$ , FC = 1,4), sauf dans le cas du traitement avec l'extrait brut éthanolique de *Sophora denudata*, qui ne donne pas de résultat significatif.

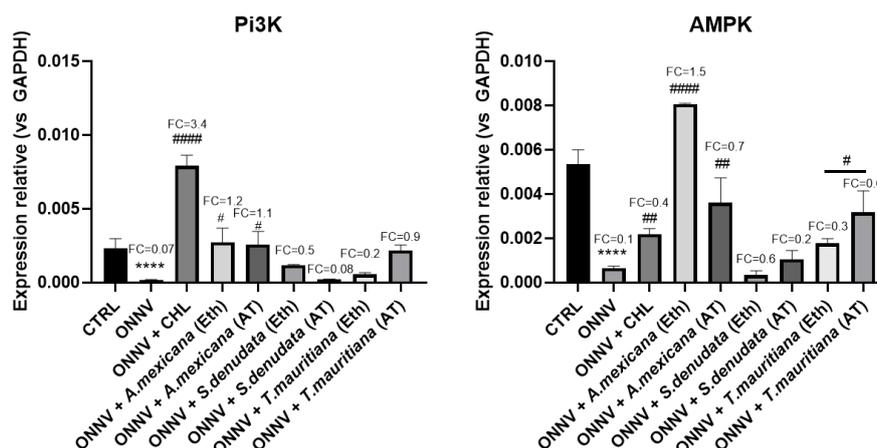
Par comparaison avec les cellules-contrôles (CTRL), dans les cellules infectées et non traitées (ONNV), ONNV augmente de manière significative l'expression du gène IRF3 ( $1,95 \pm 0,46 \times 10^{-4}$ , \* :  $p < 0,05$ ), de IFN- $\beta$  ( $5,63 \pm 0,28 \times 10^{-5}$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ ) et de ISG-15 ( $2,61 \pm 0,65 \times 10^{-4}$ , \* :  $p < 0,05$ ).

Par rapport aux cellules infectées et non traitées (ONNV), seuls les traitements avec l'extrait brut éthanolique de *Sophora denudata* ( $5,68 \pm 2,03 \times 10^{-4}$ , # :  $p < 0,05$ , FC = 29) et l'extrait « alcaloïdes totaux » de *Tabernaemontana mauritiana* ( $1,40 \pm 0,24 \times 10^{-3}$ , ##### :  $p < 0,0001$ , FC = 71,5) augmentent de manière significative l'expression de IRF3.

Par rapport aux cellules infectées et non traitées (ONNV), le traitement à la chloroquine augmente significativement l'expression de IFN- $\beta$  ( $1,76 \pm 0,22 \times 10^{-4}$ , ## :  $p < 0,01$ , FC = 6,6), alors que tous les extraits utilisés réduisent son expression (*A. mexicana* AT :  $2,38 \pm 0,99 \times 10^{-5}$ , # :  $p < 0,05$ , FC = 0,9 ; *S. denudata* Eth :  $2,60 \pm 0,06 \times 10^{-5}$ , ##### :  $p = 0,05$ , FC = 1 ; *S. denudata* AT :  $2,68 \pm 0,81 \times 10^{-5}$ , ##### :  $p = 0,06$ , FC = 1 ; *T. mauritiana* Eth :  $2,52 \pm 0,37 \times 10^{-5}$ , # :  $p < 0,05$ , FC = 0,9 ; *T. mauritiana* AT :  $1,60 \pm 0,23 \times 10^{-4}$ , ##### :  $p < 0,0001$ , FC = 6), sauf l'extrait brut éthanolique d'*Argemone mexicana* (résultat non significatif).

Seuls trois extraits affectent le niveau d'expression d'ISG15, soit en le diminuant significativement (*S. denudata* Eth :  $2,33 \pm 0,92 \times 10^{-5}$ , # :  $p < 0,05$ , FC = 0,7 ; *S. denudata* AT :  $4,60 \pm 2,16 \times 10^{-5}$ ,  $p=0,08$ , FC = 1,5), soit en l'augmentant de manière significative ( $6,92 \pm 0,11 \times 10^{-4}$ , *T. mauritiana* AT : ## :  $p < 0,01$ , FC = 22,6).

Malgré son rôle encore controversé, l'autophagie participe à la réponse antivirale (Van Huizen and McInerney, 2020). L'effet des extraits des trois plantes sur l'autophagie a été étudié dans les cellules HS633T infectées à travers l'analyse de l'expression des composants PI3K et AMPK par qRT-PCR, avec les résultats sont présentés en **Figure 40, ci-après**.



**Figure 40.** Effets des extraits de *A. mexicana*, *S. denudata* et *T. mauritiana* sur l'expression des composants de l'autophagie PI3K et AMPK.

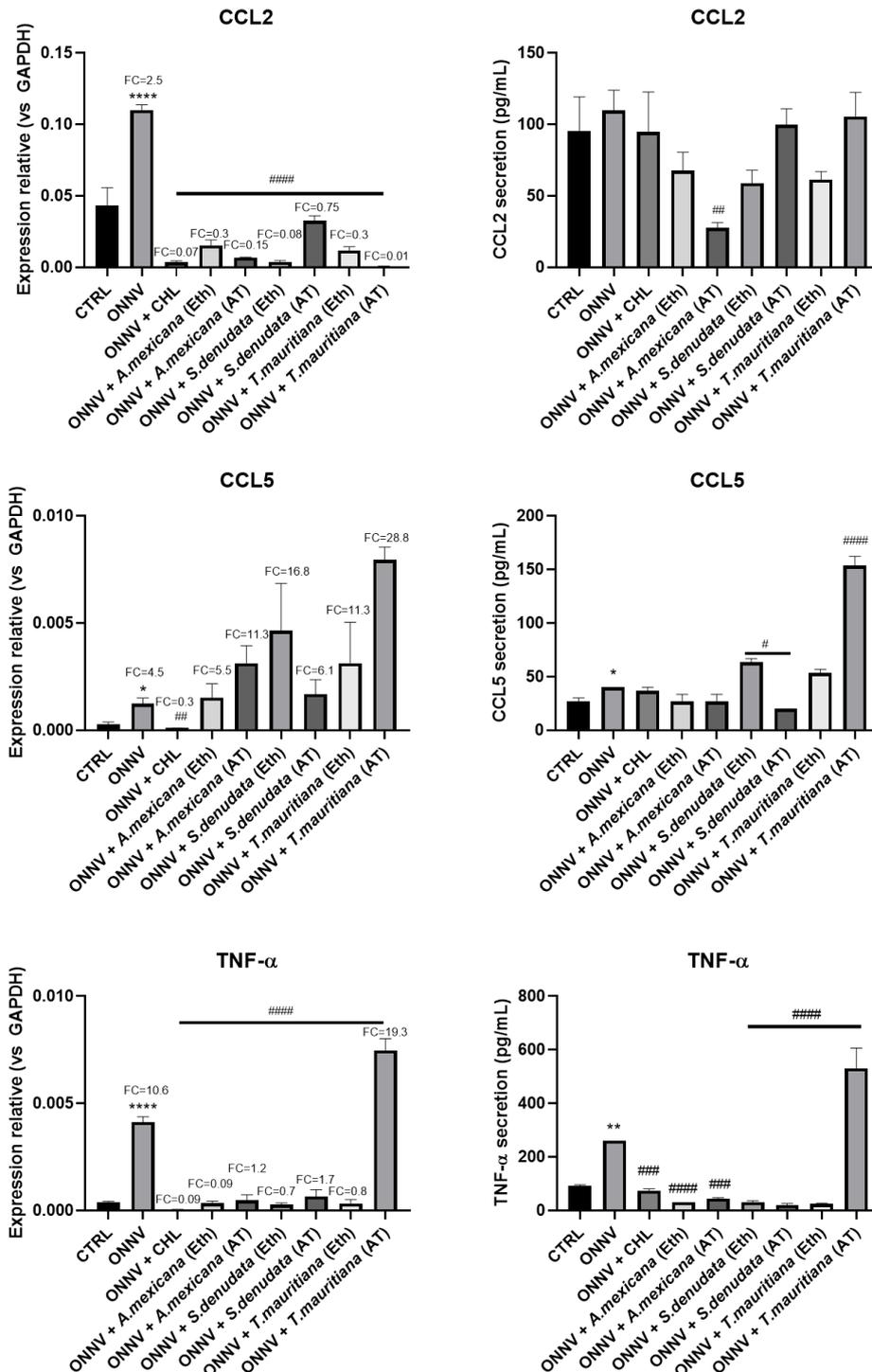
Traitement et infection simultanés, CHL 15  $\mu$ M ; extraits *A. mexicana* 5  $\mu$ M AGE et extraits *S. denudata* et *T. mauritiana* 10  $\mu$ M AGE ; ONNV MOI=1. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$  comparé aux cellules non infectées et non traitées (CTRL) ou #:  $p < 0,05$ , ##:  $p < 0,01$ , ###:  $p < 0,001$ , ####:  $p < 0,0001$  comparé aux cellules infectées (ONNV). (n=3, test de Bonferroni).

## 5. Potentiel anti-inflammatoire des extraits étudiés

Le potentiel anti-inflammatoire des extraits réalisés a été évalué sur les cellules HS633T, infectées avec ONNV, en suivant le niveau d'expression par qRT-PCR et la sécrétion par ELISA des médiateurs pro-inflammatoires CCL2, CCL5 et TNF- $\alpha$ , ainsi que le niveau d'expression des composants-clés de la réponse inflammatoires (MAPK, STAT3, NLRP3 et Caspase-1), qui ont été précédemment observés. Les résultats sont présentés en **Figures 41 et 42, ci-après**.

En **Figure 41** et par rapport aux cellules-contrôles (CTRL), l'infection par ONNV augmente significativement l'expression de CCL2 (CTRL :  $4,30 \pm 1,25 \times 10^{-2}$  ; ONNV :  $1,10 \pm 0,04 \times 10^{-1}$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ), de CCL5 (CTRL :  $2,76 \pm 1,07 \times 10^{-4}$  ; ONNV :  $1,24 \pm 0,26 \times 10^{-3}$ , \*:  $p < 0,05$ ) et de TNF- $\alpha$  (CTRL :  $3,87 \pm 0,34 \times 10^{-4}$  ; ONNV :  $4,12 \pm 0,25 \times 10^{-3}$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ).

Par rapport aux cellules infectées et non traitées (ONNV), l'expression de CCL2 est réduite (FC < 1) par la chloroquine (CHL :  $3,40 \pm 1,06 \times 10^{-3}$ , ####:  $p < 0,001$ ) et tous les extraits (*A. mexicana* Eth :  $1,54 \pm 0,36 \times 10^{-2}$ , #####:  $p < 0,0001$  ; *A. mexicana* AT :  $6,68 \pm 0,45 \times 10^{-3}$ , #####:  $p < 0,0001$  ; *S. denudata* Eth :  $3,70 \pm 0,93 \times 10^{-3}$ , #####:  $p < 0,0001$  ; *S. denudata* AT :  $3,25 \pm 0,34 \times 10^{-2}$ , #####:  $p < 0,0001$  ; *T. mauritiana* Eth :  $1,18 \pm 0,25 \times 10^{-2}$ , #####:  $p < 0,0001$  ; *T. mauritiana* AT :  $5,34 \pm 2,88 \times 10^{-4}$ , #####:  $p < 0,0001$ ).



**Figure 41.** Effet des extraits de *A. mexicana*, *S. denudata* et *T. mauritiana* sur les médiateurs de l'inflammation.

Traitement et infection simultanés, CHL 15  $\mu$ M ; extraits *A. mexicana* 5  $\mu$ M AGE et extraits *S. denudata* et *T. mauritiana* 10  $\mu$ M AGE ; ONNV MOI=1. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$  comparé aux cellules non infectées et non traitées (CTRL) ou # :  $p < 0,05$ , ## :  $p < 0,01$ , ### :  $p < 0,001$ , #### :  $p < 0,0001$  comparé aux cellules infectées (ONNV). (n=3, test de Bonferroni).

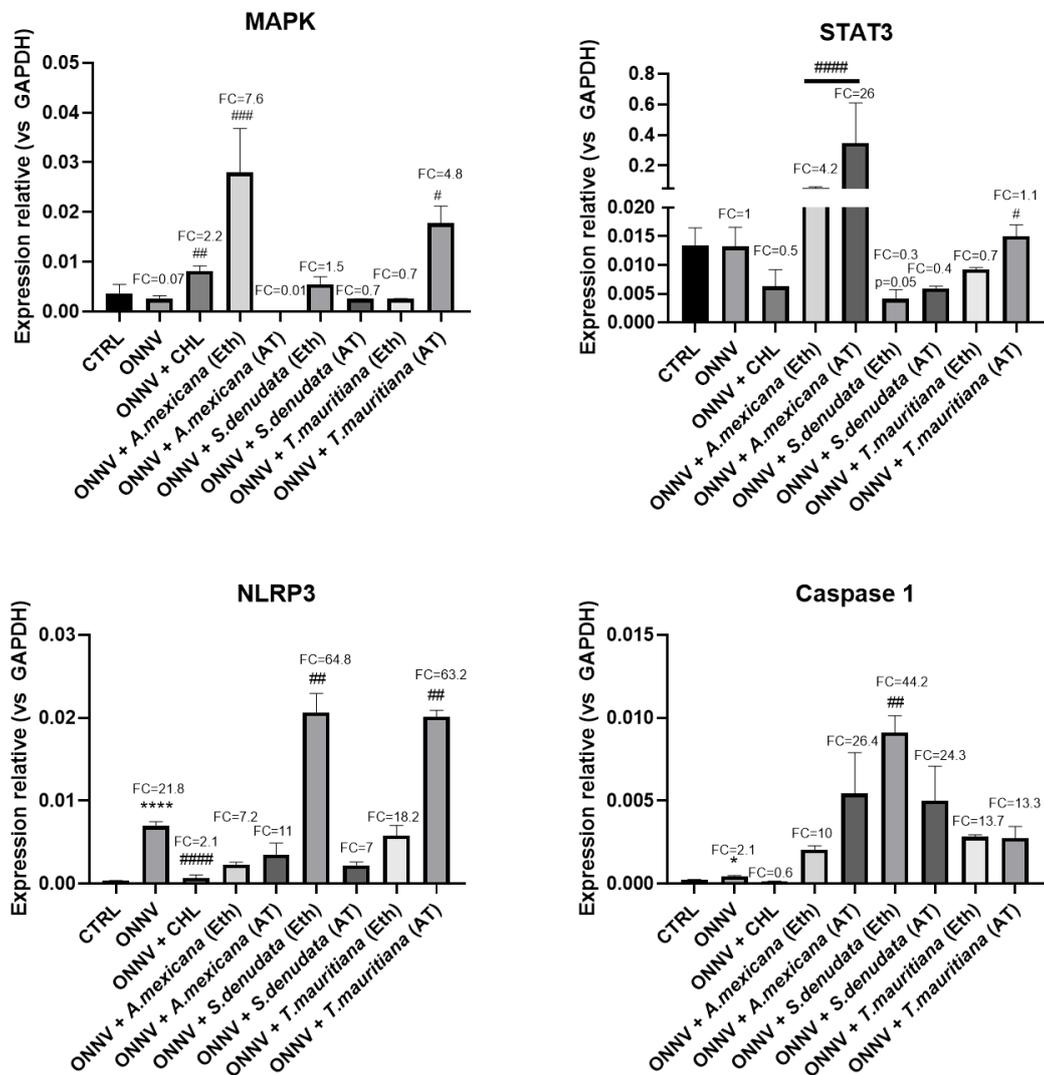
La chloroquine et les extraits réduisent aussi significativement l'expression de TNF- $\alpha$  (CHL :  $3,52 \pm 0,80 \times 10^{-5}$ , ### :  $p < 0,001$ , FC  $< 0,1$  ; *A. mexicana* Eth :  $3,41 \pm 0,90 \times 10^{-4}$ , ##### :  $p < 0,0001$ , FC = 1,2 ; *A. mexicana* AT :  $4,60 \pm 2,59 \times 10^{-4}$ , ##### :  $p < 0,0001$ , FC = 0,7 ; *S. denudata* Eth :  $2,74 \pm 0,71 \times 10^{-4}$ , ##### :  $p < 0,0001$ , FC = 0,7 ; *S. denudata* AT :  $6,43 \pm 3,20 \times 10^{-4}$ , ##### :  $p < 0,0001$ , FC = 1,7 ; *T. mauritiana* Eth :  $3,21 \pm 1,87 \times 10^{-4}$ , ##### :  $p < 0,0001$ , FC = 0,8). L'extrait *T. mauritiana* AT augmente significativement l'expression de TNF- $\alpha$  ( $7,46 \pm 0,55 \times 10^{-3}$ , ##### :  $p < 0,0001$ , FC = 19,3). Cependant, aucun effet significatif des extraits n'est révélé sur l'expression de CCL5.

Seuls les résultats de l'analyse de la sécrétion protéique de TNF- $\alpha$  concordent avec les résultats des niveaux d'expression (ONNV : 260 pg/mL, \*\* :  $p < 0,01$  ; CHL : 73 pg/mL, ### :  $p < 0,001$  ; *A. mexicana* Eth : 30 pg/mL, ##### :  $p < 0,0001$  ; *A. mexicana* AT : 43 pg/mL, ### :  $p < 0,001$  ; *S. denudata* Eth : 30 pg/mL, ##### :  $p < 0,0001$  ; *S. denudata* AT : 20 pg/mL, ##### :  $p < 0,0001$  ; *T. mauritiana* Eth : 23 pg/mL, ##### :  $p < 0,0001$  et *T. mauritiana* AT : 530 pg/mL, ##### :  $p < 0,0001$ ).

D'après les données reportées en **Figure 42**, l'infection par ONNV diminue significativement l'expression de MAPK (CTRL :  $4,16 \pm 0,17 \times 10^{-2}$  ; ONNV :  $1,25 \pm 0,81 \times 10^{-2}$ , \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ ), mais la chloroquine, l'extrait éthanolique d'*Argemone mexicana* et l'extrait AT de *Tabernaemontana mauritiana* restaurent son niveau d'expression (CHL :  $8,14 \pm 1,05 \times 10^{-3}$ , ## :  $p < 0,01$ , FC = 2,2 ; *A. mexicana* Eth :  $2,80 \pm 0,88 \times 10^{-2}$ , ### :  $p < 0,001$ , FC = 7,6 ; *T. mauritiana* AT :  $1,78 \times 10^{-2} \pm 0,35 \times 10^{-2}$ , # :  $p < 0,05$ , FC = 4,8). L'infection par ONNV n'a aucun effet significatif sur l'expression de STAT3 (CTRL :  $1,57 \pm 0,35 \times 10^{-2}$  ; ONNV :  $1,66 \pm 0,05 \times 10^{-2}$ ). Les extraits d'*Argemone mexicana* (*A. mexicana* Eth :  $5,58 \pm 0,95 \times 10^{-2}$ , ##### :  $p < 0,0001$ , FC = 4,2 ; *A. mexicana* AT :  $8,69 \pm 0,28 \times 10^{-2}$ , ##### :  $p < 0,0001$ , FC = 26) et l'extrait AT de *Tabernaemontana mauritiana* augmentent son expression ( $1,44 \pm 0,32 \times 10^{-2}$ , # :  $p < 0,05$ , FC = 1,1).

L'infection par ONNV augmente de manière significative l'expression de NLRP3 (CTRL :  $3,19 \pm 0,36 \times 10^{-4}$  ; ONNV :  $6,96 \pm 0,50 \times 10^{-3}$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ , FC = 21,8) et de caspase-1 (CTRL :  $2,06 \pm 0,38 \times 10^{-4}$  ; ONNV :  $4,35 \pm 0,54 \times 10^{-4}$ , \* :  $p < 0,05$ , FC = 2,1). Alors que la chloroquine (CHL :  $6,70 \pm 3,87 \times 10^{-4}$ , ##### :  $p < 0,0001$ , FC = 2,1) diminue significativement l'expression de NLRP3, l'extrait éthanolique de *Sophora denudata* ( $2,07 \pm 0,23 \times 10^{-2}$ , ## :  $p < 0,01$ , FC = 64,8) et l'extrait AT de *Tabernaemontana mauritiana* ( $2,01 \pm 0,08 \times 10^{-2}$ , ## :  $p < 0,01$ , FC = 63,2) augmentent de manière significative l'expression de NLRP3, par comparaison avec les cellules infectées (ONNV). Seul l'extrait éthanolique de *Sophora denudata* a un effet

significatif sur caspase-1 en augmentant son expression ( $9,11 \pm 1,02 \times 10^{-3}$ , ## :  $p < 0,01$ , FC = 44,2).



**Figure 42.** Effet des extraits de *A. mexicana*, *S. denudata* et *T. mauritiana* sur les composants des voies de l'inflammation.

Traitement et infection simultanés, CHL 15  $\mu$ M ; extraits *A. mexicana* 5  $\mu$ M AGE et extraits *S. denudata* et *T. mauritiana* 10  $\mu$ M AGE ; ONNV MOI=1. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$  comparé aux cellules non infectées et non traitées (CTRL) ou # :  $p < 0,05$ , ## :  $p < 0,01$ , ### :  $p < 0,001$ , #### :  $p < 0,0001$  comparé aux cellules infectées (ONNV). (n=3, test de Bonferroni).

## V. Caractérisation chimique préliminaire des extraits et fractions

Des analyses par chromatographie liquide couplée à deux types de détection (UV et masse) ont été effectuées pour caractériser sommairement la composition des extraits « alcaloïdes totaux » (AT) des trois espèces végétales, dans le but de révéler la présence d'alcaloïdes et plus particulièrement, des alcaloïdes standards pour chacun d'eux.

La Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP ou HPLC), couplée à la spectrométrie de masse (SM ou MS), ainsi qu'à une détection par spectroscopie-UV avec détecteur à barrette de diodes (DAD), est une méthode analytique et séparative où une phase mobile traverse une phase stationnaire dans une colonne, sous pression. La variation de polarité de la phase mobile permet de séparer les composés selon leur polarité. La détection spectrométrique de masse permet de déceler et d'identifier les composés selon leur masse molaire. La détection UV à permet de visualiser des composés qui possèdent des éléments structuraux avec des absorbances dans la région UV-visible des longueurs d'onde. Ces techniques permettent ainsi de séparer, d'identifier et de quantifier des composés présents dans un échantillon. La méthode utilisée est présentée en détail dans la partie « Matériel et Méthodes », **Méthode 12**.

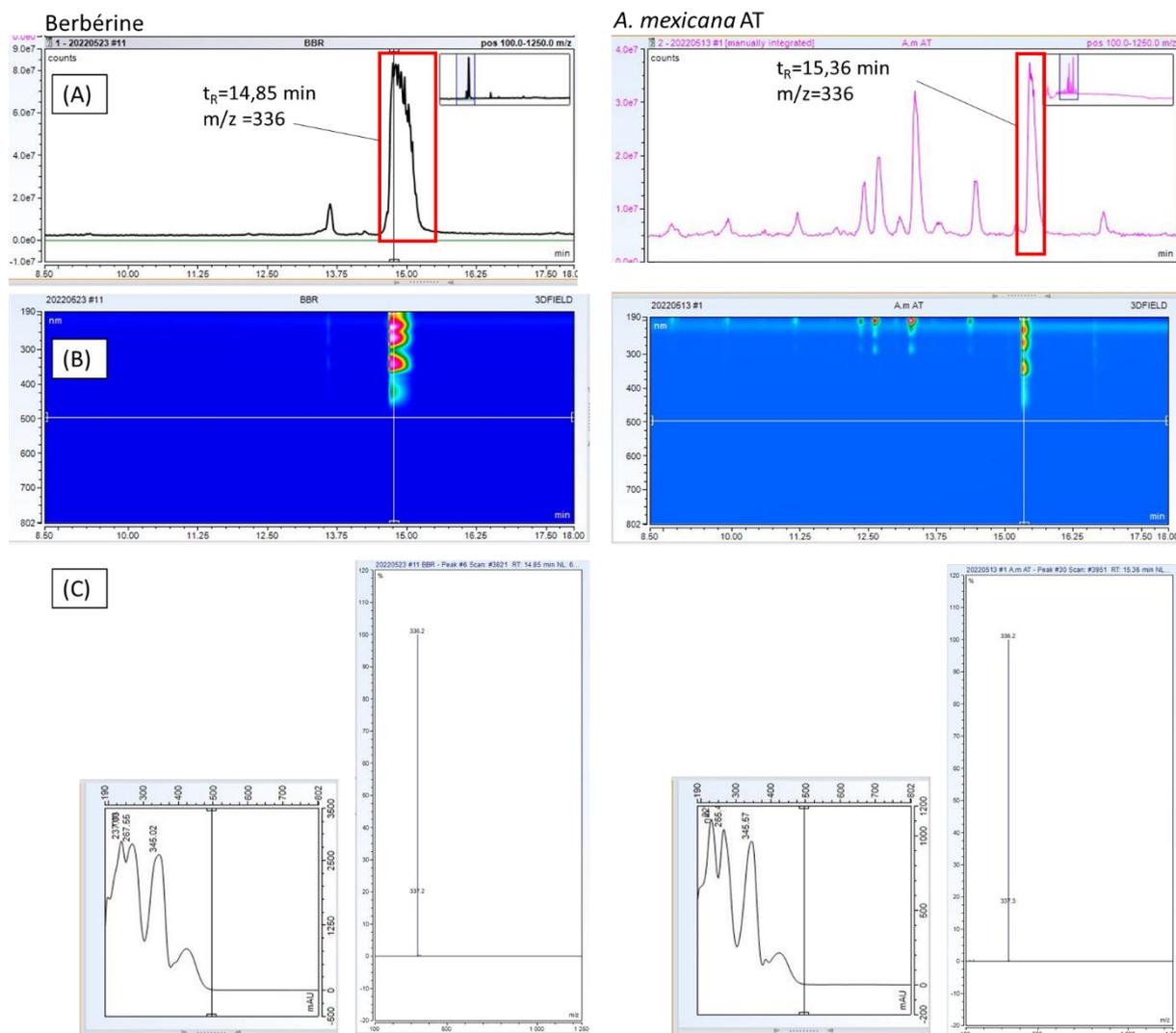
Cette méthode a été appliquée pour analyser des extraits bruts et caractériser leur composition globale. L'échantillon, en solution de concentration 10 mg/mL dans du méthanol, est déposé sur une colonne (phase inverse) et élué selon un gradient acétonitrile/eau, de 5 à 100% en proportion d'acétonitrile, sur une durée de 50 minutes, avant un palier final à 100 %, durant 17 minutes. L'objectif de ces analyses était de tenter de caractériser la présence de certains alcaloïdes « standards commerciaux » dans les extraits réalisés : la berbérine dans les extraits de *Argemone mexicana*, la matrine dans les extraits de *Sophora denudata* et la tabersonine dans les extraits de *Tabernaemontana mauritiana*.

Les extraits bruts éthanoliques et « alcaloïdes totaux » des 3 espèces ont été analysés par UHPLC-UV-MS (ou UCLHP-UV-SM). Les chromatogrammes obtenus sont présentés ci-après (**Fig. 43-45**). Les temps de rétention ( $t_R$ ) en minutes (min) et les masses molaires ( $m/z$ ) en grammes par mole (g/mol) ainsi que les données spectrales UV et MS, sont utilisés pour caractériser les composés identifiés.

- Analyses HPLC-UV-MS pour *Argemone mexicana*

La berbérine commerciale et l'extrait AT de l'espèce *Argemone mexicana* ont été successivement injectés en UHPLC-DAD-MS (10  $\mu$ L d'une solution à 10 mg/mL). Les données obtenues sont présentées en **Figure 43, ci-après**.

Un pic majoritaire ( $t_R=14,85$  min et  $m/z =337$ ) est observé sur le chromatogramme HPLC-MS après injection de la berbérine commerciale (**Fig. 43A gauche**). Un pic similaire est retrouvé dans le chromatogramme obtenu après injection de l'extrait « alcaloïdes totaux » de *Argemone mexicana* dans les mêmes conditions (**Fig. 43A droite**), avec un temps de rétention de 15,4 min et une masse  $m/z$  de 337. Les spectres de masse et UV (B) et (C) de ces composés sont comparables et permettent de confirmer la présence de berbérine dans l'extrait « alcaloïdes totaux » de *Argemone mexicana*.



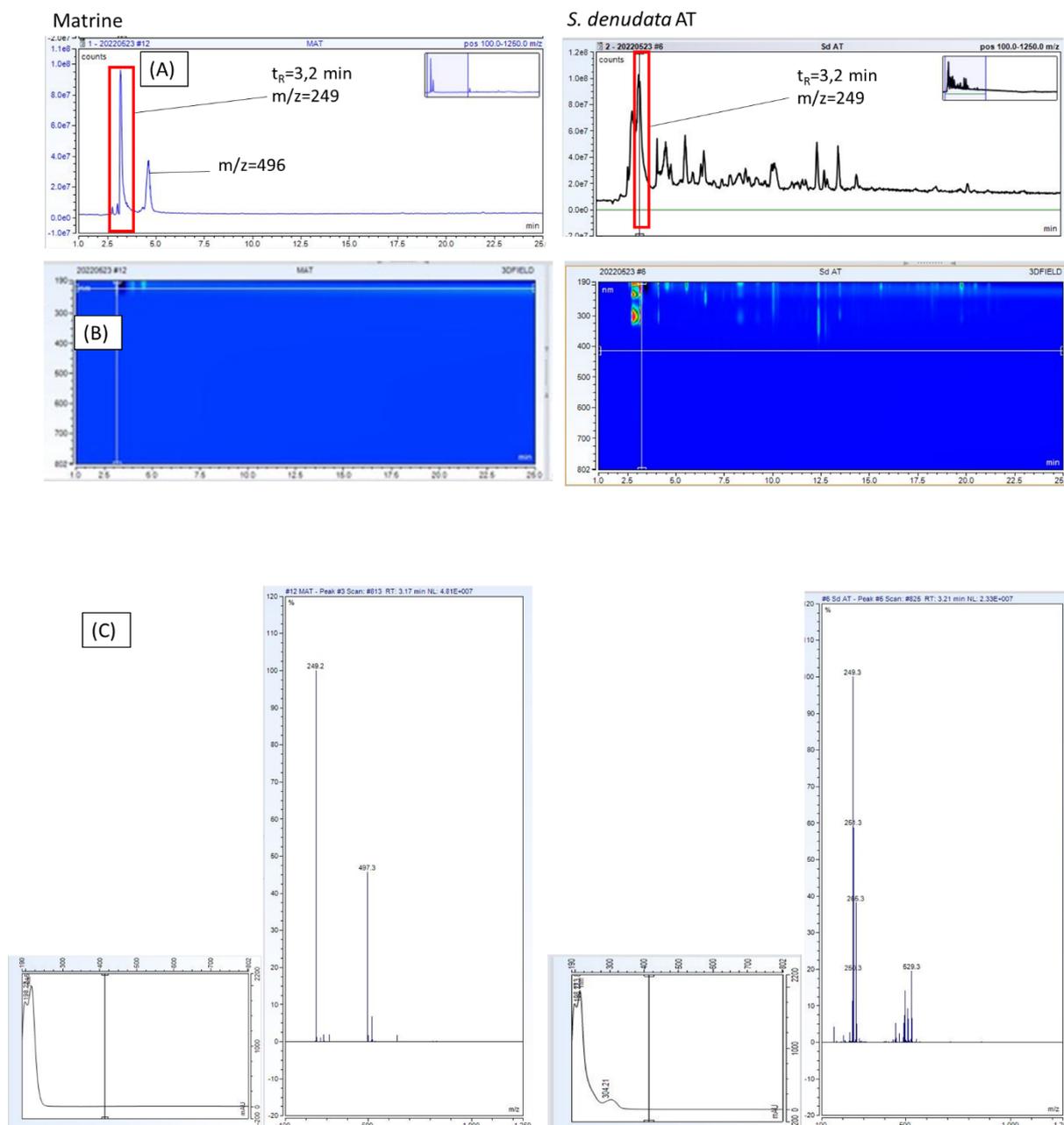
**Figure 43.** Comparaison de données UHPLC-UV-MS pour la berbérine et l'extrait « alcaloïdes totaux » de *Argemone mexicana* (*A. mexicana* AT).

(A) Chromatogrammes UHPLC-MS relatifs à l'injection de la berbérine et de l'extrait *A. mexicana* AT ; (B) Données UV relatives à l'injection de la berbérine et de l'extrait *A. mexicana* AT ; (C) Caractéristiques spectrales de la berbérine et du composé majoritaire de l'extrait *A. mexicana* AT.

- Analyses HPLC-UV-MS pour *Sophora denudata*

La matrine et l'extrait AT de l'espèce *Sophora denudata* ont été successivement injectés en UHPLC-UV-MS (10  $\mu$ L d'une solution à 10 mg/mL). Les données obtenues sont présentées en

**Figure 44, ci-après.**



**Figure 44.** Comparaison de données UHPLC-UV-MS pour la matrine et l'extrait « alcaloïdes totaux » de *Sophora denudata* (*S. denudata* AT). (A) Chromatogrammes UHPLC-MS relatifs à l'injection de la matrine et de l'extrait *S. denudata* AT ; (B) Données UV relatives à l'injection de la matrine et de l'extrait *S. denudata* AT ; (C) Caractéristiques spectrales de la matrine et du composé majoritaire de l'extrait *S. denudata* AT.

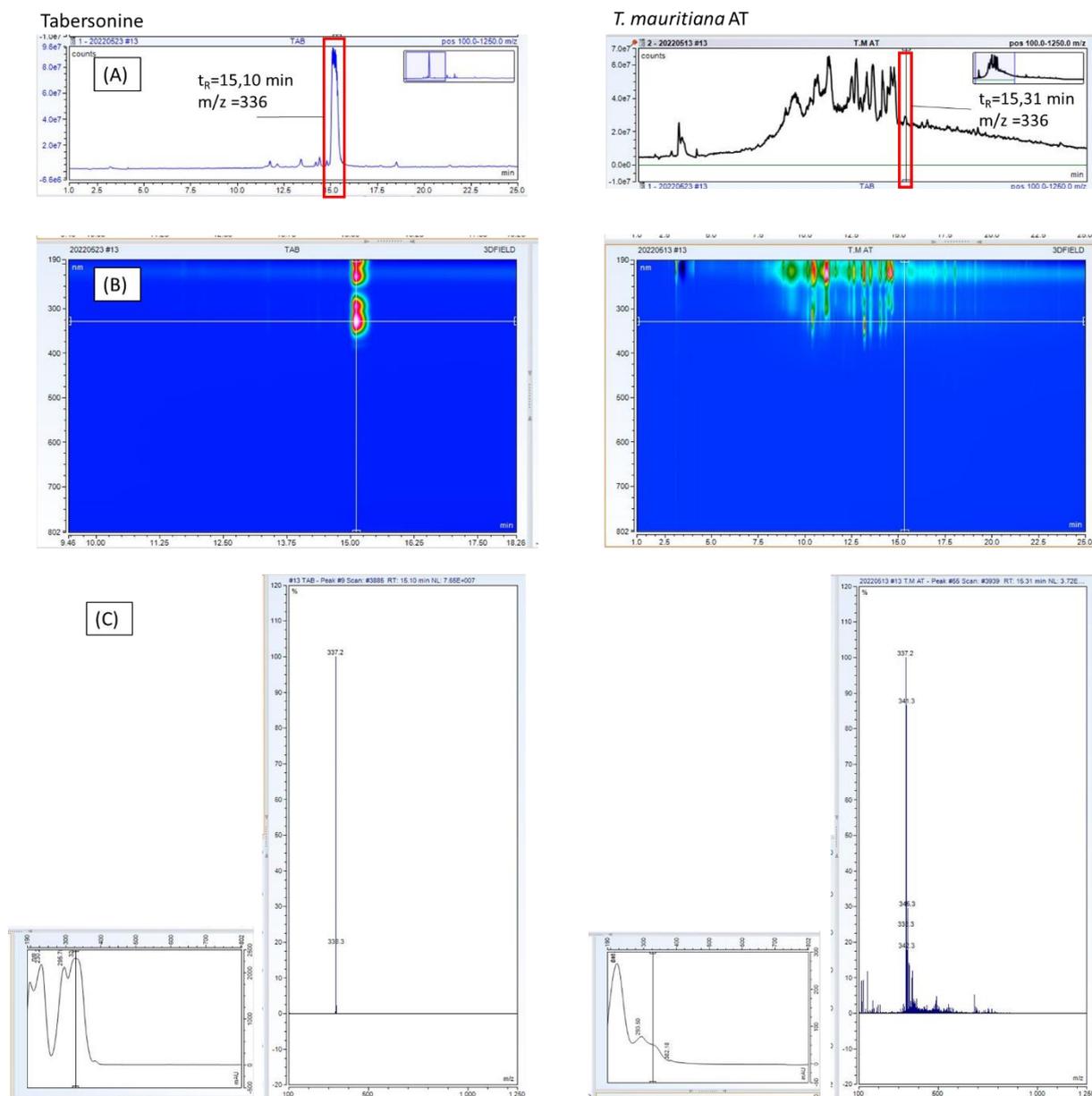
Le chromatogramme de la matrine commerciale fait apparaître un pic majoritaire de la matrine à un temps de rétention de 3,2 min ( $m/z = 249$ ) (**Fig. 44A gauche**). En plus du pic de base ( $m/z = 249$ ), le pic  $m/z$  496 évoque un possible dimère (**Fig. 44A et 44C gauche**). Le chromatogramme obtenu après injection de l'extrait « alcaloïdes totaux » de *Sophora denudata* indique une composition complexe (**Fig. 44A droite**). Malgré la complexité du mélange, un pic

au temps de rétention  $t_R=3,2$  min correspondant à un produit majoritaire du mélange peut être caractérisé, comme pour le spectre de masse de la matrine, avec un pic de base  $m/z$  249. Par ailleurs, les spectres UV de la matrine et du produit majoritaire de l'extrait AT sont comparables (**Fig. 44C gauche et droite**). Ces résultats, corrélés à ceux d'une étude antérieure du laboratoire Chembiopro (résultats non publiés [319]), permettent de confirmer la présence de matrine dans l'extrait alcaloïdes totaux de *Sophora denudata*.

- Analyses HPLC-UV-MS pour *Tabernaemontana mauritiana*

La tabersonine et l'extrait AT de l'espèce *Tabernaemontana mauritiana* ont été successivement injectés en UHPLC-UV-MS (10  $\mu$ L d'une solution à 10 mg/mL). Les données obtenues sont présentées en **Figure 45, ci-après**.

Le chromatogramme de la tabersonine commerciale (**Fig. 45A**) fait apparaître le pic majoritaire de la tabersonine ( $t_R=15,10$  min et  $m/z=337$ ). La comparaison des injections de la tabersonine et de l'extrait AT de *T. mauritiana* ne permettent pas d'identifier un pic majoritaire dans l'extrait pouvant correspondre à la tabersonine commerciale. Cependant, le chromatogramme UHPLC-MS révèle de nombreux pics avec différents  $m/z$  et des spectres UV variés. Le détail des analyses pour l'espèce *Tabernaemontana mauritiana* est présenté en **Annexe 2**. La comparaison des données spectrales (MS) de la tabersonine, avec celles des pics du chromatogramme pour l'AT, démontre la présence de composés avec une masse  $m/z$  de 337 aux temps de rétention 14,06 min et 15,31 min. Le pic présentant le temps de rétention le plus proche de celui de la tabersonine (à 15,31min) correspond à un mélange et non un unique composé. Ce pic est de faible intensité dans le chromatogramme et le spectre UV ressemble peu à celui de la tabersonine. Il est donc impossible d'indiquer la présence de tabersonine dans l'AT. De plus, s'il s'avère que les nombreux composés présents dans l'extrait sont effectivement des alcaloïdes, il demeure impossible à ce stade d'affirmer que sont des alcaloïdes indoliques. Cependant, des données de littérature soutiennent cette hypothèse. Ainsi, plusieurs pics du chromatogramme de l'AT correspondent à des composés de  $m/z$  de 353 ou 354, pouvant indiquer la présence de diverses structures d'alcaloïdes indolo-monoterpéniques [419], comme, par exemple, celle de la yohimbine [420]. Les spectres UV des pics aux temps de rétention 11,18 - 12,43 et 12,67 min présentent des similitudes entre eux et sont en corrélation avec ceux présentés pour la yohimbine dans la littérature [421]. Cette hypothèse reste cependant insuffisamment étayée et des analyses complémentaires doivent être réalisées.



**Figure 45.** Comparaison de données UHPLC-UV-MS pour la tabersonine et l'extrait « alcaloïdes totaux » de l'espèce *Tabernaemontana mauritiana* (*T. mauritiana* AT). (A) Chromatogrammes UHPLC-MS relatifs à l'injection de la tabersonine et de l'extrait *T. mauritiana* AT ; (B) Données UV relatives à l'injection de la tabersonine et de l'extrait *T. mauritiana* AT ; (C) Caractéristiques spectrales de la tabersonine et de composés de l'extrait *T. mauritiana* AT.

## VI. Discussion

Le potentiel anti-alphaviral de la berbérine (isoquinoléine), de la matrine (quinolizidine) et de la tabersonine (indole) a précédemment été établi (**Chapitre 4**). L'objectif de cette partie était d'appliquer le modèle biologique développé (**Chapitre 3**) pour la même valorisation d'espèces végétales issues de la biodiversité réunionnaise et susceptibles de renfermer des alcaloïdes.

Les espèces *Argemone mexicana*, *Sophora denudata* et *Tabernaemontana mauritiana* ont été ainsi sélectionnées.

Les matières végétales ont été traitées pour obtenir des extraits avec des rendements variables d'une espèce à l'autre, respectivement de 4,8 à 16,8% pour les extraits bruts éthanoliques, et de 0,7 à 12% pour les extraits d'alcaloïdes totaux (AT) par rapport à l'extrait brut éthanolique de départ. Les alcaloïdes étant des composés minoritaires, comme cela était attendu, les rendements d'extraction, dans le cas des extraits AT, sont plus faibles que dans le cas des extraits éthanoliques. Les extraits ainsi obtenus ont ensuite été évalués biologiquement.

Le contrôle de la balance rédox intracellulaire participe au contrôle de l'infection virale. Les polyphénols sont relativement abondants dans les végétaux et sont bien caractérisés pour leurs propriétés antioxydantes [422]. Les extraits étudiés présentent des teneurs variables en polyphénols, toujours plus importantes dans les extraits « alcaloïdes totaux » par rapport aux extraits éthanoliques (**Tableau 9**). Seul l'extrait éthanolique de *Sophora denudata* exerce une activité antioxydante comparable à celle de la quercétine utilisée comme référence, tandis que les autres extraits présentent une activité inférieure. Ceci est en corrélation avec les données générales de la littérature, pour des espèces du genre *Sophora*, ainsi qu'avec les résultats d'une étude menée en parallèle au laboratoire Chembiopro sur *Sophora denudata* (travaux non publiés, rapport de Camille Novick), indiquant la présence de nombreux composés phénoliques, notamment de type flavonoïdes.

Le potentiel anti-alphaviral des extraits a été ensuite déterminé avec leur concentration non toxique ( $\leq 10 \mu\text{M}$  AGE) dans les cellules HS633T infectées par ONNV, pour les mêmes cibles étudiées avec les alcaloïdes de référence (**Chapitre 4**). Les activités obtenues ont été comparées aux activités précédemment obtenues avec les alcaloïdes de référence.

L'espèce *Argemone mexicana* a été sélectionnée pour la présence potentielle de berbérine (**Fig. 43**). Les effets remarquables de la berbérine (**Chapitre 4**) sur les cellules HS633T infectées par ONNV se sont révélés sur l'inhibition de la réplication virale et sur la modulation de l'expression de composants de la réponse antivirale (MXRA8, RIG-I, IFN- $\beta$  et ISG15) et inflammatoire (CCL2, TNF- $\alpha$ , STAT3 et la voie NLRP3/caspase-1). Dans le même contexte, les deux extraits de *Argemone mexicana* se caractérisent par une activité antivirale correspondant à une diminution de l'expression des gènes viraux et des récepteurs-clés MXRA8 et RIG-I et immunomodulatrice en régulant l'expression des composants PI3K/AMPK, MAPK et STAT3 et des médiateurs pro-inflammatoires CCL2 et TNF- $\alpha$ . L'activité anti-inflammatoire

de *A. mexicana* a déjà été décrite dans différents modèles, notamment *in vivo* avec un extrait éthanolique [369,370]. Cependant, les facteurs cellulaires impliqués n'ont pas été caractérisés. De plus, jusqu'ici aucune étude n'avait porté sur les potentielles activités anti-alphavirales de l'espèce *A. mexicana*.

L'espèce *Tabernaemontana mauritiana* a été choisie pour la présence potentielle de tabersonine ou d'autres alcaloïdes de la famille des indoles (**Fig. 45**). L'activité anti-alphavirale de la tabersonine a été démontrée dans le **Chapitre 4** à travers l'inhibition de la réplication virale, de la réponse antivirale avec l'inhibition de l'expression de MXRA8, RIG-I, IFN- $\beta$  et ISG15) et de la réponse inflammatoire avec l'inhibition des composants et médiateurs pro-inflammatoires (STAT3, NLRP3/caspase-1, COX-2, CCL2 et TNF- $\alpha$ ). L'extrait éthanolique de *T. mauritiana* se caractérise par une activité inhibitrice, principalement sur l'expression des gènes viraux (E1, E2 et nsP2) et des composants de la réponse antivirale (MXRA8, RIG-I, IFN- $\beta$  et iSG15), dans les cellules HS633T infectées par ONNV. L'extrait éthanolique de *T. mauritiana* réduit aussi significativement les niveaux d'expression génique et protéique de CCL2 et TNF- $\alpha$ . L'extrait AT de *T. mauritiana* se caractérise principalement par une activité immunomodulatrice sur différents composants cellulaires, participant à la réponse antivirale (MXRA8, RIG-I, IRF3, IFN- $\beta$ , ISG15, AMPK) et inflammatoire (MAPK, STAT-3, NLRP3/caspase-1, CCL2 et TNF- $\alpha$ ). Dans le genre *Tabernaemontana*, les effets anti-inflammatoires des espèces *T. ventricosa* [414] et *T. pandacaqui* [415] ont déjà été décrits, sans toutefois établir les mécanismes impliqués. Jusqu'ici, les potentielles activités antivirales et anti-inflammatoires de *T. mauritiana* n'avaient pas été démontrées.

L'espèce *Sophora denudata* a été sélectionnée pour la présence potentielle de matrine (**Fig. 44**). Dans les cellules HS633T infectées par ONNV, la matrine a présenté des activités immunomodulatrices remarquables surtout sur les composants de la réponse antivirale (MXRA8, RIG-I, IRF3, ISG15), mais aussi sur les médiateurs pro-inflammatoires CCL2 et TNF- $\alpha$  (**Chapitre 4**), et il en est de même pour les extraits de *Sophora denudata* testés. L'extrait « alcaloïdes totaux » de *S. denudata* a en plus démontré une activité sur la voie NLRP3/caspase-1 en augmentant l'expression de ces deux composants. Au sein du genre *Sophora*, plusieurs espèces ont déjà été décrites pour leurs potentielles activités anti-inflammatoires [357]. Les activités antivirales des espèces *S. flavescens* [399,400] et *S. tonkinensis* [403] ont déjà été décrits, mais les mécanismes n'ont pas été étudiés. Aucune donnée de la littérature n'a jusqu'ici traité des potentielles activités anti-alphavirales de *S. denudata*.

L'ensemble de ces résultats établissent pour la première fois les potentiels anti-alphavirus d'extraits des espèces *Argemone mexicana*, *Sophora denudata* et *Tabernaemontana mauritiana*. Les résultats obtenus pour les extraits végétaux révèlent ces potentiels, mais avec parfois des différences significatives par rapport aux alcaloïdes de référence. Par exemple, alors que la berbérine n'affecte pas significativement le niveau d'expression de nsP2, PI3K et AMPK, les extraits de *A. mexicana* diminuent l'expression du gène codant pour nsP2, essentiel à la réplication virale, et régulent l'expression de PI3K et AMPK. Ces deux extraits augmentent également l'expression de STAT3, alors que la berbérine la diminue. Les extraits de *S. denudata* diminuent significativement l'expression de MXRA8 et CCL2, alors que la matrine exerce l'effet inverse, en augmentant leur expression de manière significative. Alors que la tabersonine n'exerce aucun effet sur l'expression de nsP2 et AMPK, les extraits de *T. mauritiana* affectent le niveau d'expression de nsP2 et diminuent celui de AMPK dans les cellules infectées.

Cette analyse comparative suggère que les extraits présentent des effets différents, soit par un effet synergique, soit par la présence d'un composé minoritaire, soit par la présence confirmée de polyphénols déjà connus pour interférer sur des facteurs cellulaires dont les voies JAK/STAT, NF- $\kappa$ B, MAPK ou encore PI3K/AKT [423].

Les analyses de la composition chimique des extraits ont été réalisées sans comparaison avec une base de données et restent tout à fait préliminaires. Elles permettent néanmoins d'obtenir des précisions quant à la composition des extraits AT, avec la présence de berbérine et de matrine, respectivement, dans les extraits de *A. mexicana* et de *S. denudata*. Ces résultats sont déjà indicatifs d'une composition chimique associant des alcaloïdes dans les extraits évalués biologiquement, mais restent à confirmer par des analyses chimiques approfondies, afin d'établir de manière certaine la présence d'alcaloïdes des classes recherchées dans les extraits « alcaloïdes totaux ». Ces travaux constituent également la première caractérisation chimique de l'espèce *Tabernaemontana mauritiana*.

En conclusion, les résultats décrits dans ce chapitre soulignent l'intérêt des plantes susceptibles de renfermer des alcaloïdes dans la recherche d'anti-alphavirus, et plus largement l'intérêt de la biodiversité régionale comme source de molécules anti-alphavirales. Les analyses chimiques préliminaires réalisés permettent de suspecter la présence d'alcaloïdes dans les extraits réalisés. Cependant, la présence d'autres composés chimiques peut être responsable d'effets biologiques plus marqués. Cependant des analyses chimiques plus complètes sont nécessaires pour pouvoir

affirmer cette hypothèse et poursuivre les études, afin de pouvoir tenter de corréler les activités biologiques observées aux structures chimiques associées.

# Conclusion générale et perspectives

Les alphavirus représentent un véritable enjeu dans la problématique des agents biologiques (ré)émergents et pathogènes pour l'Homme. Les avancées scientifiques ont permis de caractériser le processus infectieux des alphavirus arthritogéniques, mais aussi le processus inflammatoire et ses complications chroniques liées à un dérèglement du système immunitaire. Dans ce contexte et en l'absence de traitements spécifiques, ces travaux visaient à établir l'intérêt des alcaloïdes naturels dans une stratégie thérapeutique fondée sur une double activité antivirale et immunomodulatrice et à développer des capacités d'exploration de la biodiversité végétale régionale, pour l'identification de nouvelles sources moléculaires naturelles, contre les alphavirus arthritogéniques, sur le modèle du ONNV.

Les alcaloïdes naturels constituent toujours une source importante dans la recherche et le développement de médicaments, mais qui est encore peu explorée contre les alphavirus arthritogéniques. L'hypothèse d'une capacité anti-alphavirale des alcaloïdes naturels a été soutenue pour trois classes structurales majeures (isoquinoléines, indoles, quinolizidines), à partir des activités et mécanismes établis pour des structures naturelles emblématiques contre une variété de virus et de contextes physiopathologiques (**Chapitre 2**).

Considérant le tropisme musculo-squelettique des alphavirus arthritogéniques, l'évaluation *in vitro* de traitements chimiques a été envisagée sur des cellules représentatives des fibroblastes (HS633T), dont l'origine à partir de cellules souches mésenchymateuses (MSC) a été confirmée expérimentalement (**Chapitre 3**). L'infectivité des cellules HS633T par ONNV a été établie, tout comme les composants essentiels de la réponse immunitaire avec la réponse antivirale (voie des IFNs de type 1) et la réponse inflammatoire (voies et médiateurs-clés). L'évaluation biologique avec les cellules HS633T a été structurée avec la chloroquine (4-aminoquinoléine) qui a été caractérisée à cette occasion pour sa double activité antivirale et anti-inflammatoire.

Le modèle biologique a été ensuite appliqué (**Chapitre 4**) à la berbérine (isoquinoléine), la matrine (quinolizidine) et la tabersonine (indole). Les résultats ont permis d'établir la capacité de ces alcaloïdes à interférer sur les processus essentiels de l'infection et de la réponse immunitaire. L'évaluation approfondie de chacune des molécules a permis de les distinguer sur un profil anti-alphaviral établi, avec leurs avantages et leurs limites, pour la double activité antivirale et immunomodulatrice attendue. Sur les extraits de *Argemone mexicana*, *Sophora*

*denudata* et *Tabernaemontana mauritiana*, présentes à La Réunion et susceptibles de renfermer des alcaloïdes (**Chapitre 5**), l'évaluation biologique a permis de caractériser leur double activité antivirale et immunomodulatrice, mais avec des variations remarquables par rapport aux molécules de référence, dont la présence a été suspectée par les analyses chimiques préliminaires. Le profil anti-alphaviral des extraits a été complété avec l'évaluation de leur capacité antioxydante, liée à la présence de polyphénols, qui pourraient expliquer les effets supplémentaires de ces molécules dans l'activité anti-alphavirale.

Ainsi, l'ensemble de ces travaux caractérise les alcaloïdes naturels comme sources moléculaires dans la recherche et le développement de traitements anti-alphaviraux, reposant sur une double activité antivirale et immunomodulatrice, à partir d'un modèle *in vitro* approprié et robuste. Les résultats consacrent une démarche originale pour la valorisation des substances naturelles, issues de la biodiversité végétale de La Réunion, avec deux principales perspectives de développement, dans une orientation scientifique liée au domaine pharmaceutique.

**La première perspective se rapporte à la pharmacochimie moléculaire** pour résoudre des paramètres physicochimiques et/ou biologiques défavorables des molécules naturelles, dont le potentiel anti-alphaviral a été établi *in vitro*. En effet, le développement de ces molécules sera probablement confronté à des propriétés pharmacocinétiques limitées, notamment par leur faible solubilité ou biodisponibilité, mais aussi par une toxicité relative qui serait révélée par les études *in vivo*. Dans ce contexte, la conception de structures optimisées et facilement accessibles par synthèse chimique (dérivés semi-synthétiques) peut être envisagée, comme cela a été déjà entrepris au laboratoire avec la quercétine (flavonol) et éventuellement orientée par de la modélisation moléculaire, sur des cibles thérapeutiques qui seraient parfaitement identifiées. Cette démarche peut également s'inscrire dans une approche prodrogue, en exploitant des voies de biotransformations permettant de régénérer le principe actif, voire même de prolonger son action.

**La deuxième perspective s'inscrit dans le domaine de la pharmacognosie** pour accélérer l'identification de nouvelles sources phytochimiques anti-alphavirales au sein de la biodiversité régionale, par les apports d'une évaluation biologique *in vitro* structurée, qui serait appliquée à un criblage des nombreuses collections déjà existantes, ou de celles qui ressortiraient des approches ethnobotaniques ou chimiotaxonomiques, historiquement développées et toujours engagées à La Réunion.

Inscrites de manière complémentaire et étendues sur une stratégie thérapeutique commune aux grandes pathologies régionales, ces deux perspectives consacreront un nouvel écosystème de recherche, développement et innovation dans le domaine de la pharmacochimie des substances naturelles à La Réunion.

# Matériel et Méthodes

- **Méthode 1 : Culture cellulaire**

Les cellules HS633T proviennent de l'*European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC, référence 89050201) et les fibroblastes synoviaux humains (ou cellules souches mésenchymateuses dérivées de la synovie du laboratoire de recherche *ScienCell* (ScienCell, 4700 Clinisciences). Les cellules ont été mise en culture dans du milieu de culture "*Minimum Essential Medium*" Eagle (MEM Eagle, PAN Biotech P0408500), supplémenté de 5 % de sérum de veau foetal décomplémenté (SVF) (PAN Biotech, 3302 P290907), de L-glutamine 2mM (Biochrom AG, K0282), de 100 U/mL – 0.1 mg/mL penicillin-streptomycin (PAN Biotech, P0607100), de 1 mM sodium pyruvate (PAN Biotech, P0443100) et de 0,5 µg/mL de Fungizone (PAN Biotech P0601001). Les cellules ont été mises en culture dans des flasques, plaques de 6 ou de 96 puits ou sur des coverslips et maintenues à 37°C, dans une atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub>, jusqu'à 70 à 80% de confluence.

- **Méthode 2 : Infection et/ou traitement des cellules**

Un isolat du virus O'nyong-nyong a été obtenu du Centre National de Référence arbovirus (CNR arbovirus, Marseille, France). L'isolat a été titré à 10<sup>7</sup> PFU.mL<sup>-1</sup> sur des cellules Vero. Les cellules à 70-80 % de confluence ont ensuite été infectées avec le virus à une MOI de 1 (1 virus pour 1 cellule) et/ou traitées avec les molécules commerciales ou les extraits de plantes.

**Tableau 10.** Références des molécules standard utilisées en solution pour le traitement des cellules.

Molécule	Concentration(s) utilisée(s) pour la solution	Référence
Berbérine	10 µM	Sigma Aldrich, 00900585
Matrine	10 µM	Sigma Aldrich, PHL89730
Tabersonine	10 µM	Sigma, SMB00452

- **Méthode 3 : Tests de cytotoxicité**

Le test LDH (Lactate déshydrogénase)

Les cellules ont été mises en culture dans des plaques de 96 puits. 24h plus tard, elles ont été exposées au virus et/ou aux différentes molécules ou différents extraits de plantes pendant 24h. Les plaques ont ensuite été centrifugées. 50 µL de surnageant ont été prélevés de chaque puits et déposés dans une nouvelle plaque, et 50 µL de réactif du kit commercial (CytoTox 96®Non-

Radioactive Cytotoxicity Assay, Ref. G1782, Promega) ont été ajoutés à chaque puits. 30 min plus tard la réaction est arrêtée avec l'aide la solution STOP du kit et la densité optique mesurée à 490 nm (BIOTEK Cytation 5 imaging reader).

Le test MTT (3-(4-5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

Les cellules ont été mises en culture dans des plaques de 96 puits. 24h plus tard, elles ont été exposées au virus et/ou aux différentes molécules ou différents extraits de plantes pendant 20h. 20 µL de solution de MTT stérile et filtrée (5mg/mL) sont ensuite ajoutés dans chaque puits. 4h plus tard la plaque est centrifugée, le surnageant retiré et 200 µL de DMSO (dimethyl sulfoxide ou sulfoxyde de diméthyle) sont ajoutés pour resuspendre les cristaux de formazan. La densité optique est mesurée à 560 nm avec une référence à 670 nm (BIOTEK Cytation 5 imaging reader).

• **Méthode 4 : Immunofluorescence**

Les cellules ont été mises en culture sur fines lamelles (*coverslips*) en verre, préalablement nettoyées et stérilisées. Le lendemain, les cellules ont été infectées et/ou traitées. 24h plus tard, les *coverslips* ont été lavées et fixées à l'éthanol à 99% (-20°C). Après séchage, les *coverslips* ont été conservées à l'abri de l'humidité à -20°C jusqu'à utilisation.

Les *coverslips* sont réhydratées avec du PBS/BSA/azide, puis incubées sur la nuit avec l'anticorps primaire. Les *coverslips* sont ensuite lavées puis incubées avec les anticorps secondaires et le DAPI pendant 2h. Les *coverslips* sont lavées puis montées sur lame avec du Vectashield (Vector Labs, Clinisciences). Les images sont capturées sous un microscope Nikon à fluorescence équipé d'une caméra Hamamatsu Orca à haute sensibilité.

**Tableau 11.** Anticorps utilisés pour les immunofluorescences.

<b>Anticorps primaires</b>	
Anticorps de lapin anti- <i>alphavirus</i> capsid	Pr Andres Merits, Tartu, Estonie
Anticorps de lapin anti-LC3	Nours Biological, NB100-2220
Anticorps de lapin anti-Collagen 1	Cell signaling technology, 720265
Anticorps de lapin anti-CD248	Cell signaling technology, 479788
Anticorps de lapin anti-CD90	Cell signaling technology, 138015
Anticorps de lapin anti- $\alpha$ -SMA	Cell signaling technology, 192455
Anticorps de souris anti-capsid d' <i>alphavirus</i>	Santa Cruz, sc-58088
<b>Anticorps secondaires</b>	
DAPI	Sigma, D9542
Anticorps de singe anti-lapin couplé à Alexa Fluor 594	Invitrogen, A21207
Anticorps de singe anti-souris couplé à Alexa 488	Invitrogen, A21202

- **Méthode 5 : RT-PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR ou quantitative real-time RT-PCR)**

Après infection et/ou traitement, l'ARN des cellules est extrait à l'aide du kit d'extraction Zymo (ZYMO, R1035, Ozyme).

Les analyses qRT-PCR ont été réalisées avec le kit SENSIFAST (BIO-76005) "One step RT PCR with SYBR®" et le QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) dans un volume final de 5 µL (1 µL d'ARN extrait, 2,7 µL de mix d'enzymes et 1,3 µL de mix d'amorces). Le GAPDH a été utilisé comme gène de ménage. L'expression relative a été calculée à l'aide de la méthode du DDCT (delta delta Ct).

Les amorcées utilisées pour les analyses qRT-PCR sont listées dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 12. Listes des amorces utilisées.**

Nom	Séquence	Fournisseur
GAPDH	F: CCA TGC GGA AGG TGA AGG TC	Eurogentec
	R: ACA TGT AAA CCA TGT AGT TGA GGT	
E1	F: CAC CGT CCC CGT ACG TAA AA	Eurofins
	R: GGC TCT GTA GGC TGA TGC AA	
E2	F: CCC CTG ACT ACA CGC TGA TG	Eurogentec
	R: CCT TCA TTG GAG CCG TCA CA	
nsP2	F: GCG GAG CAG GTA AAA ACG TG	Eurogentec
	R: TAG AAC ACG CCC GTC GTA TG	
Capside	F: CGC AGC TTA CGG GTT TCA TA	Genecust
	R: GCA ACG CCT TCA GAA ACG C	
ISG15	F: TTT GCC AGT ACA GGA GCT TGT G	Sigma
	R: GGG TGA TCT GCG CCT TCA	
IFN-β	F: GTC ACT GTG CCT GGA CCA TA	Eurogentec
	R: ACA GCA TCT GCT GGT TGA AGA	
MXRA8	F: TTA CTG TGG CCT GCA CGA AC	Eurogentec
	R: CTC TCG GGG ACG ATG ACA TT	
RIG-I	F: CCA TAT CTC AGC TGG GTG ACA A	Sigma
	R: GCT ATC GGG TCA ACA ACA GCT T	
MDA5	F: CTG TTT ACA TTG CCA GGA TC	Eurofins
	R: ACA CCA GCA TCT TCT CCA TTT	
TLR7	F: CCA CAA CCA ACT GAC CAC TG	Sigma
	R: CCA CCA GAC AAA CCA CAC AG	
IRF3	F: CCT CAC GAC CCA CAT AAA ATC	Sigma
	R: GTA GAA GGC TGT CAC CTC GAA	

**Tableau 12.** (Suite et fin). Listes des amorces utilisées.

CCL2	F: CTG CTC ATA GCA GCC ACC TT	Eurogentec
	R: CTT GAA GAT CAC AGC TTC TTT GGG	
CCL5	F: TCC TCA TTG CTA CTG CCC TC	Eurogentec
	R: TCG GGT GAC AAA GAC GAC TG	
CXCL8	F: TACAGGGAGAGGGAGCGATAA	Eurogentec
	R: TGGACCGAAGGCGCTTGT	
TNF- $\alpha$	F: GCT GCA CTT TGG AGT GAT CG	Sigma
	R: GAG GGG TTT GCT ACA ACA TGG G	
STAT1	F: TGG TGA AAT TGC AAG AGC TG	Sigma
	R: AGA GGT CGT CTC GAG GTC AA	
MAPK	F: AGCAAGGGAGAGATGGTGTA	Genecust
	R: CAGTGTCTAAGGGCTGCCAC	
AMPK	F: GGGAAAGTGAAGGTGGGCAA	Genecust
	R: GATGTGAGGGTGCCTGAACA	
NF- $\kappa$ B	CCGGCCCCGCTGAATCATTCTC	Eurogentec
	CAGGTGGCGACCGTGATACCT	
PI3K	F: ACCATGGAGGAGAACCCTTATG	Genecust
	R: ACGGACAGTGCTCCTCCTTA	
Caspase 1	F: GCTTTCTGCTCTCCACACC	Genecust
	R: AAATGAAAATCGAACCTTGC	
STAT3	F: CCGAGCCAATTGTGATGCTT	Genecust
	R: GCATGTTGTACCACAGGATG	

- **Méthode 6 : ELISA**

Le surnageant des cellules a été récupéré après l'infection et/ou traitement et conservé à -20°C. Après décongélation les tests ELISA ont été réalisés à partir des indications données par le fournisseur (CCL2 : Human MCP-1 (CCL2) Standard TMB ELISA Development Kit, Peprotech, Catalog# 900-T31 ; CCL5 : Human RANTES (CCL5) Standard ABTS ELISA Development Kit, Catalog# 900-K33 et TNF- $\alpha$  : Human TNF- $\alpha$  Standard ABTS ELISA Development Kit, Preprotech, Catalog# 900-K25).

- **Méthode 7 : Test Folin-Ciocalteu**

Le test Folin-Ciocalteu permet de doser les composés phénoliques présents dans un échantillon ou la capacité réductrice totale d'un échantillon contenant des polyphénols réducteurs. L'échantillon est placé en contact avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Il s'agit d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ). En

milieu basique ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), les composés phénoliques sont transformés en ions phénolates puis en radicaux quinones par transfert d'électron. Ainsi, le réactif de Folin-Ciocalteu de couleur jaune est réduit et devient bleu/vert. L'absorbance, mesurée à 765 nm, est proportionnelle à la concentration en polyphénols de l'échantillon. Les résultats sont exprimés en acide gallique équivalent.

- **Méthode 8 : Test ORAC**

Le test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) permet d'évaluer le potentiel antioxydant d'un échantillon. Il est fondé sur la capacité de l'échantillon à réduire la vitesse d'oxydation de la fluorescéine par des radicaux peroxydes  $\text{ROO}\bullet$  générés par l'AAPH (2,2'-Azobis [2-méthyl- propionamidin]dihydrochloride). L'oxydation de la fluorescéine se traduit par une diminution de fluorescence au cours du temps. La fluorescence est mesurée à la longueur d'onde d'excitation de 485 nm et à la longueur d'onde d'émission de 530 nm. Le potentiel antioxydant de l'échantillon est déterminé par rapport à un échantillon contrôle (sans antioxydant) et un échantillon en présence d'un antioxydant de référence : le Trolox (acide 6-hydroxy-2, 5, 7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique). Le résultat est exprimé en valeur ORAC ou en Trolox équivalent.

- **Méthode 9 : Collecte et identification d'espèces végétales**

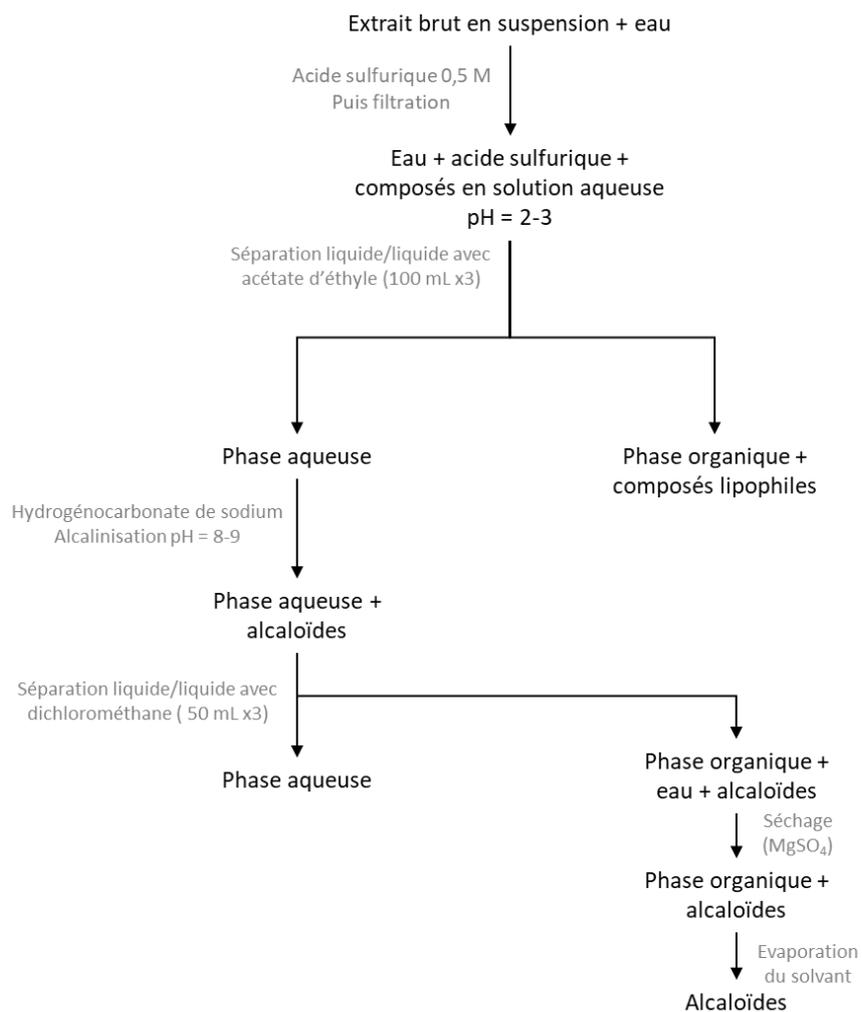
L'espèce *Argemone mexicana* a été récoltée à l'UFR Sciences et Technologie de Université de La Réunion (Point GPS : 20,901572 S ; 55,483656 E) et identifiée par le Pr Dominique Strasberg de l'UMR PVBMT de l'Université de La Réunion. L'espèce *Sophora denudata* a été récoltée près du Gîte du Volcan à La Réunion (Point GPS : 21,217533 S ; 55,687442 E) et identifiée par Alexis Gorissen botaniste au sein de l'UMR PVBMT de l'Université de La Réunion. *S. denudata* est une espèce protégée, sa collecte a été autorisée par la Direction de l'Environnement de l'Aménagement et du Logement (DEAL/SEB/UBIO/2020-36) après avis du Conseil Scientifique Régional du Patrimoine de la Région (CSRPN 2020-03). L'espèce *Tabernaemontana mauritiana* a été récoltée dans la forêt cultivée de Mare Longue à Saint-Philippe à La Réunion (Point GPS : 21,350095 S ; 55,743174 E) et identifiée par le Pr Dominique Strasberg. La collecte a été réalisée avec une autorisation spéciale du Parc National (Arrêté n° DIR - I - 2021 – 189 / Programme n°3 « Biodiversité des plantes comme sources de molécules actives » dont PHAR (Feder), PHYTODENGUE (INterregV) et TFORCE COVIR (Feder AMI).

- **Méthode 10 : Production des extraits bruts éthanoliques**

L'extraction a été effectuée à l'aide d'un extracteur de type Soxhlet, permettant une extraction continue, voire un épuisement, d'une poudre de plante, au moyen d'un solvant, porté au reflux et renouvelé en continu par distillation. Une masse de 30 g de poudre sèche de plante à extraire est placée dans une cartouche d'extraction (cellulose extraction thimbles, Whatman, Cat N° 2800373), disposée dans l'extracteur de Soxhlet. Un volume de 750 mL d'éthanol absolu (qualité RPE, Carlo Erba, 414606) est utilisé. Après 3h d'extraction, le mélange extractif contenu dans le ballon de récupération, est concentré, par évaporation du solvant, à température maximale de 40°C, sous pression réduite, à l'aide d'un évaporateur rotatif Rotavapor (Büchi. Rotavapor-R). L'extrait brut est conservé au froid jusqu'à utilisation.

- **Méthode 11 : Production des extraits « alcaloïdes totaux » (Figure 46)**

L'extrait brut éthanolique est resolubilisé partiellement dans de l'eau distillée (environ 25mL/1g). De l'acide sulfurique 0,5 M est ajouté pour atteindre un pH=2-3. La solution est placée sous agitation quelques minutes, puis elle est filtrée et placée dans une ampoule à décanter. Quatre lavages successifs de celle-ci, avec 100 mL d'acétate d'éthyle (qualité RPE, Carlo Erba, 30448252) à chaque fois, sont réalisés pour extraire les composés organiques de la phase aqueuse. Après décantation et récupération de la phase aqueuse, celle-ci est alcalinisée avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (ou carbonate de sodium) jusqu'à ne plus observer de dégazage et obtenir un pH=8-9. La phase aqueuse alcalinisée, susceptible de contenir les alcaloïdes bases, est finalement extraite avec trois fois 50 mL de dichlorométhane (qualité RPE, Carlo Erba, 30463003), pour extraire ceux-ci. Les phases organiques rassemblées sont séchées avec du sulfate de magnésium anhydre (MgSO<sub>4</sub>) (Merck, 105886), puis, après filtration, le solvant est évaporé sous pression réduite, afin d'obtenir le résidu « alcaloïdes totaux ».



**Figure 46. Diagramme de l'extraction « alcaloïdes totaux ».**

- **Méthode 12 : UHPLC-UV-MS**

Des solutions à 10 mg/ mL des extraits à analyser sont préparées dans des vials de chromatographie, par solubilisation dans du méthanol (qualité RPE, Carlo Erba, 30524102). Le système et la méthode utilisés sont décrits ci-après :

Système : UHPLC — système Vanquish — Thermo composé de :

Une pompe binaire VF-P10-A  
Un passeur VF-A10-A  
Un compartiment colonne VH-C10-A  
Un détecteur à barrette de diodes VF-D11-A  
Un spectromètre de masse ISQ-EC  
Système piloté par le logiciel Chromeleon 7.2

Colonne : Phenomenex Gemini, C18, 3 µm, 150 x 4,6 mm, 110 Å :

Température de la colonne : 35°C  
Éluant : eau (mQ) + 0,1 % d'acide formique (HPLC) / acétonitrile (UHPLC) + 0,1 % d'acide formique (HPLC)  
Débit : 0,6 mL/min  
Gradient : 95:5 → 0:100 (50 min), 0:100 (17 min)  
Concentration d'injection : 10 mg/mL  
Volume d'injection : 10 µL

Les paramètres de la méthode :

Détection UV-visible en 3D de 190 à 800 nm  
Détection MS : gamme m/z : 100-1250  
Ionisations positive et négative  
Température de vaporisation : 338 °C  
Température du tube de transfert d'ions : 300 °C  
Tension de la source pour les ions positifs : 3000 V  
Tension de la source pour les ions négatifs : -2000 V  
"sheath gas pressure" : 56.9 psig  
"aux gas pressure" : 6.5 psig  
"sweep gas pressure" : 0.5 psig  
"source CID voltage" : 20 V (CID collision-induced dissociation, à l'intérieur de la source : collision avec les molécules d'azote du flux gazeux)

• **Méthode 13 : Analyses statistiques**

Les données sont exprimées comme la moyenne ± SEM de trois expériences indépendantes. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 6.0. Les *p*-value sont calculés à partir d'une analyse de variance suivi du test de comparaison de Bonferroni.

# Bibliographie

- [1] Baltimore D. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev* 1971;35:235–41.
- [2] Baltimore classification ~ ViralZone [<https://viralzone.expasy.org/254>]
- [3] Chen R, Mukhopadhyay S, Merits A, Bolling B, Nasar F, Coffey LL, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Togaviridae. *J Gen Virol* 2018;99:761–2. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001072>.
- [4] Paredes A, Weaver S, Watowich S, Chiu W. Structural biology of old world and new world alphaviruses. In: Peters CJ, Calisher CH, editors. *Infect. Dis. Nat. Mech. Viral Emergence Persistence*, Vienna: Springer; 2005, p. 179–85. [https://doi.org/10.1007/3-211-29981-5\\_14](https://doi.org/10.1007/3-211-29981-5_14).
- [5] Forrester NL, Palacios G, Tesh RB, Savji N, Guzman H, Sherman M, et al. Genome-scale phylogeny of the alphavirus genus suggests a marine origin. *J Virol* 2012;86:2729–38. <https://doi.org/10.1128/JVI.05591-11>.
- [6] Karabatsos CHC Nick. *Arbovirus Serogroups: Definition and Geographic Distribution. The Arboviruses*, CRC Press; 1988. ISBN : 978-0-429-28022-1.
- [7] Weaver SC, Winegar R, Manger ID, Forrester NL. Alphaviruses: Population genetics and determinants of emergence. *Antiviral Res* 2012;94:242–57. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.04.002>.
- [8] Powers A, Brault A, Tesh R, Weaver S. Re-emergence of Chikungunya and O’nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *J Gen Virol* 2000;81:471–9. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-2-471>.
- [9] Rezza G, Chen R, Weaver SC. O’nyong-nyong fever: a neglected mosquito-borne viral disease. *Pathog Glob Health* 2017;111:271–5. <https://doi.org/10.1080/20477724.2017.1355431>.
- [10] Zaid A, Burt FJ, Liu X, Poo YS, Zandi K, Suhrbier A, et al. Arthritogenic alphaviruses: epidemiological and clinical perspective on emerging arboviruses. *Lancet Infect Dis* 2021;21:e123–33. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30491-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30491-6).
- [11] Suhrbier A, Jaffar-Bandjee M-C, Gasque P. Arthritogenic alphaviruses—an overview. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:420–9. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.64>.
- [12] Suhrbier A. Rheumatic manifestations of chikungunya: emerging concepts and interventions. *Nat Rev Rheumatol* 2019;15:597–611. <https://doi.org/10.1038/s41584-019-0276-9>.
- [13] Schuffenecker I, Iteman I, Michault A, Murri S, Frangeul L, Vaney M-C, et al. Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak. *PLOS Med* 2006;3:e263. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030263>.
- [14] Kiwanuka N, Sanders EJ, Rwaguma EB, Kawamata J, Ssengooba FP, Najjemba R, et al. O’Nyong-Nyong Fever in South-Central Uganda, 1996—1997: Clinical Features and Validation of a Clinical Case Definition for Surveillance Purposes. *Clin Infect Dis* 1999;29:1243–50. <https://doi.org/10.1086/313462>.
- [15] Sanders EJ, Rwaguma EB, Kawamata J, Kiwanuka N, Lutwama JJ, Ssengooba FP, et al. O’nyong-nyong Fever in South-Central Uganda, 1996–1997: Description of the Epidemic and Results of a Household-Based Seroprevalence Survey. *J Infect Dis* 1999;180:1436–43. <https://doi.org/10.1086/315073>.
- [16] Vanlandingham D, Hong C, Klingler K, Tssetsarkin K, Horne K, Powers A, et al. Differential Infectivities of O’Nyong-Nyong and Chikungunya Virus Isolates in

- Anopheles Gambiae and Aedes Aegypti Mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 2005;72:616–21. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2005.72.616>.
- [17] Bessaud M, Peyrefitte C, Pastorino B, Gravier P, Tock F, Boete F, et al. O'nyong-nyong Virus, Chad. *Emerg Infect Dis* 2006;12:1248–50. <https://doi.org/10.3201/eid1208.060199>.
- [18] Tappe D, Kapaun A, Emmerich P, Campos R de M, Cadar D, Günther S, et al. O'nyong-nyong Virus Infection Imported to Europe from Kenya by a Traveler. *Emerg Infect Dis* 2014;20:1766–7. <https://doi.org/10.3201/eid2010.140823>.
- [19] Woodruff AW, Bowen ET, Platt GS. Viral infections in travellers from tropical Africa. *Br Med J* 1978;1:956–8. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.6118.956>.
- [20] Rulli NE, Melton J, Wilmes A, Ewart G, Mahalingam S. The Molecular and Cellular Aspects of Arthritis Due to Alphavirus Infections. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1102:96–108. <https://doi.org/10.1196/annals.1408.007>.
- [21] Mandary MB, Masomian M, Poh CL. Impact of RNA Virus Evolution on Quasispecies Formation and Virulence. *Int J Mol Sci* 2019;20:4657. <https://doi.org/10.3390/ijms20184657>.
- [22] Strauss EG, Rice CM, Strauss JH. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of Sindbis virus. *Virology* 1984;133:92–110. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(84\)90428-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(84)90428-8).
- [23] Strauss JH, Strauss EG. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev* 1994;58:491–562. <https://doi.org/10.1128/mr.58.3.491-562.1994>.
- [24] Abu Bakar F, Ng LFP. Nonstructural Proteins of Alphavirus—Potential Targets for Drug Development. *Viruses* 2018;10:71. <https://doi.org/10.3390/v10020071>.
- [25] Fros JJ, Liu WJ, Prow NA, Geertsema C, Ligtenberg M, Vanlandingham DL, et al. Chikungunya Virus Nonstructural Protein 2 Inhibits Type I/II Interferon-Stimulated JAK-STAT Signaling. *J Virol* 2010;84:10877–87. <https://doi.org/10.1128/JVI.00949-10>.
- [26] Abdelnabi R, Jacobs S, Delang L, Neyts J. Antiviral drug discovery against arthritogenic alphaviruses: Tools and molecular targets. *Biochem Pharmacol* 2020;174:113777. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113777>.
- [27] Snyder JE, Kulcsar KA, Schultz KLW, Riley CP, Neary JT, Marr S, et al. Functional Characterization of the Alphavirus TF Protein. *J Virol* 2013;87:8511–23. <https://doi.org/10.1128/JVI.00449-13>.
- [28] Leung JY-S, Ng MM-L, Chu JJH. Replication of Alphaviruses: A Review on the Entry Process of Alphaviruses into Cells. *Adv Virol* 2011;2011:e249640. <https://doi.org/10.1155/2011/249640>.
- [29] Subudhi BB, Chattopadhyay S, Mishra P, Kumar A. Current Strategies for Inhibition of Chikungunya Infection. *Viruses* 2018;10:235. <https://doi.org/10.3390/v10050235>.
- [30] Schwartz O, Albert ML. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:491–500. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2368>.
- [31] Chazal N, Briant L. Chikungunya Virus Entry and Replication. In: Okeoma CM, editor. *Chikungunya Virus*, Springer International Publishing; 2016, p. 127–48. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-42958-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-42958-8_8). ISBN : 978-3-319-42956-4 978-3-319-42958-8
- [32] Couderc T, Chrétien F, Schilte C, Disson O, Brigitte M, Guivel-Benhassine F, et al. A Mouse Model for Chikungunya: Young Age and Inefficient Type-I Interferon Signaling Are Risk Factors for Severe Disease. *PLoS Pathog* 2008;4:e29. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040029>.

- [33] Schilte C, Couderc T, Chrétien F, Sourisseau M, Gangneux N, Guivel-Benhassine F, et al. Type I IFN controls chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells. *J Exp Med* 2010;207:429–42. <https://doi.org/10.1084/jem.20090851>.
- [34] Sourisseau M, Schilte C, Casartelli N, Trouillet C, Guivel-Benhassine F, Rudnicka D, et al. Characterization of Reemerging Chikungunya Virus. *PLoS Pathog* 2007;3. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030089>.
- [35] Chow A, Her Z, Ong EKS, Chen J, Dimatatac F, Kwek DJC, et al. Persistent Arthralgia Induced by Chikungunya Virus Infection is Associated with Interleukin-6 and Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor. *J Infect Dis* 2011;203:149–57. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq042>.
- [36] Labadie K, Larcher T, Joubert C, Mannioui A, Delache B, Brochard P, et al. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. *J Clin Invest* 2010;120:894–906. <https://doi.org/10.1172/JCI40104>.
- [37] Hoarau J-J, Jaffar-Bandjee M-C, Kreijbich-Trotot P, Das T, Li-Pat-Yuen G, Dassa B, et al. Persistent Chronic Inflammation and Infection by Chikungunya Arthritogenic Alphavirus in Spite of a Robust Host Immune Response. *J Immunol* 2010;184:5914–27. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900255>.
- [38] Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* 2006;7:131–7. <https://doi.org/10.1038/ni1303>.
- [39] Koyama S, Ishii KJ, Coban C, Akira S. Innate immune response to viral infection. *Cytokine* 2008;43:336–41. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.07.009>.
- [40] Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, et al. Cell Type-Specific Involvement of RIG-I in Antiviral Response. *Immunity* 2005;23:19–28. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.04.010>.
- [41] Her Z, Teng T-S, Tan JLL, Teo T-H, Kam Y-W, Lum F-M, et al. Loss of TLR3 aggravates CHIKV replication and pathology due to an altered virus-specific neutralizing antibody response. *EMBO Mol Med* 2015;7:24–41. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404459>.
- [42] Neighbours LM, Long K, Whitmore AC, Heise MT. Myd88-Dependent Toll-Like Receptor 7 Signaling Mediates Protection from Severe Ross River Virus-Induced Disease in Mice. *J Virol* 2012;86:10675–85. <https://doi.org/10.1128/JVI.00601-12>.
- [43] Akhrymuk I, Frolov I, Frolova EI. Both RIG-I and MDA5 detect alphavirus replication in concentration-dependent mode. *Virology* 2016;487:230–41. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.09.023>.
- [44] Olgarnier D, Scholte FEM, Chiang C, Albulescu IC, Nichols C, He Z, et al. Inhibition of Dengue and Chikungunya Virus Infections by RIG-I-Mediated Type I Interferon-Independent Stimulation of the Innate Antiviral Response. *J Virol* 2014;88:4180–94. <https://doi.org/10.1128/JVI.03114-13>.
- [45] Danillo Lucas Alves E, Benedito Antonio Lopes da F. Characterization of the immune response following in vitro mayaro and chikungunya viruses (Alphavirus, Togaviridae) infection of mononuclear cells. *Virus Res* 2018;256:166–73. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.08.011>.
- [46] Zhang R, Kim AS, Fox JM, Nair S, Basore K, Klimstra WB, et al. Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. *Nature* 2018;557:570–4. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0121-3>.
- [47] Zhang R, Earnest JT, Kim AS, Winkler ES, Desai P, Adams LJ, et al. Expression of the Mxra8 Receptor Promotes Alphavirus Infection and Pathogenesis in Mice and Drosophila. *Cell Rep* 2019;28:2647–2658.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.105>.

- [48] Kanneganti T-D. Central roles of NLRs and inflammasomes in viral infection. *Nat Rev Immunol* 2010;10:688–98. <https://doi.org/10.1038/nri2851>.
- [49] Klimstra WB, Nangle EM, Smith MS, Yurochko AD, Ryman KD. DC-SIGN and L-SIGN Can Act as Attachment Receptors for Alphaviruses and Distinguish between Mosquito Cell- and Mammalian Cell-Derived Viruses. *J Virol* 2003;77:12022–32. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.22.12022-12032.2003>.
- [50] Suchowiecki K, Reid StP, Simon GL, Firestein GS, Chang A. Persistent Joint Pain Following Arthropod Virus Infections. *Curr Rheumatol Rep* 2021;23:26. <https://doi.org/10.1007/s11926-021-00987-y>.
- [51] Carpentier KS, Morrison TE. Innate immune control of alphavirus infection. *Curr Opin Virol* 2018;28:53–60. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.11.006>.
- [52] Fensterl V, Sen GC. Interferons and viral infections. *BioFactors* 2009;35:14–20. <https://doi.org/10.1002/biof.6>.
- [53] Chen I, Ichinohe T. Response of host inflammasomes to viral infection. *Trends Microbiol* 2015;23. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.09.007>.
- [54] Cook LE, Locke MC, Young AR, Monte K, Hedberg ML, Shimak RM, et al. Distinct Roles of Interferon Alpha and Beta in Controlling Chikungunya Virus Replication and Modulating Neutrophil-Mediated Inflammation. *J Virol* 2019;94:e00841-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00841-19>.
- [55] Wauquier N, Becquart P, Nkoghe D, Padilla C, Ndjoyi-Mbiguino A, Leroy EM. The Acute Phase of Chikungunya Virus Infection in Humans Is Associated With Strong Innate Immunity and T CD8 Cell Activation. *J Infect Dis* 2011;204:115–23. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq006>.
- [56] Seymour RL, Rossi SL, Bergren NA, Plante KS, Weaver SC. The Role of Innate versus Adaptive Immune Responses in a Mouse Model of O’Nyong-Nyong Virus Infection. *Am J Trop Med Hyg* 2013;88:1170–9. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0674>.
- [57] Ryman KD, Klimstra WB, Nguyen KB, Biron CA, Johnston RE. Alpha/beta interferon protects adult mice from fatal Sindbis virus infection and is an important determinant of cell and tissue tropism. *J Virol* 2000;74:3366–78. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.7.3366-3378.2000>.
- [58] Grieder FB, Vogel SN. Role of Interferon and Interferon Regulatory Factors in Early Protection against Venezuelan Equine Encephalitis Virus Infection. *Virology* 1999;257:106–18. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9662>.
- [59] Rudd PA, Wilson J, Gardner J, Larcher T, Babarit C, Le TT, et al. Interferon Response Factors 3 and 7 Protect against Chikungunya Virus Hemorrhagic Fever and Shock. *J Virol* 2012;86:9888–98. <https://doi.org/10.1128/JVI.00956-12>.
- [60] Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, et al. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 2005;6:981–8. <https://doi.org/10.1038/ni1243>.
- [61] Werneke SW, Schilte C, Rohatgi A, Monte KJ, Michault A, Arenzana-Seisdedos F, et al. ISG15 Is Critical in the Control of Chikungunya Virus Infection Independent of UbE1L Mediated Conjugation. *PLOS Pathog* 2011;7:e1002322. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002322>.
- [62] Lenschow DJ, Lai C, Frias-Staheli N, Giannakopoulos NV, Lutz A, Wolff T, et al. IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:1371–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607038104>.
- [63] Schoggins JW. Interferon-stimulated genes: roles in viral pathogenesis. *Curr Opin Virol* 2014;6:40–6. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.03.006>.

- [64] Schoggins JW. Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? *Annu Rev Virol* 2019;6:567–84. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015756>.
- [65] Teng T-S, Foo S-S, Simamarta D, Lum F-M, Teo T-H, Lulla A, et al. Viperin restricts chikungunya virus replication and pathology. *J Clin Invest* 2012;122:4447–60. <https://doi.org/10.1172/JCI63120>.
- [66] Mostafavi H, Abeyratne E, Zaid A, Taylor A. Arthritogenic Alphavirus-Induced Immunopathology and Targeting Host Inflammation as A Therapeutic Strategy for Alphaviral Disease. *Viruses* 2019;11:E290. <https://doi.org/10.3390/v11030290>.
- [67] Zaid A, Gérardin P, Taylor A, Mostafavi H, Malvy D, Mahalingam S. Review: Chikungunya Arthritis: Implications of Acute and Chronic Inflammation Mechanisms on Disease Management. *Arthritis Rheumatol* 2018;70:484–95. <https://doi.org/10.1002/art.40403>.
- [68] Cavalheiro MG, Costa LSD, Campos HS, Alves LS, Assunção-Miranda I, Poian ATD. Macrophages as target cells for Mayaro virus infection: involvement of reactive oxygen species in the inflammatory response during virus replication. *An Acad Bras Ciênc* 2016;88:1485–99. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201620150685>.
- [69] Gardner J, Anraku I, Le TT, Larcher T, Major L, Roques P, et al. Chikungunya virus arthritis in adult wild-type mice. *J Virol* 2010;84:8021–32. <https://doi.org/10.1128/JVI.02603-09>.
- [70] Kumar S, Jaffar-Bandjee M-C, Giry C, Connén de Kerillis L, Merits A, Gasque P, et al. Mouse macrophage innate immune response to chikungunya virus infection. *Virol J* 2012;9:313. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-313>.
- [71] Lidbury BA, Rulli NE, Suhrbier A, Smith PN, McColl SR, Cunningham AL, et al. Macrophage-Derived Proinflammatory Factors Contribute to the Development of Arthritis and Myositis after Infection with an Arthrogenic Alphavirus. *J Infect Dis* 2008;197:1585–93. <https://doi.org/10.1086/587841>.
- [72] Spellberg B, Edwards JE Jr. Type 1/Type 2 Immunity in Infectious Diseases. *Clin Infect Dis* 2001;32:76–102. <https://doi.org/10.1086/317537>.
- [73] Owen JA, Punt J, Stranford SA. *Immunologie, Le cours de Janis Kuby*. 7ème. DUNOD; 2014.
- [74] Marques RE, Guabiraba R, Russo RC, Teixeira MM. Targeting CCL5 in inflammation. *Expert Opin Ther Targets* 2013;17:1439–60. <https://doi.org/10.1517/14728222.2013.837886>.
- [75] Russo RC, Garcia CC, Teixeira MM, Amaral FA. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev Clin Immunol* 2014;10:593–619. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2014.894886>.
- [76] Assunção-Miranda I, Cruz-Oliveira C, Da Poian AT. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of alphavirus-induced arthritis. *BioMed Res Int* 2013;2013. <https://doi.org/10.1155/2013/973516>.
- [77] Kam Y-W, Lum F-M, Teo T-H, Lee WWL, Simarmata D, Harjanto S, et al. Early neutralizing IgG response to Chikungunya virus in infected patients targets a dominant linear epitope on the E2 glycoprotein. *EMBO Mol Med* 2012;4:330–43. <https://doi.org/10.1002/emmm.201200213>.
- [78] Panning M, Grywna K, van Esbroeck M, Emmerich P, Drosten C. Chikungunya Fever in Travelers Returning to Europe from the Indian Ocean Region, 2006. *Emerg Infect Dis* 2008;14:416–22. <https://doi.org/10.3201/eid1403.070906>.
- [79] Hawman DW, Fox JM, Ashbrook AW, May NA, Schroeder KMS, Torres RM, et al. Pathogenic Chikungunya Virus Evades B Cell Responses to Establish Persistence. *Cell Rep* 2016;16:1326–38. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.076>.

- [80] Powell LA, Fox JM, Kose N, Kim AS, Majedi M, Bombardi R, et al. Human monoclonal antibodies against Ross River virus target epitopes within the E2 protein and protect against disease. *PLoS Pathog* 2020;16:e1008517. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008517>.
- [81] Earnest JT, Basore K, Roy V, Bailey AL, Wang D, Alter G, et al. Neutralizing antibodies against Mayaro virus require Fc effector functions for protective activity. *J Exp Med* 2019;216:2282–301. <https://doi.org/10.1084/jem.20190736>.
- [82] Tanabe ISB, Tanabe ELL, Santos EC, Martins WV, Araújo IMTC, Cavalcante MCA, et al. Cellular and Molecular Immune Response to Chikungunya Virus Infection. *Front Cell Infect Microbiol* 2018;8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00345>.
- [83] Lee GR. The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity. *Int J Mol Sci* 2018;19:730. <https://doi.org/10.3390/ijms19030730>.
- [84] Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383:787–93. <https://doi.org/10.1038/383787a0>.
- [85] Teo T-H, Lum F-M, Claser C, Lulla V, Lulla A, Merits A, et al. A Pathogenic Role for CD4+ T Cells during Chikungunya Virus Infection in Mice. *J Immunol* 2013;190:259–69. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202177>.
- [86] Chaaithanya IK, Muruganandam N, Sundaram SG, Kawalekar O, Sugunan AP, Manimunda SP, et al. Role of Proinflammatory Cytokines and Chemokines in Chronic Arthropathy in CHIKV Infection. *Viral Immunol* 2011;24:265–71. <https://doi.org/10.1089/vim.2010.0123>.
- [87] Chen W, Foo S-S, Sims NA, Herrero LJ, Walsh NC, Mahalingam S. Arthritogenic alphaviruses: new insights into arthritis and bone pathology. *Trends Microbiol* 2015;23:35–43.
- [88] Sandquist I, Kolls J. Update on regulation and effector functions of Th17 cells. *F1000Research* 2018;7:205. <https://doi.org/10.12688/f1000research.13020.1>.
- [89] Danillo Lucas Alves E, Benedito Antonio Lopes da F. Characterization of the immune response following in vitro mayaro and chikungunya viruses (Alphavirus, Togaviridae) infection of mononuclear cells. *Virus Res* 2018;256:166–73. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.08.011>.
- [90] Davenport BJ, Bullock C, McCarthy MK, Hawman DW, Murphy KM, Kedl RM, et al. Chikungunya Virus Evades Antiviral CD8+ T Cell Responses To Establish Persistent Infection in Joint-Associated Tissues. *J Virol* 2020;94:e02036-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.02036-19>.
- [91] Dias CN de S, Gois BM, Lima VS, Guerra-Gomes IC, Araújo JMG, Gomes J de AS, et al. Human CD8 T-cell activation in acute and chronic chikungunya infection. *Immunology* 2018;155:499–504. <https://doi.org/10.1111/imm.12992>.
- [92] Fazakerley JK, Webb HEY. Semliki Forest Virus-induced, Immune-mediated Demyelination: Adoptive Transfer Studies and Viral Persistence in Nude Mice. *J Gen Virol* 1987;68:377–85. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-2-377>.
- [93] Subak-Sharpe I, Dyson H, Fazakerley J. In vivo depletion of CD8+ T cells prevents lesions of demyelination in Semliki Forest virus infection. *J Virol* 1993;67:7629–33. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.12.7629-7633.1993>.
- [94] Burrack KS, Montgomery SA, Homann D, Morrison TE. CD8+ T Cells Control Ross River Virus Infection in Musculoskeletal Tissues of Infected Mice. *J Immunol* 2015;194:678–89. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401833>.
- [95] Frolova EI, Gorchakov R, Pereboeva L, Atasheva S, Frolov I. Functional Sindbis Virus Replicative Complexes Are Formed at the Plasma Membrane. *J Virol* 2010;84:11679–95. <https://doi.org/10.1128/JVI.01441-10>.

- [96] Garmashova N, Gorchakov R, Volkova E, Paessler S, Frolova E, Frolov I. The Old World and New World alphaviruses use different virus-specific proteins for induction of transcriptional shutoff. *J Virol* 2007;81:2472–84. <https://doi.org/10.1128/JVI.02073-06>.
- [97] Akhrymuk I, Kulemzin SV, Frolova EI. Evasion of the Innate Immune Response: the Old World Alphavirus nsP2 Protein Induces Rapid Degradation of Rpb1, a Catalytic Subunit of RNA Polymerase II. *J Virol* 2012;86:7180–91. <https://doi.org/10.1128/JVI.00541-12>.
- [98] Garmashova N, Gorchakov R, Frolova E, Frolov I. Sindbis Virus Nonstructural Protein nsP2 Is Cytotoxic and Inhibits Cellular Transcription. *J Virol* 2006;80:5686–96. <https://doi.org/10.1128/JVI.02739-05>.
- [99] Garmashova N, Atasheva S, Kang W, Weaver SC, Frolova E, Frolov I. Analysis of Venezuelan Equine Encephalitis Virus Capsid Protein Function in the Inhibition of Cellular Transcription. *J Virol* 2007;81:13552–65. <https://doi.org/10.1128/JVI.01576-07>.
- [100] Frolova EI, Fayzulin RZ, Cook SH, Griffin DE, Rice CM, Frolov I. Roles of Nonstructural Protein nsP2 and Alpha/Beta Interferons in Determining the Outcome of Sindbis Virus Infection. *J Virol* 2002;76:11254–64. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.22.11254-11264.2002>.
- [101] Thon-Hon VG, Denizot M, Li-Pat-Yuen G, Giry C, Jaffar-Bandjee M-C, Gasque P. Deciphering the differential response of two human fibroblast cell lines following Chikungunya virus infection. *Virol J* 2012;9:213. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-213>.
- [102] Ghlichloo I, Gerriets V. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs). StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.
- [103] Osafo N, Agyare C, Obiri DD, Antwi AO. Mechanism of Action of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. IntechOpen; 2017. <https://doi.org/10.5772/68090>.
- [104] Schäcke H, Döcke W-D, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther* 2002;96:23–43. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(02\)00297-8](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(02)00297-8).
- [105] Blaising J, Polyak SJ, Pécheur E-I. Arbidol as a broad-spectrum antiviral: An update. *Antiviral Res* 2014;107:84–94. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.04.006>.
- [106] Delogu I, Pastorino B, Baronti C, Nougairède A, Bonnet E, de Lamballerie X. In vitro antiviral activity of arbidol against Chikungunya virus and characteristics of a selected resistant mutant. *Antiviral Res* 2011;90:99–107. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.03.182>.
- [107] Di Mola A, Peduto A, La Gatta A, Delang L, Pastorino B, Neyts J, et al. Structure–activity relationship study of arbidol derivatives as inhibitors of chikungunya virus replication. *Bioorg Med Chem* 2014;22:6014–25. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.09.013>.
- [108] Al-Bari MdAA. Chloroquine analogues in drug discovery: new directions of uses, mechanisms of actions and toxic manifestations from malaria to multifarious diseases. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:1608–21. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv018>.
- [109] Furst DE. Pharmacokinetics of hydroxychloroquine and chloroquine during treatment of rheumatic diseases. *Lupus* 1996;5:11–5. <https://doi.org/10.1177/0961203396005001041>.
- [110] Al-Bari MdAA. Targeting endosomal acidification by chloroquine analogs as a promising strategy for the treatment of emerging viral diseases. *Pharmacol Res Perspect* 2017;5:e00293. <https://doi.org/10.1002/prp2.293>.

- [111] Chandramohan M, Selvam P, Vivekananthan S, Sivakumar D, De Clercq E. Antimalarial chloroquine metamorphosed into antiviral agent against HIV with four modes of actions. *BMC Infect Dis* 2012;12:O21. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-S1-O21>.
- [112] Zhang S, Yi C, Li C, Zhang F, Peng J, Wang Q, et al. Chloroquine inhibits endosomal viral RNA release and autophagy-dependent viral replication and effectively prevents maternal to fetal transmission of Zika virus. *Antiviral Res* 2019;169:104547. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104547>.
- [113] Khan M, Santhosh SR, Tiwari M, Lakshmana Rao PV, Parida M. Assessment of in vitro prophylactic and therapeutic efficacy of chloroquine against chikungunya virus in vero cells. *J Med Virol* 2010;82:817–24. <https://doi.org/10.1002/jmv.21663>.
- [114] Cassell S, Edwards J, Brown DT. Effects of lysosomotropic weak bases on infection of BHK-21 cells by Sindbis virus. *J Virol* 1984;52:857–64. <https://doi.org/10.1128/jvi.52.3.857-864.1984>
- [115] Helenius A, Marsh M, White J. Inhibition of Semliki forest virus penetration by lysosomotropic weak bases. *J Gen Virol* 1982;58 Pt 1:47–61. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-58-1-47>.
- [116] Maheshwari RK, Srikantan V, Bhartiya D. Chloroquine enhances replication of Semliki Forest virus and encephalomyocarditis virus in mice. *J Virol* 1991;65:992–5.
- [117] De Lamballerie X, Boisson V, Reynier J-C, Enault S, Charrel RN, Flahault A, et al. On chikungunya acute infection and chloroquine treatment. *Vector Borne Zoonotic Dis Larchmt N* 2008;8:837–9. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0049>.
- [118] Abdelnabi R, Jochmans D, Verbeken E, Neyts J, Delang L. Antiviral treatment efficiently inhibits chikungunya virus infection in the joints of mice during the acute but not during the chronic phase of the infection. *Antiviral Res* 2018;149:113–7. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.09.016>.
- [119] Delang L, Segura Guerrero N, Tas A, Quérat G, Pastorino B, Froeyen M, et al. Mutations in the chikungunya virus non-structural proteins cause resistance to favipiravir (T-705), a broad-spectrum antiviral. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:2770–84. <https://doi.org/10.1093/jac/dku209>.
- [120] Rothan HA, Bahrani H, Mohamed Z, Teoh TC, Shankar EM, Rahman NA, et al. A combination of doxycycline and ribavirin alleviated chikungunya infection. *PloS One* 2015;10:e0126360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126360>.
- [121] Briolant S, Garin D, Scaramozzino N, Jouan A, Crance JM. In vitro inhibition of Chikungunya and Semliki Forest viruses replication by antiviral compounds: synergistic effect of interferon- $\alpha$  and ribavirin combination. *Antiviral Res* 2004;61:111–7. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2003.09.005>.
- [122] Gallegos KM, Drusano GL, D'Argenio DZ, Brown AN. Chikungunya Virus: In Vitro Response to Combination Therapy With Ribavirin and Interferon Alfa 2a. *J Infect Dis* 2016;214:1192–7. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw358>.
- [123] Weber C, Sliva K, von Rhein C, Kümmerer BM, Schnierle BS. The green tea catechin, epigallocatechin gallate inhibits chikungunya virus infection. *Antiviral Res* 2015;113:1–3. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.11.001>.
- [124] Septembre-Malaterre A, Bedoui Y, Giry C, Gasque P, Guiraud P, Sélambarom J. Quercetin can reduce viral RNA level of O'nyong-nyong virus and resulting innate immune cytokine responses in cultured human synovial fibroblasts. *Sci Rep* 2021;11:6369. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85840-z>.
- [125] Wintachai P, Wikan N, Kuadkitkan A, Jaimipuk T, Ubol S, Pulmanausahakul R, et al. Identification of prohibitin as a Chikungunya virus receptor protein. *J Med Virol* 2012;84:1757–70. <https://doi.org/10.1002/jmv.23403>.

- [126] Lani R, Hassandarvish P, Chiam CW, Moghaddam E, Chu JJH, Rausalu K, et al. Antiviral activity of silymarin against chikungunya virus. *Sci Rep* 2015;5:11421. <https://doi.org/10.1038/srep11421>.
- [127] Konishi E, Hotta S. Effects of Tannic Acid and Its Related Compounds upon Chikungunya Virus. *Microbiol Immunol* 1979;23:659–67. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1979.tb00507.x>.
- [128] Kaur P, Thiruchelvan M, Lee RCH, Chen H, Chen KC, Ng ML, et al. Inhibition of Chikungunya Virus Replication by Harringtonine, a Novel Antiviral That Suppresses Viral Protein Expression. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:155–67. <https://doi.org/10.1128/AAC.01467-12>.
- [129] Varghese FS, Kaukinen P, Gläsker S, Bernaldo M, Hanski L, Wennerberg K, et al. Discovery of berberine, abamectin and ivermectin as antivirals against chikungunya and other alphaviruses. *Antiviral Res* 2016;126:117–24. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.12.012>.
- [130] Li N, Wang Z, Wang R, Zhang Z-R, Zhang Y-N, Deng C-L, et al. In Vitro Inhibition of Alphaviruses by Lycorine. *Virol Sin* 2021;36:1465–74. <https://doi.org/10.1007/s12250-021-00438-z>.
- [131] Nelson TJ, Sun M-K, Lim C, Sen A, Khan T, Chirila FV, et al. Bryostatin Effects on Cognitive Function and PKC $\epsilon$  in Alzheimer's Disease Phase IIa and Expanded Access Trials. *J Alzheimers Dis JAD* 2017;58:521–35. <https://doi.org/10.3233/JAD-170161>.
- [132] Farlow MR, Thompson RE, Wei L-J, Tuchman AJ, Grenier E, Crockford D, et al. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase II Study Assessing Safety, Tolerability, and Efficacy of Bryostatin in the Treatment of Moderately Severe to Severe Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis JAD* 2019;67:555–70. <https://doi.org/10.3233/JAD-180759>.
- [133] Plimack ER, Tan T, Wong Y-N, Von Mehren MM, Malizzia L, Roethke SK, et al. A phase I study of temsirolimus and bryostatin-1 in patients with metastatic renal cell carcinoma and soft tissue sarcoma. *The Oncologist* 2014;19:354–5. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2014-0020>.
- [134] Mehla R, Bivalkar-Mehla S, Zhang R, Handy I, Albrecht H, Giri S, et al. Bryostatin modulates latent HIV-1 infection via PKC and AMPK signaling but inhibits acute infection in a receptor independent manner. *PloS One* 2010;5:e11160. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011160>.
- [135] Abdelnabi R, Staveness D, Near KE, Wender PA, Delang L, Neyts J, et al. Comparative analysis of the anti-chikungunya virus activity of novel bryostatin analogs confirms the existence of a PKC-independent mechanism. *Biochem Pharmacol* 2016;120:15–21. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.020>.
- [136] Gupta DK, Kaur P, Leong ST, Tan LT, Prinsep MR, Chu JJH. Anti-Chikungunya Viral Activities of Aplysiatoxin-Related Compounds from the Marine Cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum*. *Mar Drugs* 2014;12:115–27. <https://doi.org/10.3390/md12010115>.
- [137] Powell LA, Miller A, Fox JM, Kose N, Klose T, Kim AS, et al. Human mAbs Broadly Protect against Arthritogenic Alphaviruses by Recognizing Conserved Elements of the Mxra8 Receptor-Binding Site. *Cell Host Microbe* 2020;28:699-711.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.07.008>.
- [138] Selvarajah S, Sexton NR, Kahle KM, Fong RH, Mattia K-A, Gardner J, et al. A Neutralizing Monoclonal Antibody Targeting the Acid-Sensitive Region in Chikungunya Virus E2 Protects from Disease. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7:e2423. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002423>.

- [139] Teo T-H, Chan Y-H, Lee WWL, Lum F-M, Amrun SN, Her Z, et al. Fingolimod treatment abrogates chikungunya virus-induced arthralgia. *Sci Transl Med* 2017;9:eaal1333. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aal1333>.
- [140] Varghese FS, Rausalu K, Hakanen M, Saul S, Kümmerer BM, Susi P, et al. Obatoclox Inhibits Alphavirus Membrane Fusion by Neutralizing the Acidic Environment of Endocytic Compartments. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61:e02227-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02227-16>.
- [141] Herrero LJ, Foo S-S, Sheng K-C, Chen W, Forwood MR, Bucala R, et al. Pentosan Polysulfate: a Novel Glycosaminoglycan-Like Molecule for Effective Treatment of Alphavirus-Induced Cartilage Destruction and Inflammatory Disease. *J Virol* 2015;89:8063–76. <https://doi.org/10.1128/JVI.00224-15>.
- [142] Miner JJ, Cook LE, Hong JP, Smith AM, Richner JM, Shimak RM, et al. Therapy with CTLA4-Ig and an antiviral monoclonal antibody controls chikungunya virus arthritis. *Sci Transl Med* 2017;9:eaah3438. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah3438>.
- [143] Chen W, Foo S-S, Taylor A, Lulla A, Merits A, Hueston L, et al. Bindarit, an Inhibitor of Monocyte Chemotactic Protein Synthesis, Protects against Bone Loss Induced by Chikungunya Virus Infection. *J Virol* 2014;89:581–93. <https://doi.org/10.1128/JVI.02034-14>.
- [144] Rulli NE, Guglielmotti A, Mangano G, Rolph MS, Apicella C, Zaid A, et al. Amelioration of alphavirus-induced arthritis and myositis in a mouse model by treatment with bindarit, an inhibitor of monocyte chemotactic proteins. *Arthritis Rheum* 2009;60:2513–23. <https://doi.org/10.1002/art.24682>.
- [145] Rulli NE, Rolph MS, Srikiatkachorn A, Anantapreecha S, Guglielmotti A, Mahalingam S. Protection From Arthritis and Myositis in a Mouse Model of Acute Chikungunya Virus Disease by Bindarit, an Inhibitor of Monocyte Chemotactic Protein-1 Synthesis. *J Infect Dis* 2011;204:1026–30. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir470>.
- [146] Pohjala L, Utt A, Varjak M, Lulla A, Merits A, Ahola T, et al. Inhibitors of Alphavirus Entry and Replication Identified with a Stable Chikungunya Replicon Cell Line and Virus-Based Assays. *PLoS One* 2011;6:e28923. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028923>.
- [147] Dobi A, Gasque P, Guiraud P, Selambarom J. Irinotecan (CPT-11) Canonical Anti-Cancer Drug Can also Modulate Antiviral and Pro-Inflammatory Responses of Primary Human Synovial Fibroblasts. *Cells* 2021;10:1431. <https://doi.org/10.3390/cells10061431>.
- [148] Varghese FS, Thaa B, Amrun SN, Simarmata D, Rausalu K, Nyman TA, et al. The Antiviral Alkaloid Berberine Reduces Chikungunya Virus-Induced Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. *J Virol* 2016;90:9743–57. <https://doi.org/10.1128/JVI.01382-16>.
- [149] Müller M, Slivinski N, Todd EJAA, Khalid H, Li R, Karwatka M, et al. Chikungunya virus requires cellular chloride channels for efficient genome replication. *PLoS Negl Trop Dis* 2019;13:e0007703. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007703>.
- [150] Eckels KH, Harrison VR, Hetrick FM. Chikungunya virus vaccine prepared by Tween-ether extraction. *Appl Microbiol* 1970;19:321–5. <https://doi.org/10.1128/am.19.2.321-325.1970>.
- [151] Harrison VR, Eckels KH, Bartelloni PJ, Hampton C. Production and Evaluation of a Formalin-Killed Chikungunya Vaccine1. *J Immunol* 1971;107:643–7. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.107.3.643>.
- [152] Tiwari M, Parida M, Santhosh SR, Khan M, Dash PK, Dash PK, et al. Assessment of immunogenic potential of Vero adapted formalin inactivated vaccine derived from novel

- ECSA genotype of Chikungunya virus. *Vaccine* 2009;27:2513–22. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.02.062>.
- [153] Edelman R, Tacket CO, Wasserman SS, Bodison SA, Perry JG, Mangiafico JA. Phase II safety and immunogenicity study of live chikungunya virus vaccine TSI-GSD-218. *Am J Trop Med Hyg* 2000;62:681–5. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2000.62.681>.
- [154] Weise WJ, Hermance ME, Forrester N, Adams AP, Langsjoen R, Gorchakov R, et al. A Novel Live-Attenuated Vaccine Candidate for Mayaro Fever. *PLoS Negl Trop Dis* 2014;8:e2969. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002969>.
- [155] Muthumani K, Lankaraman KM, Laddy DJ, Sundaram SG, Chung CW, Sako E, et al. Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against Chikungunya virus. *Vaccine* 2008;26:5128–34. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.03.060>.
- [156] Wang E, Volkova E, Adams AP, Forrester N, Xiao S-Y, Frolov I, et al. Chimeric alphavirus vaccine candidates for chikungunya. *Vaccine* 2008;26:5030–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.054>.
- [157] Akahata W, Yang Z-Y, Andersen H, Sun S, Holdaway HA, Kong W-P, et al. A virus-like particle vaccine for epidemic Chikungunya virus protects nonhuman primates against infection. *Nat Med* 2010;16:334–8. <https://doi.org/10.1038/nm.2105>.
- [158] Chen GL, Coates EE, Plummer SH, Carter CA, Berkowitz N, Conan-Cibotti M, et al. Effect of a Chikungunya Virus-Like Particle Vaccine on Safety and Tolerability Outcomes: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2020;323:1369–77. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2477>.
- [159] DeZure AD, Berkowitz NM, Graham BS, Ledgerwood JE. Whole-Inactivated and Virus-Like Particle Vaccine Strategies for Chikungunya Virus. *J Infect Dis* 2016;214:S497–9. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw352>.
- [160] Wang D, Suhrbier A, Penn-Nicholson A, Woraratanadharm J, Gardner J, Luo M, et al. A complex adenovirus vaccine against chikungunya virus provides complete protection against viraemia and arthritis. *Vaccine* 2011;29:2803–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.01.108>.
- [161] Partidos CD, Paykel J, Weger J, Borland EM, Powers AM, Seymour R, et al. Cross-Protective Immunity against O`Nyong-nyong Virus Afforded by a Novel Recombinant Chikungunya Vaccine. *Vaccine* 2012;30:4638–43. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.04.099>.
- [162] Ramsauer K, Reisinger E, Firbas C, Wiedermann-Schmidt U, Beubler E, Pfeiffer A, et al. Phase 2 clinical results: Chikungunya vaccine based on measles vector (MV-CHIK) induces humoral and cellular responses in the presence of pre-existing anti measles immunity. *Int J Infect Dis* 2019;79:118. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.11.291>.
- [163] Schneider M, Narciso-Abraham M, Hadl S, McMahon R, Toepfer S, Fuchs U, et al. Safety and immunogenicity of a single-shot live-attenuated chikungunya vaccine: a double-blind, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet* 2023;401:2138–47. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)00641-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)00641-4).
- [164] Roques P, Ljungberg K, Kümmerer BM, Gosse L, Dereuddre-Bosquet N, Tchitchek N, et al. Attenuated and vectored vaccines protect nonhuman primates against Chikungunya virus. *JCI Insight* 2017;2:e83527. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.83527>.
- [165] Roques P, Fritzer A, Dereuddre-Bosquet N, Wressnigg N, Hochreiter R, Bossevot L, et al. Effectiveness of CHIKV vaccine VLA1553 demonstrated by passive transfer of human sera. *JCI Insight* 2022;7:e160173. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.160173>.
- [166] De Lima Cavalcanti TYV, Pereira MR, de Paula SO, Franca RF de O. A Review on Chikungunya Virus Epidemiology, Pathogenesis and Current Vaccine Development. *Viruses* 2022;14:969. <https://doi.org/10.3390/v14050969>.

- [167] Valneva Announces U.S. FDA Approval of World's First Chikungunya Vaccine, IXCHIQ®, 2023. [<https://www.nasdaq.com/press-release/valneva-announces-u.s.-fda-approval-of-worlds-first-chikungunya-vaccine-ixchiqr-0>].
- [168] Lichman BR. The scaffold-forming steps of plant alkaloid biosynthesis. *Nat Prod Rep* 2021;38:103–29. <https://doi.org/10.1039/D0NP00031K>.
- [169] Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. *Natural Products (Secondary Metabolites)*. *Nat Prod* 2003;69. ISBN 10 : 2743021659.
- [170] Bruneton J. *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*. 5th ed. Lavoisier; 2016.
- [171] Cushnie TPT, Cushnie B, Lamb AJ. Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *Int J Antimicrob Agents* 2014;44:377–86. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.06.001>.
- [172] Heinrich M, Mah J, Amirkia V. Alkaloids Used as Medicines: Structural Phytochemistry Meets Biodiversity—An Update and Forward Look. *Molecules* 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26071836>.
- [173] Gutiérrez-Grijalva EP, López-Martínez LX, Contreras-Angulo LA, Elizalde-Romero CA, Heredia JB. Plant Alkaloids: Structures and Bioactive Properties. In: Swamy MK, editor. *Plant-Deriv. Bioact.*, Singapore: Springer Singapore; 2020, p. 85–117. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-2361-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-15-2361-8_5).
- [174] Evans WC, Evans D, Trease GE. *Trease and Evans pharmacognosy*. 16th ed. Edinburgh: Saunders/Elsevier; 2009. ISBN : 978-0-7020-2933-2.
- [175] Bhuiyan FR, Howlader S, Raihan T, Hasan M. Plants Metabolites: Possibility of Natural Therapeutics Against the COVID-19 Pandemic. *Front Med* 2020;7.
- [176] Kurek J. Introductory Chapter: Alkaloids - Their Importance in Nature and for Human Life. IntechOpen; 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85400>.
- [177] Aniszewski T. *Alkaloids - Secrets of Life: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role*. Elsevier; 2007. ISBN : 978-0-08-047533-2.
- [178] Yu M, Gouvinhas I, Rocha J, Barros AIRNA. Phytochemical and antioxidant analysis of medicinal and food plants towards bioactive food and pharmaceutical resources. *Sci Rep* 2021;11:10041. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89437-4>.
- [179] Liu Q, Zhang C, Fang H, Yi L, Li M. Indispensable biomolecules for plant defense against pathogens: NBS-LRR and “nitrogen pool” alkaloids. *Plant Sci* 2023;334:111752. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111752>.
- [180] Kutchan T. Alkaloid Biosynthesis - The Basis for Metabolic Engineering of Medicinal Plants. *Plant Cell* 1995;7:1059–70.
- [181] Mann J, Davidson RS, Hobbs JB, Banthorpe DV, Harborne JB. *Natural products : their chemistry and biological significance*. 1st ed. 1994. ISBN : 0-582-06009-5.
- [182] Thawabteh A, Juma S, Bader M, Karaman D, Scrano L, Bufo S, et al. The Biological Activity of Natural Alkaloids against Herbivores, Cancerous Cells and Pathogens. *Toxins* 2019;11:656. <https://doi.org/10.3390/toxins11110656>.
- [183] Amirkia V, Heinrich M. Alkaloids as drug leads – A predictive structural and biodiversity-based analysis. *Phytochem Lett* 2014;10:xlvi–liii. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.06.015>.
- [184] Plazas E, Avila MCM, Munoz DR, Cuca LES. Natural isoquinoline alkaloids: Pharmacological features and multi-target potential for complex diseases. *Pharmacol Res* 2022;177:106–26. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106126>.
- [185] Kaushik NK, Kaushik N, Attri P, Kumar N, Kim CH, Verma AK, et al. Biomedical Importance of Indoles. *Molecules* 2013;18:6620–62. <https://doi.org/10.3390/molecules18066620>.
- [186] Sravanthi TV, Manju SL. Indoles — A promising scaffold for drug development. *Eur J Pharm Sci* 2016;91:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.05.025>.

- [187] Ao C, Araki N, Tawata S. Cyclooxygenase Inhibitory Compounds with Antioxidant Activities from *Sophora subprostrata*. *Asian J Chem* 2009;21:10.
- [188] Li W, Yu X, Tan S, Liu W, Zhou L, Liu H. Oxymatrine inhibits non-small cell lung cancer via suppression of EGFR signaling pathway. *Cancer Med* 2018;7:208–18. <https://doi.org/10.1002/cam4.1269>.
- [189] Zhang Y, Liu H, Jin J, Zhu X, Lu L, Jiang H. The role of endogenous reactive oxygen species in oxymatrine-induced caspase-3-dependent apoptosis in human melanoma A375 cells: Anticancer Drugs 2010;21:494–501. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e328336e927>.
- [190] Benrui Lin BL, Dinuo Li DL, Lan Zhang LZ. Oxymatrine mediates Bax and Bcl-2 expression in human breast cancer MCF-7 cells. *Pharmazie* 2016;154–7. <https://doi.org/10.1691/ph.2016.5765>.
- [191] Dang Z, Zhu L, Lai W, Bogerd H, Lee K-H, Huang L, et al. Aloperine and Its Derivatives as a New Class of HIV-1 Entry Inhibitors. *ACS Med Chem Lett* 2016;7:240–4. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.5b00339>.
- [192] Zhang X, Lv X, Tang S, Mei L, Li Y, Zhang J, et al. Discovery and evolution of aloperine derivatives as a new family of HCV inhibitors with novel mechanism. *Eur J Med Chem* 2018;143:1053–65. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.002>.
- [193] Sandenon Seteyen A-L, Girard-Valenciennes E, Septembre-Malaterre A, Gasque P, Guiraud P, Sélambarom J. Anti-Alphaviral Alkaloids: Focus on Some Isoquinolines, Indoles and Quinolizidines. *Molecules* 2022;27:5080. <https://doi.org/10.3390/molecules27165080>.
- [194] Och A, Podgórski R, Nowak R. Biological Activity of Berberine—A Summary Update. *Toxins* 2020;12:713. <https://doi.org/10.3390/toxins12110713>.
- [195] Hou Q, He W-J, Wu Y-S, Hao H-J, Xie X-Y, Fu X-B. Berberine: A Traditional Natural Product With Novel Biological Activities. *Altern Ther Health Med* 2020;26:20–7.
- [196] Warowicka A, Nawrot R, Goździcka-Józefiak A. Antiviral activity of berberine. *Arch Virol* 2020;165:1935–45. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04706-3>.
- [197] Varghese F, van Woudenberg E, Overheul G, Eleveld M, Kurver L, van Heerbeek N, et al. Berberine and Obatoclax Inhibit SARS-Cov-2 Replication in Primary Human Nasal Epithelial Cells In Vitro. *Viruses* 2021;13:282. <https://doi.org/10.3390/v13020282>.
- [198] Bodiwala HS, Sabde S, Mitra D, Bhutani KK, Singh IP. Synthesis of 9-substituted derivatives of berberine as anti-HIV agents. *Eur J Med Chem* 2011;46:1045–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.01.016>.
- [199] Cecil CE, Davis JM, Cech NB, Laster SM. Inhibition of H1N1 influenza A virus growth and induction of inflammatory mediators by the isoquinoline alkaloid berberine and extracts of goldenseal (*Hydrastis canadensis*). *Int Immunopharmacol* 2011;11:1706–14. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.06.002>.
- [200] Shin H-B, Choi M-S, Yi C-M, Lee J, Kim N-J, Inn K-S. Inhibition of respiratory syncytial virus replication and virus-induced p38 kinase activity by berberine. *Int Immunopharmacol* 2015;27:65–8. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.04.045>.
- [201] Yang M-W, Chen F, Zhu D-J, Li J-Z, Zhu J-L, Zeng W, et al. Clinical efficacy of Matrine and Sodium Chloride Injection in treatment of 40 cases of COVID-19. *J Chin Mater Medica* 2020;45:2221–31. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20200323.501>.
- [202] Dong Y, Xi H, Yu Y, Wang Q, Jiang K, Li L. Effects of oxymatrine on the serum levels of T helper cell 1 and 2 cytokines and the expression of the S gene in hepatitis B virus S gene transgenic mice: A study on the anti-hepatitis B virus mechanism of oxymatrine. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:1299–306. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2002.02885.x>.

- [203] Dai J-P, Wang Q-W, Su Y, Gu L-M, Deng H-X, Chen X-X, et al. Oxymatrine Inhibits Influenza A Virus Replication and Inflammation via TLR4, p38 MAPK and NF- $\kappa$ B Pathways. *Int J Mol Sci* 2018;19:965. <https://doi.org/10.3390/ijms19040965>.
- [204] Lv X-Q, Zou L-L, Tan J-L, Li H, Li J-R, Liu N-N, et al. Aloperine inhibits hepatitis C virus entry into cells by disturbing internalisation from endocytosis to the membrane fusion process. *Eur J Pharmacol* 2020;883:173323. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173323>.
- [205] Chin LW, Cheng Y-W, Lin S-S, Lai Y-Y, Lin L-Y, Chou M-Y, et al. Anti-herpes simplex virus effects of berberine from *Coptidis rhizoma*, a major component of a Chinese herbal medicine, Ching-Wei-San. *Arch Virol* 2010;155:1933–41. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0779-9>.
- [206] Bodiwala HS, Sabde S, Mitra D, Bhutani KK, Singh IP. Synthesis of 9-substituted derivatives of berberine as anti-HIV agents. *Eur J Med Chem* 2011;46:1045–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.01.016>.
- [207] Lukanini A, Mercorelli B, Messa L, Palù G, Gribaudo G, Loregian A. The isoquinoline alkaloid berberine inhibits human cytomegalovirus replication by interfering with the viral Immediate Early-2 (IE2) protein transactivating activity. *Antiviral Res* 2019;164:52–60. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.02.006>.
- [208] Qiu S, Sun H, Zhang A-H, Xu H-Y, Yan G-L, Han Y, et al. Natural alkaloids: basic aspects, biological roles, and future perspectives. *Chin J Nat Med* 2014;12:401–6. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(14\)60063-7](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(14)60063-7).
- [209] Chen XS, Wang GJ, Cai X, Yu HY, Hu YP. Inhibition of hepatitis B virus by oxymatrine in vivo. *World J Gastroenterol* 2001;7:49–52. <https://doi.org/10.3748/wjg.v7.i1.49>.
- [210] Sang X, Wang R, Han Y, Zhang C, Shen H, Yang Z, et al. T cell-associated immunoregulation and antiviral effect of oxymatrine in hydrodynamic injection HBV mouse model. *Acta Pharm Sin B* 2017;7:311–8. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.02.005>.
- [211] Kausar S, Said Khan F, Ishaq Mujeeb Ur Rehman M, Akram M, Riaz M, Rasool G, et al. A review: Mechanism of action of antiviral drugs. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2021;35:20587384211002620. <https://doi.org/10.1177/20587384211002621>.
- [212] Malemud CJ. Immunomodulators in Autoimmunity and Viral Infections. *J Clin Cell Immunol* 2018;09. <https://doi.org/10.4172/2155-9899.1000537>.
- [213] Conant MA. Immunomodulatory therapy in the management of viral infections in patients with HIV infection. *J Am Acad Dermatol* 2000;43:S27–30. <https://doi.org/10.1067/mjd.2000.107810>.
- [214] Alijotas-Reig J, Esteve-Valverde E, Belizna C, Selva-O'Callaghan A, Pardos-Gea J, Quintana A, et al. Immunomodulatory therapy for the management of severe COVID-19. Beyond the anti-viral therapy: A comprehensive review. *Autoimmun Rev* 2020;19:102569. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102569>.
- [215] Cecil CE, Davis JM, Cech NB, Laster SM. Inhibition of H1N1 influenza A virus growth and induction of inflammatory mediators by the isoquinoline alkaloid berberine and extracts of goldenseal (*Hydrastis canadensis*). *Int Immunopharmacol* 2011;11:1706–14. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.06.002>.
- [216] Wolf S, Taylor A, Zaid A, Freitas J, Herrero LJ, Rao S, et al. Inhibition of Interleukin-1 $\beta$  Signaling by Anakinra Demonstrates a Critical Role of Bone Loss in Experimental Arthritogenic Alphavirus Infections. *Arthritis Rheumatol* 2019;71:1185–90. <https://doi.org/10.1002/art.40856>.
- [217] Kuo C-L, Chi C-W, Liu T-Y. The anti-inflammatory potential of berberine in vitro and in vivo. *Cancer Lett* 2004;203:127–37. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2003.09.002>.

- [218] Lin J-P, Yang J-S, Wu C-C, Lin S-S, Hsieh W-T, Lin M-L, et al. Berberine Induced Down-regulation of Matrix Metalloproteinase-1, -2 and -9 in Human Gastric Cancer Cells (SNU-5) In Vitro. In Vivo 2008;9.
- [219] Li L, Wang X, Sharvan R, Gao J, Qu S. Berberine could inhibit thyroid carcinoma cells by inducing mitochondrial apoptosis, G0/G1 cell cycle arrest and suppressing migration via PI3K-AKT and MAPK signaling pathways. Biomed Pharmacother 2017;95:1225–31. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.010>.
- [220] Jabbarzadeh Kaboli P, Leong MP-Y, Ismail P, Ling K-H. Antitumor effects of berberine against EGFR, ERK1/2, P38 and AKT in MDA-MB231 and MCF-7 breast cancer cells using molecular modelling and in vitro study. Pharmacol Rep 2019;71:13–23. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2018.07.005>.
- [221] Wu J-M, Chen Y, Chen J-C, Lin T-Y, Tseng S-H. Tetrandrine induces apoptosis and growth suppression of colon cancer cells in mice. Cancer Lett 2010;287:187–95. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.06.009>.
- [222] Kim JY, Lee SG, Chung J-Y, Kim Y-J, Park J-E, Koh H, et al. Ellipticine induces apoptosis in human endometrial cancer cells: The potential involvement of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinases. Toxicology 2011;289:91–102. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.07.014>.
- [223] Guo S, Gao C, Xiao W, Zhang J, Qu Y, Li J, et al. Matrine Protects Cardiomyocytes From Ischemia/Reperfusion Injury by Regulating HSP70 Expression Via Activation of the JAK2/STAT3 Pathway. Shock 2018;50:664–70. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001108>.
- [224] Li W, Li Y, Zhao Y, Ren L. The protective effects of aloperine against ox-LDL-induced endothelial dysfunction and inflammation in HUVECs. Artif Cells Nanomedicine Biotechnol 2020;48:107–15. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1699816>.
- [225] Yao R-B, Zhao Z-M, Zhao L-J, Cai H. Sinomenine inhibits the inflammatory responses of human fibroblast-like synoviocytes via the TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway in rheumatoid arthritis. Pharm 2017;72:355–60. <https://doi.org/10.1691/ph.2017.6946>.
- [226] Yi L, Lyn Y, Peng C, Zhu R, Bai S, Liu L, et al. Sinomenine inhibits fibroblast-like synoviocyte proliferation by regulating  $\alpha$ 7nAChR expression via ERK/Egr-1 pathway. Int Immunopharmacol 2018;56:65–70. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.01.015>.
- [227] Whitehouse MW, Fairlie DP, Thong YH. Anti-inflammatory activity of the isoquinoline alkaloid, tetrandrine, against established adjuvant arthritis in rats. Agents Actions 1994;42:123–7. <https://doi.org/10.1007/BF01983477>.
- [228] Wang Z, Chen Z, Yang S, Wang Y, Huang Z, Gao J, et al. Berberine Ameliorates Collagen-Induced Arthritis in Rats Associated with Anti-inflammatory and Anti-angiogenic Effects. Inflammation 2014;37:1789–98. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9909-y>.
- [229] Wang X, He X, Zhang C-F, Guo C-R, Wang C-Z, Yuan C-S. Anti-arthritic effect of berberine on adjuvant-induced rheumatoid arthritis in rats. Biomed Pharmacother 2017;89:887–93. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.099>.
- [230] Dinesh P, Rasool M. Berberine inhibits IL-21/IL-21R mediated inflammatory proliferation of fibroblast-like synoviocytes through the attenuation of PI3K/Akt signaling pathway and ameliorates IL-21 mediated osteoclastogenesis. Cytokine 2018;106:54–66. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.03.005>.
- [231] Ma A, Yang Y, Wang Q, Wang Y, Wen J, Zhang Y. Anti-inflammatory effects of oxymatrine on rheumatoid arthritis in rats via regulating the imbalance between Treg and Th17 cells. Mol Med Rep 2017;15:3615–22. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6484>.
- [232] Liang J, Chang B, Huang M, Huang W, Ma W, Liu Y, et al. Oxymatrine prevents synovial inflammation and migration via blocking NF- $\kappa$ B activation in rheumatoid

- fibroblast-like synoviocytes. *Int Immunopharmacol* 2018;55:105–11. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.12.006>.
- [233] Liu S-C, Lee H-P, Hung C-Y, Tsai C-H, Li T-M, Tang C-H. Berberine attenuates CCN2-induced IL-1 $\beta$  expression and prevents cartilage degradation in a rat model of osteoarthritis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015;289:20–9. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.08.020>.
- [234] Yin W, Wang T-S, Yin F-Z, Cai B-C. Analgesic and anti-inflammatory properties of brucine and brucine N-oxide extracted from seeds of *Strychnos nux-vomica*. *J Ethnopharmacol* 2003;88:205–14. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00224-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00224-1).
- [235] Chen Q, Liu J, Zhuang Y, Bai L, Yuan Q, Zheng S, et al. Identification of an IKK $\beta$  inhibitor for inhibition of inflammation in vivo and in vitro. *Pharmacol Res* 2019;149:104440. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104440>.
- [236] Zhang D, Li X, Hu Y, Jiang H, Wu Y, Ding Y, et al. Tabersonine attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via suppressing TRAF6 ubiquitination. *Biochem Pharmacol* 2018;154:183–92. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.05.004>.
- [237] Huang M, Hu Y-Y, Dong X-Q, Xu Q-P, Yu W-H, Zhang Z-Y. The protective role of oxymatrine on neuronal cell apoptosis in the hemorrhagic rat brain. *J Ethnopharmacol* 2012;143:228–35. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.06.028>.
- [238] Greten FR, Grivennikov SI. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity* 2019;51:27–41. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.06.025>.
- [239] Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Int J Mol Sci* 2018;19:448. <https://doi.org/10.3390/ijms19020448>.
- [240] Kishore R, Verma SK. Roles of STATs signaling in cardiovascular diseases. *JAK-STAT* 2012;1:118–24. <https://doi.org/10.4161/jkst.20115>.
- [241] Weischenfeldt J, Porse B. Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. *CSH Protoc* 2008;2008:pdb.prot5080. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5080>.
- [242] Nanus DE, Badoume A, Wijesinghe SN, Halsey AM, Hurley P, Ahmed Z, et al. Synovial tissue from sites of joint pain in knee osteoarthritis patients exhibits a differential phenotype with distinct fibroblast subsets. *EBioMedicine* 2021;72:103618. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103618>.
- [243] Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 2010;233:233–55. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2009.00859.x>.
- [244] Chillingworth NL, Donaldson LF. Characterisation of a Freund's complete adjuvant-induced model of chronic arthritis in mice. *J Neurosci Methods* 2003;128:45–52. [https://doi.org/10.1016/s0165-0270\(03\)00147-x](https://doi.org/10.1016/s0165-0270(03)00147-x).
- [245] Griffiths MM, Cannon GW, Corsi T, Reese V, Kunzler K. Collagen-induced arthritis in rats. *Methods Mol Med* 2007;136:201–14. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-402-5\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-402-5_15).
- [246] Cordell GA, Quinn-Beattie ML, Farnsworth NR. The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytother Res* 2001;15:183–205. <https://doi.org/10.1002/ptr.890>.
- [247] Dang Z, Zhu L, Lai W, Bogerd H, Lee K-H, Huang L, et al. Aloperine and Its Derivatives as a New Class of HIV-1 Entry Inhibitors. *ACS Med Chem Lett* 2016;7:240–4. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.5b00339>.
- [248] Ti H, Zhuang Z, Yu Q, Wang S. Progress of Plant Medicine Derived Extracts and Alkaloids on Modulating Viral Infections and Inflammation. *Drug Des Devel Ther* 2021;15:1385–408. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S299120>.

- [249] Azzeme A, Kamarul Zaman M. Plant toxins: alkaloids and their toxicities. *GSC Biol Pharm Sci* 2019;6:021–9. <https://doi.org/10.30574/gscbps.2019.6.2.0003>.
- [250] Qing Z-X, Yang P, Tang Q, Cheng P, Liu Y, Zheng Y, et al. Isoquinoline Alkaloids and Their Antiviral, Antibacterial, and Antifungal Activities and Structure-activity Relationship. *Curr Org Chem* 2017;21. <https://doi.org/10.2174/1385272821666170207114214>.
- [251] Ching K-C, F. P. Ng L, Chai CLL. A compendium of small molecule direct-acting and host-targeting inhibitors as therapies against alphaviruses. *J Antimicrob Chemother* 2017;72:2973–89. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx224>.
- [252] Davidson S, Coles M, Thomas T, Kollias G, Ludewig B, Turley S, et al. Fibroblasts as immune regulators in infection, inflammation and cancer. *Nat Rev Immunol* 2021;21:704–17. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00540-z>.
- [253] Lebeau G, Ah-Pine F, Daniel M, Bedoui Y, Vagner D, Frumence E, et al. Perivascular Mesenchymal Stem/Stromal Cells, an Immune Privileged Niche for Viruses? *Int J Mol Sci* 2022;23:8038. <https://doi.org/10.3390/ijms23148038>.
- [254] Risques biologiques - le cahier des préventions. CNRS, 2017.
- [255] Loeb F, Clark WM, Coatney GR, Coggeshall LT, Dieuaide FR, Dochez AR, et al. Activity Of A New Antimalarial Agent, Chloroquine (SN 7618): Statement Approved by the Board for Coordination of Malarial Studies. *J Am Med Assoc* 1946;130:1069–70. <https://doi.org/10.1001/jama.1946.02870160015006>.
- [256] Varisli L, Cen O, Vlahopoulos S. Dissecting pharmacological effects of chloroquine in cancer treatment: interference with inflammatory signaling pathways. *Immunology* 2020;159:257–78. <https://doi.org/10.1111/imm.13160>.
- [257] Brighton SW. Chloroquine phosphate treatment of chronic Chikungunya arthritis. An open pilot study. *South Afr Med J Suid-Afr Tydskr Vir Geneesk* 1984;66:217–8.
- [258] Egger ME, Huang JS, Yin W, McMasters KM, McNally LR. Inhibition of autophagy with chloroquine is effective in melanoma. *J Surg Res* 2013;184:274–81. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2013.04.055>.
- [259] Simmons JD, White LJ, Morrison TE, Montgomery SA, Whitmore AC, Johnston RE, et al. Venezuelan equine encephalitis virus disrupts STAT1 signaling by distinct mechanisms independent of host shutoff. *J Virol* 2009;83:10571–81. <https://doi.org/10.1128/JVI.01041-09>.
- [260] Fros JJ, Pijlman GP. Alphavirus Infection: Host Cell Shut-Off and Inhibition of Antiviral Responses. *Viruses* 2016;8:166. <https://doi.org/10.3390/v8060166>.
- [261] García-Sastre A, Biron CA. Type 1 Interferons and the Virus-Host Relationship: A Lesson in Détente. *Science* 2006;312:879–82. <https://doi.org/10.1126/science.1125676>.
- [262] Kadmiel M, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci* 2013;34:518–30. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.07.003>.
- [263] Bedoui Y. Mécanismes physiopathologiques des arthrites chroniques induites par le virus de chikungunya : rôle immuno-modulateur du méthotrexate. Thèse de doctorat. La Réunion, 2019.
- [264] Van Huizen E, McInerney GM. Activation of the PI3K-AKT Pathway by Old World Alphaviruses. *Cells* 2020;9:970. <https://doi.org/10.3390/cells9040970>.
- [265] Holmes AC, Basore K, Fremont DH, Diamond MS. A molecular understanding of alphavirus entry. *PLoS Pathog* 2020;16:e1008876. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008876>.
- [266] Suchowiecki K, Reid StP, Simon GL, Firestein GS, Chang A. Persistent Joint Pain Following Arthropod Virus Infections. *Curr Rheumatol Rep* 2021;23:26. <https://doi.org/10.1007/s11926-021-00987-y>.

- [267] Rao S, Taylor A. Arthritogenic Alphavirus Capsid Protein. *Life* 2021;11:230. <https://doi.org/10.3390/life11030230>.
- [268] Rupp JC, Sokoloski KJ, Gebhart NN, Hardy RW. Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *J Gen Virol* 2015;96:2483–500. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000249>.
- [269] Holmes AC, Basore K, Fremont DH, Diamond MS. A molecular understanding of alphavirus entry. *PLoS Pathog* 2020;16:e1008876. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008876>.
- [270] Zhang R, Kim AS, Fox JM, Nair S, Basore K, Klimstra WB, et al. Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. *Nature* 2018;557:570–4. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0121-3>.
- [271] Chun Y, Kim J. Autophagy: An Essential Degradation Program for Cellular Homeostasis and Life. *Cells* 2018;7:278. <https://doi.org/10.3390/cells7120278>.
- [272] Choi Y, Bowman JW, Jung JU. Autophagy during viral infection - a double-edged sword. *Nat Rev Microbiol* 2018;16:341–54. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0003-6>.
- [273] Echavarría-Consuegra L, Smit JM, Reggiori F. Role of autophagy during the replication and pathogenesis of common mosquito-borne flavi- and alphaviruses. *Open Biol* 2019;9:190009. <https://doi.org/10.1098/rsob.190009>.
- [274] Krejbich-Trotot P, Gay B, Li-Pat-Yuen G, Hoarau J-J, Jaffar-Bandjee M-C, Briant L, et al. Chikungunya triggers an autophagic process which promotes viral replication. *Virology* 2011;8:432. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-432>.
- [275] Joubert P-E, Werneke SW, De la Calle C, Guivel-Benhassine F, Giodini A, Peduto L, et al. Chikungunya virus-induced autophagy delays caspase-dependent cell death. *J Exp Med* 2012;209:1029–47. <https://doi.org/10.1084/jem.20110996>.
- [276] Jacob-Nascimento LC, Carvalho CX, Silva MMO, Kikuti M, Anjos RO, Fradico JRB, et al. Acute-Phase Levels of CXCL8 as Risk Factor for Chronic Arthralgia Following Chikungunya Virus Infection. *Front Immunol* 2021;12:744183. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.744183>.
- [277] Moreira TP, De Sousa CDF, De Melo Costa VR, Queiroz-Junior CM, Santos FM, Bonilha CS, et al. Tumour necrosis factor plays a deleterious role in the pathogenesis of chikungunya virus infection. *Immunology* 2023;168:444–58. <https://doi.org/10.1111/imm.13583>.
- [278] Ng LFP, Chow A, Sun Y-J, Kwek DJC, Lim P-L, Dimatatac F, et al. IL-1 $\beta$ , IL-6, and RANTES as biomarkers of Chikungunya severity. *PloS One* 2009;4:e4261. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004261>.
- [279] Silva MR, Van Der Ende-Metselaar H, Mulder HL, Smit JM, Rodenhuis-Zybert IA. Mechanism and role of MCP-1 upregulation upon chikungunya virus infection in human peripheral blood mononuclear cells. *Sci Rep* 2016;6. <https://doi.org/10.1038/srep32288>.
- [280] Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 2009;9:798–809. <https://doi.org/10.1038/nrc2734>.
- [281] Xu J, Nash RJ, Frey TK. Cellular responses to Sindbis virus infection of neural progenitors derived from human embryonic stem cells. *BMC Res Notes* 2014;7:757. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-757>.
- [282] Yeh H-T, Tsai Y-S, Chen M-S, Li Y-Z, Lin W-C, Lee Y-R, et al. Flavopereirine induces cell cycle arrest and apoptosis via the AKT/p38 MAPK/ERK1/2 signaling pathway in human breast cancer cells. *Eur J Pharmacol* 2019;863:172658. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172658>.
- [283] Pfeffer LM. The Role of Nuclear Factor  $\kappa$ B in the Interferon Response. *J Interferon Cytokine Res* 2011;31:553–9. <https://doi.org/10.1089/jir.2011.0028>.

- [284] Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2017;2:1–9. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>.
- [285] Morrison DK. MAP Kinase Pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011254>.
- [286] Gros Lambert M, Py BF. Spotlight on the NLRP3 inflammasome pathway. *J Inflamm Res* 2018;11:359–74. <https://doi.org/10.2147/JIR.S141220>.
- [287] Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol* 2009;7:99–109. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2070>.
- [288] Chen W, Foo S-S, Zaid A, Teng T-S, Herrero LJ, Wolf S, et al. Specific inhibition of NLRP3 in chikungunya disease reveals a role for inflammasomes in alphavirus-induced inflammation. *Nat Microbiol* 2017;2:1435–45. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0015-4>.
- [289] De Castro-Jorge LA, de Carvalho RVH, Klein TM, Hiroki CH, Lopes AH, Guimarães RM, et al. The NLRP3 inflammasome is involved with the pathogenesis of Mayaro virus. *PLoS Pathog* 2019;15:e1007934. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007934>.
- [290] Fitzpatrick FA, Stringfellow DA. Virus and interferon effects on cellular prostaglandin biosynthesis. *J Immunol* 1980;125:431–7. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.125.1.431>.
- [291] Bedoui Y, Septembre-Malaterre A, Giry C, Jaffar-Bandjee M-C, Selambarom J, Guiraud P, et al. Robust COX-2-mediated prostaglandin response may drive arthralgia and bone destruction in patients with chronic inflammation post-chikungunya. *PLoS Negl Trop Dis* 2021;15:e0009115. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009115>.
- [292] Sandenon Seteyen A-L, Guiraud P, Gasque P, Girard-Valenciennes E, Sélambarom J. In Vitro Analyses of the Multifocal Effects of Natural Alkaloids Berberine, Matrine, and Tabersonine against the O'nyong-nyong Arthritogenic Alphavirus Infection and Inflammation. *Pharmaceuticals* 2023;16:1125. <https://doi.org/10.3390/ph16081125>.
- [293] Une végétation riche et singulière. ONF, 2016. [[http://www1.onf.fr/la-reunion/sommaire/patrimoine/patrimoine\\_exceptionnel/@@index.html](http://www1.onf.fr/la-reunion/sommaire/patrimoine/patrimoine_exceptionnel/@@index.html)].
- [294] Index de la flore. CBNM. [<https://mascarine.cbnm.org/index.php/flore/index-de-la-flore/>].
- [295] Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 2000;403:853–8. <https://doi.org/10.1038/35002501>.
- [296] Cadet T. La végétation de l'île de La Réunion : étude phytoécologique et phytosociologique. Thèse de doctoral. Aix-Marseille, La Réunion, 1977.
- [297] La Biodiversité s'explique. Ministère de La Transition Ecologique, 2021.
- [298] Verma S. Medicinal plants with anti-inflammatory activity. *J Phytopharm* 2016;5:3.
- [299] Fiche d'inventaire du patrimoine culturel immatériel - Les savoir-faire et la pratique des simples à la Réunion. Ministère de La Culture, 2018.
- [300] Giraud-Techer S, Amédée J, Girard-Valenciennes E, Thomas H, Brillant S, Grondin I, et al. Plantes médicinales de La Réunion inscrites à la Pharmacopée française (1<sup>ère</sup> partie). 2016. ISBN: 979-10-298-0092-4.
- [301] Gerometta E, Mahadeo K, Clerc P, Thomas H, Marodon C, Girard-Valenciennes E, et al. Plantes médicinales de La Réunion inscrites à la Pharmacopée française (2<sup>ème</sup> partie). 2020.
- [302] Lavergne R. Le grand livre des Tisaneurs et Plantes médicinales indigènes. Orphie. 2001. ISBN : 2-87763-005-6.
- [303] Girard-Valenciennes. Aspects historiques et sociaux de la médecine traditionnelle à La Réunion. *Bull Amades* 2006.
- [304] Le développement de la filière des plantes aromatiques et médicinales : enjeux et défis. ODR, 2006.

- [305] La Réunion : Aplamedom, les Zerbarz qui soignent 2015.
- [306] Pharmacopée - Liste des plantes médicinales utilisées traditionnellement. ANSM. [https://ansm.sante.fr/pharmacopee/liste-des-plantes-medicinales-utilisees-traditionnellement].
- [307] Smadja J, Vera R, Conan JY. Preliminary tests on some flavonoids plants from the Reunion Island. *Plantes Med Phytother Fr* 1989.
- [308] Smadja J, Vera RR. Essais préliminaires sur quelques plantes de La Réunion. 1991;25:212–41.
- [309] Vera RR, Smadja J, Conan. Essais préliminaires sur quelques plantes à alcaloïdes de l'île de La Réunion 1990:50–65.
- [310] Lavergne R. Plantes médicinales indigènes : tisanderie et tisaneurs de la Réunion. Thèse de doctorat. Montpellier II, 1989.
- [311] Lund AK, Adersen A, Nyman U. Biological activities of benzoquinones from *Badula barthesia* and *Embelia angustifolia*. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm* 1998;5:199–203. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(98\)80028-7](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(98)80028-7).
- [312] Lund A-K, Lemmich J, Adersen A, Olsen CE. Benzoquinones from *Embelia angustifolia*. *Phytochemistry* 1997;44:679–81. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00606-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00606-1).
- [313] Valenciennes E, Smadja J, Conan JY. Screening for biological activity and chemical composition of *Euodia borbonica* var. *borbonica* (Rutaceae), a medicinal plant in Reunion Island. *J Ethnopharmacol* 1999;64:283–8. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(98\)00137-8](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(98)00137-8).
- [314] Adersen A, Smitt UW, Simonsen HT, Christensen SB, Jaroszewski JW. Prenylated acetophenones from *Melicope obscura* and *Melicope obtusifolia* ssp. *obtusifolia* var. *arborea* and their distribution in Rutaceae. *Biochem Syst Ecol* 2007;35:447–53. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2006.04.014>.
- [315] Jakobsen TH, Marcussen HV, Adersen A, Strasberg D, Smitt UW, Jaroszewski JW. 3-Methoxyflavones and a novel coumarin from *Psiadia dentata*. *Biochem Syst Ecol* 2001;29:963–5. [https://doi.org/10.1016/s0305-1978\(01\)00040-0](https://doi.org/10.1016/s0305-1978(01)00040-0).
- [316] Simonsen HT. Four novel geminally dialkylated, non-aromatic acetophenone derivatives from *Melicope coodeana*. *Phytochem Lett* 2012;5:371–5. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2012.03.005>.
- [317] Simonsen HT, Adersen A, Smitt U, Strasberg D, Jaroszewski J. Methoxyflavones from *Melicope borbonica* and *M. obscura* (Rutaceae). *Biochem Syst Ecol* 2003;31:327–30. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(02\)00158-8](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(02)00158-8).
- [318] Simonsen HT, Larsen MD, Nielsen MW, Adersen A, Olsen CE, Strasberg D, et al. Methyleneedioxy- and methoxyflavones from *Melicope coodeana* syn. *Euodia simplex*. *Phytochemistry* 2002;60:817–20. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(02\)00083-3](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00083-3).
- [319] Valenciennes E. Étude d'hétérocycles azotés : contribution à l'étude de la réaction d'Imino-Diels-Adler asymétrique : synthèse de décahydroquinoléin-4-ones ; Étude de plantes médicinales endémiques et indigènes de l'île de la Réunion : recherche d'alcaloïdes. Thèse de doctorat. Paris 11, 1997.
- [320] Adersen A, Adersen H. Plants from Réunion Island with alleged antihypertensive and diuretic effects-an experimental and ethnobotanical evaluation. *J Ethnopharmacol* 1997;58:189–206. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(97\)00100-1](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(97)00100-1).
- [321] Fortin H, Vigor C, Lohézic-Le Dévéhat F, Robin V, Le Bossé B, Boustie J, et al. In vitro antiviral activity of thirty-six plants from La Réunion Island. *Fitoterapia* 2002;73:346–50. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00080-1](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00080-1).

- [322] Jonville MC, Kodja H, Humeau L, Fournel J, De Mol P, Cao M, et al. Screening of medicinal plants from Reunion Island for antimalarial and cytotoxic activity. *J Ethnopharmacol* 2008;120:382–6. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.09.005>.
- [323] Jonville MC, Kodja H, Strasberg D, Pichette A, Ollivier E, Frédérick M, et al. Antiplasmodial, anti-inflammatory and cytotoxic activities of various plant extracts from the Mascarene Archipelago. *J Ethnopharmacol* 2011;136:525–31. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.06.013>.
- [324] Poullain C. Contribution à l'étude des plantes endémiques et indigènes de la Réunion, recherche d'activités biologiques et de principes actifs dans 75 plantes. Thèse de doctorat. La Réunion, 2004.
- [325] Corlay N, Delang L, Girard-Valenciennes E, Neyts J, Clerc P, Smadja J, et al. Tigliane diterpenes from *Croton mauritianus* as inhibitors of chikungunya virus replication. *Fitoterapia* 2014;97:87–91. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.05.015>.
- [326] Marodon C. Contribution à l'étude de *Eupatorium ayapana* Ventenat de La Réunion. Thèse de doctorat. Montpellier I, 2011.
- [327] Techer S. Criblage d'activités biologiques de plantes endémiques ou indigènes de La Réunion - Recherche de molécules antivirales ciblant le virus du chikungunya. Thèse de doctorat. La Réunion, 2013.
- [328] Techer S, Girard-Valenciennes E, Retailleau P, Neyts J, Guéritte F, Leyssen P, et al. Tonantzitlolones from *Stillingia lineata* ssp. *lineata* as potential inhibitors of chikungunya virus. *Phytochem Lett* 2015;12:313–9. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.04.023>.
- [329] Olivon F, Palenzuela H, Girard-Valenciennes E, Neyts J, Pannecouque C, Roussi F, et al. Antiviral Activity of Flexibilane and Tigliane Diterpenoids from *Stillingia lineata*. *J Nat Prod Wash DC* 2015;78:1119–28. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00116>.
- [330] Ledoux A, Maraetefau H, Jansen O, Etienne D, Quetin-Leclercq J, Clerc P, et al. Phytochemical Profile and Biological Activity Evaluation of *Zanthoxylum heterophyllum* Leaves against Malaria. *Planta Medica Lett* 2015;2:e10–1. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1545821>.
- [331] Ledoux A, Cao M, Jansen O, Mamede L, Campos P-E, Payet B, et al. Antiplasmodial, anti-chikungunya virus and antioxidant activities of 64 endemic plants from the Mascarene Islands. *Int J Antimicrob Agents* 2018;52:622–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.07.017>.
- [332] Dorla E, Grondin I, Hue T, Clerc P, Dumas S, Gauvin-Bialecki A, et al. Traditional uses, antimicrobial and acaricidal activities of 20 plants selected among Reunion Island's flora. *South Afr J Bot* 2019;122:447–56. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.04.014>.
- [333] Chawech R, Pesnel S, Haddada MB, Gauvin-Bialecki A, Morel A-L. Polyphenol Characterization of the Aqueous Extract from *Hubertia ambavilla* L. (Asteraceae) by HPLC-DAD-ESI-MSn and Assessment of Its Antioxidant Activity. *Chem Biodivers* 2022;19:e202200217. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200217>.
- [334] Ralambondrainy M. Caractérisation chimique et biologique de trois huiles essentielles répulsives issues de la biodiversité régionale contre l'alphavirus du Ross River. Thèse de doctorat. La Réunion, 2017.
- [335] Clain E. Valorisation des éco-extraits de plantes médicinales réunionnaises dans la lutte contre les maladies virales émergentes de l'océan Indien. Thèse de doctorat. La Réunion, 2018.
- [336] Clain E, Haddad JG, Koishi AC, Sinigaglia L, Rachidi W, Desprès P, et al. The Polyphenol-Rich Extract from *Psiloxylon mauritianum*, an Endemic Medicinal Plant from Reunion Island, Inhibits the Early Stages of Dengue and Zika Virus Infection. *Int J Mol Sci* 2019;20:1860-. <https://doi.org/10.3390/ijms20081860>.

- [337] Clain E, Sinigaglia L, Koishi AC, Gorgette O, Gadea G, Viranaicken W, et al. Extract from *Aphloia theiformis*, an edible indigenous plant from Reunion Island, impairs Zika virus attachment to the host cell surface. *Sci Rep* 2018;8:10856–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29183-2>.
- [338] Haddad JG, Koishi AC, Gaudry A, Nunes Duarte Dos Santos C, Viranaicken W, Desprès P, et al. *Doratoxylon apetalum*, an Indigenous Medicinal Plant from Mascarene Islands, Is a Potent Inhibitor of Zika and Dengue Virus Infection in Human Cells. *Int J Mol Sci* 2019;20:2382. <https://doi.org/10.3390/ijms20102382>.
- [339] Grauzdytė D, Pukalskas A, Viranaicken W, El Kalamouni C, Venskutonis PR. Protective effects of *Phyllanthus phillyreifolius* extracts against hydrogen peroxide induced oxidative stress in HEK293 cells. *PloS One* 2018;13:e0207672–e0207672. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207672>.
- [340] Grauzdytė D, Pukalskas A, El Kalamouni C, Venskutonis PR. Antioxidant potential and phytochemical composition of extracts obtained from *Phyllanthus phillyreifolius* by different extraction methods. *Nat Prod Res* 2020;34:706–9. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1493586>.
- [341] Grauzdytė D, Pukalskas A, El Kalamouni C, Venskutonis PR. Mangiferin Rich Products from *Aphloia theiformis* (Vahl) Benn Leaves: Extraction, Fractionation, Phytochemical Characterization, and Antioxidant Properties. *Molecules* 2020;25:2081. <https://doi.org/10.3390/molecules25092081>.
- [342] Taïlé J, Arcambal A, Clerc P, Gauvin-Bialecki A, Gonthier M-P. Medicinal Plant Polyphenols Attenuate Oxidative Stress and Improve Inflammatory and Vasoactive Markers in Cerebral Endothelial Cells during Hyperglycemic Condition. *Antioxidants* 2020;9:573-. <https://doi.org/10.3390/antiox9070573>.
- [343] Checkouri É. Étude de la bioactivité de plantes médicinales de La Réunion dans le contexte de perturbations métaboliques. Thèse de doctorat. La Réunion, 2021.
- [344] Checkouri E, Ramin-Mangata S, Diotel N, Viranaicken W, Marodon C, Reignier F, et al. Protective Effects of Medicinal Plant Decoctions on Macrophages in the Context of Atherosclerosis. *Nutrients* 2021;13:280-. <https://doi.org/10.3390/nu13010280>.
- [345] Checkouri E, Reignier F, Robert-Da Silva C, Meilhac O. Evaluation of Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Aqueous Extracts from Eight Medicinal Plants from Reunion Island: Protection against Oxidative Stress in Red Blood Cells and Preadipocytes. *Antioxidants* 2020;9:959-. <https://doi.org/10.3390/antiox9100959>.
- [346] Marimoutou M, Le Sage F, Smadja J, Lefebvre d'Helencourt C, Gonthier M-P, Robert-Da Silva C. Antioxidant polyphenol-rich extracts from the medicinal plants *Antirhea borbonica*, *Doratoxylon apetalum* and *Gouania mauritiana* protect 3T3-L1 preadipocytes against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TNF $\alpha$  and LPS inflammatory mediators by regulating the expression of superoxide dismutase and NF- $\kappa$ B genes. *J Inflamm Lond Engl* 2015;12:10–10. <https://doi.org/10.1186/s12950-015-0055-6>.
- [347] Marimoutou M. Étude de l'impact des extraits de trois plantes médicinales riches en polyphénols antioxydants sur la réponse métabolique et inflammatoire des cellules adipeuses dans le contexte de la pathologie de l'obésité. Thèse de doctorat. La Réunion, 2014.
- [348] Veeren B. Potentiel néphroprotecteur des molécules issues de la biodiversité végétale réunionnaise : focus sur *Antirhea borbonica*. Thèse de doctorat. La Réunion, 2021.
- [349] Veeren B, Bringart M, Turpin C, Rondeau P, Planesse C, Ait-Arsa I, et al. Caffeic Acid, One of the Major Phenolic Acids of the Medicinal Plant *Antirhea borbonica*, Reduces Renal Tubulointerstitial Fibrosis. *Biomedicines* 2021;9:358-. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9040358>.

- [350] Bonneville J, Rondeau P, Veeren B, Faccini J, Gonthier M-P, Meilhac O, et al. Antioxidant and Cytoprotective Properties of Polyphenol-Rich Extracts from *Antirhea borbonica* and *Doratoxylon apetalum* against Atherogenic Lipids in Human Endothelial Cells. *Antioxidants* 2021;11:34-. <https://doi.org/10.3390/antiox11010034>.
- [351] Le Sage F, Meilhac O, Gonthier M-P. Anti-inflammatory and antioxidant effects of polyphenols extracted from *Antirhea borbonica* medicinal plant on adipocytes exposed to *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* lipopolysaccharides. *Pharmacol Res* 2017;119:303–12. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.02.020>.
- [352] Tailé J, Bringart M, Planesse C, Patché J, Rondeau P, Veeren B, et al. Antioxidant Polyphenols of *Antirhea borbonica* Medicinal Plant and Caffeic Acid Reduce Cerebrovascular, Inflammatory and Metabolic Disorders Aggravated by High-Fat Diet-Induced Obesity in a Mouse Model of Stroke. *Antioxidants* 2022;11:858-. <https://doi.org/10.3390/antiox11050858>.
- [353] Ghaddar B. Impact du surpoids et de l'hyperglycémie sur la barrière hémato-encéphalique et la plasticité cérébrale : Effets protecteurs de *P. mauritianum* et d'*A. borbonica*, deux plantes médicinales réunionnaises. Thèse de doctorat. La Réunion, 2022.
- [354] Neag MA, Mocan A, Echeverría J, Pop RM, Bocsan CI, Crişan G, et al. Berberine: Botanical Occurrence, Traditional Uses, Extraction Methods, and Relevance in Cardiovascular, Metabolic, Hepatic, and Renal Disorders. *Front Pharmacol* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00557>.
- [355] Brahmachari G, Gorai D, Roy R. Argemone mexicana: chemical and pharmacological aspects. *Rev Bras Farmacogn-Braz J Pharmacogn* 2013;23:559–75. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000021>.
- [356] Xool-Tamayo JF, Graniel-Sabido M, Mirón-López G, Mena-Rejón GJ, Monforte-González M, Flota FV. HPLC-DAD Determination Of Berberine, Chelerythrine and Sanguinarine In The Mexican Prickly Poppy (*Argemone mexicana* L. Papaveraceae), a Medicinal Plant. *Quím Nova* 2017;40:1238–43. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170111>.
- [357] Aly SH, Elissawy AM, Eldahshan OA, Elshanawany MA, Efferth T, Singab ANB. The pharmacology of the genus *Sophora* (Fabaceae): An updated review. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm* 2019;64:153070. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.153070>.
- [358] Novick C. Contribution à l'étude chimique d'espèces végétales de La Réunion, rapport de projet de fin d'études pour l'obtention du diplôme d'ingénieur chimiste de l'ENSCM (stage M2, Chembiopro, Université de La Réunion) 2022.
- [359] Faugeras G, Paris R, Peltier M. Alcaloïdes et polyphénols des Légumineuses - Sur les alcaloïdes du *Sophora denudata* Bory endémique de La Réunion. 1973;31:561–8.
- [360] Arambewela LSR, Ranatunge T. Indole alkaloids from *Tabernaemontana divaricata*. *Phytochemistry* 1991;30:1740–1. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)84254-P](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)84254-P).
- [361] Bao M-F, Yan J-M, Cheng G-G, Li X-Y, Liu Y-P, Li Y, et al. Cytotoxic Indole Alkaloids from *Tabernaemontana divaricata*. *J Nat Prod* 2013;76:1406–12. <https://doi.org/10.1021/np400130y>.
- [362] Deng Y, Bao M-F, Shi B-B, Wu J, Cai X-H. Three New Indole Alkaloids from *Tabernaemontana divaricata*. *Nat Prod Bioprospecting* 2018;8:183–8. <https://doi.org/10.1007/s13659-018-0166-x>.
- [363] Index de la flore [[https://mascarine.cbnm.org/index.php/flore/index-de-la-flore/nom?code\\_nom=604](https://mascarine.cbnm.org/index.php/flore/index-de-la-flore/nom?code_nom=604)].
- [364] Wikimedia Commons [[https://commons.wikimedia.org/wiki/Main\\_Pag](https://commons.wikimedia.org/wiki/Main_Pag)].

- [365] Pathak R, Goel A, Tripathi SC. Medicinal Property and Ethnopharmacological Activities of *Argemone mexicana*: An Overview. *Ann Romanian Soc Cell Biol* 2021;1615–41.
- [366] Sarkar KK, Mitra T, Acharyya RN, Sadhu SK. Phytochemical screening and evaluation of the pharmacological activities of ethanolic extract of *Argemone mexicana* Linn. aerial parts. *Orient Pharm Exp Med* 2019;19:91–106. <https://doi.org/10.1007/s13596-018-0357-3>.
- [367] Lavergne R, Véra R. Etude Ethnobotanique des Plantes Utilisées dans la Pharmacopée Traditionnelle à la Réunion. 1989.
- [368] Jaiswal J, Siddiqi NJ, Fatima S, Abudawood M, AlDaihan SK, Alharbi MG, et al. Analysis of Biochemical and Antimicrobial Properties of Bioactive Molecules of *Argemone mexicana*. *Molecules* 2023;28:4428. <https://doi.org/10.3390/molecules28114428>.
- [369] Sharma S, Sharma M, Kohli D. Pharmacological Screening Effect Of Ethanolic And Methanolic Extract Of Fruits Of Medicinally Leaves. *Dig J Nanomater Biostructures* 2010;5:229–32.
- [370] Mengie Ayele T, Chekol Abebe E, Tilahun Muche Z, Mekonnen Agidew M, Shumet Yimer Y, Tesfaw Addis G, et al. Evaluation of In Vivo Wound-Healing and Anti-Inflammatory Activities of Solvent Fractions of Fruits of *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae). *Evid Based Complement Alternat Med* 2022;2022:e6154560. <https://doi.org/10.1155/2022/6154560>.
- [371] Chang Y-C, Hsieh P-W, Chang F-R, Wu R-R, Liaw C-C, Lee K-H, et al. Two New Protopines Argemexicaines A and B and the Anti-HIV Alkaloid 6-Acetyldihydrochelerythrine from Formosan *Argemone mexicana*. *Planta Med* 2003;69:148–52. <https://doi.org/10.1055/s-2003-37710>.
- [372] Perumal P, Sekar V, Rajesh V, Gandhimathi S, Sampathkumar R, Nazimudin KS. In vitro antioxidant activity of *Argemone mexicana* roots. *Int J PharmTech Res* 2010;2:1477–82.
- [373] Duhan JS, Bhardwaj M, Surekha S. Free radical-scavenging and antimutagenic potential of acetone, chloroform and methanol extracts of fruits of *Argemone mexicana*. *Afr J Biotechnol* 2011;10:8654–61. <https://doi.org/10.4314/ajb.v10i43>.
- [374] Saranya M, Iyappan P. In vitro antibacterial activity and preliminary phytochemical analysis of leaf extracts of *Argemone mexicana* Linn - A medicinal plant. *Int J Curr Pharm Res* 2012;4.
- [375] Rahman M, Alam Md, Sharmin S, Rahman M, Rahman A, Alam M. In Vitro Antibacterial Activity of *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae). *Chiang May Univ J Nat Sci* 2009;8.
- [376] Singh SK, Pandey VD, Singh A, Singh C. Antibacterial activity of seed extracts of *Argemone mexicana* L. on some pathogenic bacterial strains. *Afr J Biotechnol* 2009;8. <https://doi.org/10.4314/ajb.v8i24.68798>.
- [377] Jain R, Dubey D, Verma R, Jain R. Evaluation of antibacterial and antioxidant activity of fruits extract of *Argemone mexicana* Linn. *Int J of Pharm Inn IJPI* 2012.
- [378] Pandey A, Karanwal V. A study of extract optimization and effect of metal ions on antibacterial properties of *Argemone mexicana*. *Asian J of Plant Sci and Res* 2011.
- [379] Rosas-Piñón Y, Mejía A, Díaz-Ruiz G, Aguilar MI, Sánchez-Nieto S, Rivero-Cruz JF. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. *J Ethnopharmacol* 2012;141:860–5. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.03.020>.
- [380] Sahu MC, Debata NK, Padhy RN. Antibacterial activity of *Argemone mexicana* L. against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from clinical samples.

- Asian Pac J Trop Biomed 2012;2:S800–7. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60316-5](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60316-5).
- [381] Alagesaboopathi C, Kalaiselvi N. Antimicrobial activities of the root, stem and leaf extracts of *Argemone mexicana* L. *Int Netw Nat Sci Res J* 2012.
- [382] Osho A, Adetunji T. Antimicrobial activity of the essential oil of *Argemone mexicana* Linn. *J Med Plants Res* 2010;4:19–22.
- [383] Bhattacharjee I, Chatterjee SK, Chandra G. Isolation and identification of antibacterial components in seed extracts of *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae). *Asian Pac J Trop Med* 2010;3:547–51. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(10\)60132-0](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(10)60132-0).
- [384] Uddin SJ, Grice ID, Tiralongo E. Cytotoxic Effects of Bangladeshi Medicinal Plant Extracts. *Evid-Based Complement Altern Med ECAM* 2011;2011:578092. <https://doi.org/10.1093/ecam/nep111>.
- [385] Chang Y-C, Chang F-R, Khalil AT, Hsieh P-W, Wu Y-C. Cytotoxic benzophenanthridine and benzyloquinoline alkaloids from *Argemone mexicana*. *Z Naturforschung C J Biosci* 2003;58:521–6. <https://doi.org/10.1515/znc-2003-7-813>.
- [386] Gacche R, Shaikh DrR, Pund M. In-vitro evaluation of anticancer and antimicrobial activity of selected medicinal plants from Ayurveda. *Asain J Tradit Med* 2011;6.
- [387] Gali K, Ramakrishnan G, Ramalingam K, Jaykar B. In-vitro anti-cancer activity of Methanolic extract of leaves of *Argemone Mexicana* Linn. *Int J PharmTech Res* 2011;3:1329–33.
- [388] Nayak P, Madhab D, Maharana L, Nagar K. Antidiabetic activity of aerial parts of *Argemone mexicana* Linn. in alloxan induced hyperglycaemic rat. *Pharmacologyonline*, 2011;1: 889-903.
- [389] Rout S, Kar D, Mandal P. Hypoglycaemic activity of aerial parts of *Argemone mexicana* L. in experimental rat models. *Int J Pharm Pharm Sci* 2011;3:533.
- [390] Sourabié TS, Noufou O, Richard S, Youbare N, Nikiema J, Guissou I, et al. Evaluation of the anti-icterus effect of crude powdered leaf of *Argemone mexicana* Linn. (Papaveraceae) against CCL4-induced liver injury in rats. *Int J Pharma Sci Res* 2012;3:491–6.
- [391] Bhat SH, Shrivastava R, Malla MY, Iqbal M, Anjum T, Mir AH, et al. Hepatoprotective activity of *Argemone mexicana* Linn against toxic effects of carbon tetrachloride in rats. *Int J Pharm Pharm Sci* 2014.
- [392] Arcos-Martínez AI, Muñoz-Muñiz OD, Domínguez-Ortiz MÁ, Saavedra-Vélez MV, Vázquez-Hernández M, Alcántara-López MG. Anxiolytic-like effect of ethanolic extract of *Argemone mexicana* and its alkaloids in Wistar rats. *Avicenna J Phytomedicine* 2016;6:476–88.
- [393] Fabaceae - *Sophora denudata* - Bory. Cirad [<http://publish.plantnet-project.org/project/planttreerun/collection/collection1/synthese/details/SOBDE>].
- [394] *Sophora* L. | Plants of the World Online | Kew Science. *Plants World Online*. [<http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30012214-2>].
- [395] La Liste rouge de la flore vasculaire de La Réunion. UICN France, 2010.
- [396] He X, Fang J, Huang L, Wang J, Huang X. *Sophora flavescens* Ait.: Traditional usage, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine. *J Ethnopharmacol* 2015;172:10–29. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.06.010>.
- [397] Poullain C, Girard-Valenciennes E, Smadja J. Plants from reunion island: evaluation of their free radical scavenging and antioxidant activities. *J Ethnopharmacol* 2004;95:19–26. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.05.023>.
- [398] Tse W-P, Che C-T, Liu K, Lin Z-X. Evaluation of the anti-proliferative properties of selected psoriasis-treating Chinese medicines on cultured HaCaT cells. *J Ethnopharmacol* 2006;108:133–41. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.023>.

- [399] Ding P-L, Liao Z-X, Huang H, Zhou P, Chen D-F. (+)-12alpha-Hydroxysophocarpine, a new quinolizidine alkaloid and related anti-HBV alkaloids from *Sophora flavescens*. *Bioorg Med Chem Lett* 2006;16:1231–5. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.11.073>.
- [400] Ma S-C, Du J, But PP-H, Deng X-L, Zhang Y-W, Ooi VE-C, et al. Antiviral Chinese medicinal herbs against respiratory syncytial virus. *J Ethnopharmacol* 2002;79:205–11. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00389-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00389-0).
- [401] Ma X, Yu H, Deng Y, Luo Y, Tian W, An F, et al. Antitumor Effects of Ethanolic Extracts from *Sophora moorcroftiana* Seeds in Mice. *Iran Red Crescent Med J* 2009;11.
- [402] Ma X, Luo Y, Yu H, Cui Y. Ethanolic extracts of *Sophora moorcroftiana* seeds induce apoptosis of human stomach cancer cell line SGC-7901 in vitro. *Afr J Biotechnol* 2006;5. <https://doi.org/10.4314/ajb.v5i18.55820>.
- [403] Pan Q-M, Li Y-H, Hua J, Huang F-P, Wang H-S, Liang D. Antiviral Matrine-Type Alkaloids from the Rhizomes of *Sophora tonkinensis*. *J Nat Prod* 2015;78:1683–8. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00325>.
- [404] Sato M, Tsuchiya H, Takase I, Kureshiro H, Tanigaki S, Iinuma M. Antibacterial activity of flavanone isolated from *Sophora exigua* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its combination with antibiotics. *Phytother Res* 1995;9:509–12. <https://doi.org/10.1002/ptr.2650090709>.
- [405] Yamaki M, Kashihara M, Takagi S. Activity of Ku Shen compounds against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*. *Phytother Res* 1990;4:235–6. <https://doi.org/10.1002/ptr.2650040607>.
- [406] Sohn HY, Son KH, Kwon CS, Kwon GS, Kang SS. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm* 2004;11:666–72. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.09.005>.
- [407] Apocynaceae - *Tabernaemontana mauritiana* - Lam. Cirad. [<http://publish.plantnet-project.org/project/planttreerun/collection/collection1/synthese/details/TAEMA>].
- [408] Index de la flore. CBNM. [[https://mascarine.cbnm.org/index.php/flore/index-de-la-flore/nom?code\\_taxref=706850](https://mascarine.cbnm.org/index.php/flore/index-de-la-flore/nom?code_taxref=706850)].
- [409] Van Beek TA, Verpoorte R, Svendsen AB, Leeuwenberg AJM, Bisset NG. *Tabernaemontana* L. (Apocynaceae): A review of its taxonomy, phytochemistry, ethnobotany and pharmacology. *J Ethnopharmacol* 1984;10:1–156. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(84\)90046-1](https://doi.org/10.1016/0378-8741(84)90046-1).
- [410] Daruty C.; 1886. Medicinal plants of Mauritius and tropical areas. General steam printing company
- [411] De Cordemoy EJ. Flore de l'île de la Réunion. Paris: 1891.
- [412] Nicola C, Salvador M, Escalona Gower A, Moura S, Echeverrigaray S. Chemical Constituents Antioxidant and Anticholinesterasic Activity of *Tabernaemontana catharinensis*. *Sci World J* 2013;2013:e519858. <https://doi.org/10.1155/2013/519858>.
- [413] Ingkaninan K, Changwijit K, Suwanborirux K. Vobasinyl-iboga bisindole alkaloids, potent acetylcholinesterase inhibitors from *Tabernaemontana divaricata* root. *J Pharm Pharmacol* 2006;58:847–52. <https://doi.org/10.1211/jpp.58.6.0015>.
- [414] Naidoo CM, Naidoo Y, Dewir YH, Singh M, Daniels AN, El-Ramady H. In Vitro Investigation of the Antioxidant and Cytotoxic Potential of *Tabernaemontana ventricosa* Hochst. ex A. DC. Leaf, Stem, and Latex Extracts. *Horticulturae* 2022;8:91. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8020091>.
- [415] Taesotikul T, Panthong A, Kanjanapothi D, Verpoorte R, Scheffer JJC. Anti-inflammatory, antipyretic and antinociceptive activities of *Tabernaemontana pandacaqui* Poir. *J Ethnopharmacol* 2003;84:31–5. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00264-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00264-7).

- [416] Taesotikul T, Panthong A, Kanjanapothi D, Verpoorte R, Scheffer JJC. Hippocratic screening of ethanolic extracts from two *Tabernaemontana* species. *J Ethnopharmacol* 1989;27:99–106. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(89\)90082-2](https://doi.org/10.1016/0378-8741(89)90082-2).
- [417] Pallant CA, Cromarty AD, Steenkamp V. Effect of an alkaloidal fraction of *Tabernaemontana elegans* (Stapf.) on selected micro-organisms. *J Ethnopharmacol* 2012;140:398–404. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.01.036>.
- [418] Foo J, Bellot G, Pervaiz S, Alonso S. Mitochondria-mediated oxidative stress during viral infection. *Trends Microbiol* 2022;30:679–92. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.12.011>.
- [419] Fox Ramos AE, Le Pogam P, Fox Alcover C, Otogo N’Nang E, Cauchie G, Hazni H, et al. Collected mass spectrometry data on monoterpene indole alkaloids from natural product chemistry research. *Sci Data* 2019;6:15–6. <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0028-3>.
- [420] Akhgari A, Laakso I, Seppänen-Laakso T, Yrjönen T, Vuorela H, Oksman-Caldentey K-M, et al. Determination of terpenoid indole alkaloids in hairy roots of *Rhazya stricta* (Apocynaceae) by GC-MS. *Phytochem Anal* 2015;26:331–8. <https://doi.org/10.1002/pca.2567>.
- [421] Zanolari B, Ndjoko K, Ioset J-R, Marston A, Hostettmann K. Qualitative and quantitative determination of yohimbine in authentic yohimbe bark and in commercial aphrodisiacs by HPLC-UV-API/ MS methods. *Phytochem Anal PCA* 2003;14:193–201. <https://doi.org/10.1002/pca.699>.
- [422] Urquiaga I, Leighton F. Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biol Res* 2000;33:55–64. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602000000200004>.
- [423] Yahfoufi N, Alsadi N, Jambi M, Matar C. The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. *Nutrients* 2018;10:1618. <https://doi.org/10.3390/nu10111618>.

# Annexes

Les résultats de la recherche bibliographique (Chapitre 2) sont présentés en Annexe 1 et les références citées sont listées dans la partie « Références ». Les résultats détaillés de l'analyse UHPLC-MS de *Tabernaemontana mauritiana* en Annexe 2.

<b>Annexes.....</b>	<b>161</b>
<b>Annexe 1. Activités biologiques des alcaloïdes.....</b>	<b>162</b>
<b>Tableau 1.</b> Activités biologiques des alcaloïdes de type isoquinoléine.....	162
<b>Tableau 2.</b> Activités biologiques des alcaloïdes de type indole.....	178
<b>Tableau 3.</b> Activités biologiques des alcaloïdes de type quinolizine et quinolizidine. ....	184
<b>Tableau 4.</b> Activités biologiques des alcaloïdes de type terpénique.....	189
<b>Tableau 5.</b> Activités biologiques des activités de type quinoléine.....	191
<b>Tableau 6.</b> Alcaloïdes de type benzophénanthridine.....	193
<b>Tableau 7.</b> Activités biologiques des alcaloïdes de type pyridine. ....	194
<b>Tableau 8.</b> Activités biologiques des alcaloïdes de type pipéridine.....	196
<b>Tableau 9.</b> Activités biologiques des alcaloïdes de type indolizidine.....	197
<b>Tableau 10.</b> Activités biologiques d'autres classes d'alcaloïdes. ....	198
<b>Annexe 2 : Analyses HPLC-UV-MS de l'extrait AT de l'espèce <i>Tabernaemontana mauritiana</i> .....</b>	<b>202</b>

## Annexe 1. Activités biologiques des alcaloïdes.

**Tableau 1.** Activités biologiques des alcaloïdes de type isoquinoléine.

Structure (source)	Pathologie	Mécanisme d'action	Modèle	Réf.
<b>Phénéthylamine (protoalcaloïde)</b>				
Ephédrine ( <i>Ephedra sp.</i> , Ephedraceae)	Asthme	Effet bronchodilatateur		[1]
<b>Benzyltétrahydroisoquinoléines</b>				
(-)-1( <i>S</i> )-Norcoclaurine ( <i>Nelumbo nucifera</i> , Nelumbonaceae)	Infection par le VIH (VIH, <i>Lentivirus</i> , <i>Retroviridae</i> )		<i>In vitro</i>	[2]
(+)-1( <i>R</i> )-Coclaurine ( <i>Nelumbo nucifera</i> , Nelumbonaceae)	Infection par le VIH (VIH, <i>Lentivirus</i> , <i>Retroviridae</i> )		<i>In vitro</i>	
1-Benzylisoquinoléines 19, 21, 22, 29, et 34	Infection par le EBV (virus Epstein Barr)	Inhibition de la production de protéine virale	Cellule Raji, EBV-EA activé par le 12-O-tetradecanoylphorbol- 13-acétate (TPA)	[3]
Pseudocoptisine ( <i>Corydalis turtschaninovii</i> , Fumariaceae)	Inflammation	Inhibition de la phosphorylation de ERK et p38 Inhibition de l'activation de la voie NF-κB Réduction des niveaux des médiateurs pro-inflammatoires iNOS, COX-2, PGE2, NO et IL-6	<i>In vitro</i> , macrophage stimulé aux LPS	[4]
Benzoylmésaconine, fuziline et néoline	Maladie cardiaque coronarienne	Inhibition de la voie NF-κB	<i>In vitro</i> , cellule HEK 293	[5]
Chélidonine ( <i>Chelidonium majus</i> , Papaveraceae)	Asthme allergique	Suppression de l'expression et de la production des éosinophiles, éotaxin-2, IL-4, IL-3 et IL-17 des voies respiratoires	<i>In vivo</i> , souris (modèle asthme) (5 et 1 mg/kg)	[6]

**Tableau 1 (Suite).** Activités biologiques des alcaloïdes de type isoquinoléine.

Trolline ( <i>Trollius chinensis</i> , Ranunculaceae)	Infection par le IAV (virus de la grippe, <i>Alphainfluenzavirus</i> <i>Orthomyxoviridae</i> )	Régulation de l'expression de TLR3/4/7 et des protéines TRIF, TBK1, TAK1, IKK $\beta$ , IRF3 Régulation de la voie NF- $\kappa$ B Inhibition de la production de NO, IL-6 et TNF- $\alpha$	<i>In vitro</i> , macrophages RAW 264.7 (100 $\mu$ mol/L)	[7]
Dauricumidine ( <i>Hypserpa nitida</i> Miers., Menispermaceae)	Infection par le virus de l'hépatite B ( <i>Orthohepadnavirus</i> , <i>Hepadnaviridae</i> )	Inhibition de la production des protéines virale	<i>In vitro</i> , cellule HepG2 transfectée (G2.2.15) IC <sub>50</sub> = 0.450 mM	[8]
Délavatine A ( <i>Iris delavayi</i> , Iridaceae)		Suppression des médiateurs pro- inflammatoires NO, TFN- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ Inhibition de l'expression de iNOS et COX-2 Réduction de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (via l'inhibition de la phosphorylation de p65 et I $\kappa$ B $\alpha$ )	<i>In vitro</i> , cellules microgliales BV-2	[9]
Fumigaclavine C (Champignon, <i>Apergillus</i> <i>fumigatus</i> ???)	Athéroscléroses	Réduction de la phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$ Inhibition de l'expression de TLR4/NF- $\kappa$ B p65 expression Réduction de la production de TNF- $\alpha$	<i>In vitro</i> , macrophage RAW 264.7	[10]
Michellamines A, B and C	Infection par le VIH-1 et VIH-2 ( <i>Lentivirus</i> , <i>Retroviridae</i> )	Inhibition de la transcriptase inverse virale	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i> , rat (IC <sub>50</sub> = 15-35 mM)	[11]
Galantamine ( <i>Galanthus nivalis</i> , Amaryllidaceae)	Inflammation	Réduction du taux de TNF- $\alpha$ circulant	<i>In vivo</i> , rat	[12]

**Tableau 1 (Suite).** Activités biologiques des alcaloïdes de type isoquinoléine.

Protoberbérines				
Berbérine ( <i>Berberis sp.</i> , Berberidaceae et <i>Coptis sp.</i> , Ranunculaceae)	Infection par le CHIKV (virus du Chikungunya, <i>Alphavirus</i> , <i>Togaviridae</i> )	Réduction de l'activation de la voie MAPK induite par le CHIKV Réduction de l'inflammation associée à l'infection	<i>In vitro</i> , cellules BHK (BHK21 & BSRT5/7), cellule d'ostéosarcome humain (cellule HOS), cellule embryonnaire de rein (cellule HEK), cellule Vero, fibroblaste humain (1.25-20 µM) <i>In vivo</i> , souris (10mg/kg)	[13]
	Infection par le HCV (Virus de l'hépatite C, <i>Hepacivirus</i> , <i>Flaviridae</i> )	Inhibition de l'entrée du virus par interférence par la protéine E2	<i>In vitro</i> , cellule Huh 7.5 cells (0-100 µM)	[14]
	Infection par le virus respiratoire syncytial (RSV, <i>Paramyxoviridae</i> )	Réduction de l'activation de la voie MAPK dépendante de p38 Inhibition de la réplication et de l'infection	<i>In vitro</i> , cellule cancéreuse (human adenocarcinoma alveolar basal epithelial cells et human larynx carcinoma cells) (0.1-100 µM)	[15]
	Infection par le cytomegalovirus humain (CMVH)	Inhibition de la réplication virale par interférence avec l'expression du gène E	<i>In vitro</i> , fibroblaste humain (HFF) et fibroblaste embryonnaire pulmonaire (HELFI) (25 and 100 µM)	[16]
	Infection par les virus Chikungunya (CHIKV), Semliki Forest (SFV) et Sindbis (SINV) ( <i>Alphavirus</i> , <i>Togaviridae</i> )	Réduction de la synthèse d'ARN et de protéines par interférence avec la réplication virale	<i>In vitro</i> , cellules BHK (0.1-10 µM)	[17]
	Infection par le VIH-1 (VIH-1, <i>Lentivirus</i> , <i>Retroviridae</i> )	Inhibition de l'activité de la transcriptase inverse	<i>In vitro</i> , lignée cellulaire CEM- GFP (EC <sub>50</sub> = 0.13 mM)	[18]

**Tableau 1 (Suite).** Activités biologiques des alcaloïdes de type isoquinoléine.

	Infection par le IAV (virus de la grippe, <i>Alphainfluenzavirus</i> <i>Orthomyxoviridae</i> )	Inhibition de l'infection via l'inhibition de la maturation des protéines Inhibition de la production de TNF- $\alpha$ et PGE <sub>2</sub>	<i>In vitro</i> , macrophage RAW 264.7, cellules A549 et macrophage murin dérivé de la moelle osseuse (25 $\mu$ M)	[19]
	Infection par les virus de l'Herpès 1 et 2 (HSV-1 et HSV-2,	Interférence avec la réplication virale	<i>In vitro</i> , cellule Vero	[20]
	Infection par le cytomégalovirus humain (CMVH)	Inhibition de la réplication virale	<i>In vitro</i> , cellule MRC-5 (IC <sub>50</sub> = 0.68 $\mu$ M)	[21]
	Cancer	Production de ROS Inhibition de la voie NF- $\kappa$ B et des MMP	<i>In vitro</i> , cellule cancéreuse gastrique (SNU-5), (75 $\mu$ M)	[22]
	Cancer	Interférence avec le cycle cellulaire Induction de l'apoptose	<i>In vitro</i> , cellule cancéreuse épidermique (cellule A431) (5-75 $\mu$ M)	(Sharma, and Katiyar 2006)
	Cancer	Inhibition de la transcription de COX-2	<i>In vitro</i> , cellule cancéreuse du côlon (> 0.3 $\mu$ M)	[24]
	Cancer		<i>In vitro</i> , cellule cancéreuse du sein (cellules MDA-MB231 et MCF-7) (3.125-100 $\mu$ M)	[25]
	Cancer	Interférence avec les voies PI3K/AKT et MAPK Induction de l'apoptose Interférence avec le cycle cellulaire (arrêt au stade G0/G1 Inhibition de la migration cellulaire	<i>In vitro</i> , cellules thyroïdiennes cancéreuse ou non cancéreuse (10-160 $\mu$ M)	[26]

**Tableau 1 (Suite).** Activités biologiques des alcaloïdes de type isoquinoléine.

	Cancer	Induction de l'expression de p21 Arrêt du cycle cellulaire au stade G2/M Inhibition de l'activation de la voie NF-κB Inhibition de la prolifération des cellules et induction de l'apoptose	<i>In vitro</i> , cellule cancéreuse du côlon (200 μM)	[27]
	Inflammation	Inhibition de l'attachement du facteur de transcription AP-1 Régulation du niveau d'expression de COX-2 et PGE <sub>2</sub>	<i>In vitro</i> , cellule cancéreuse humaine (1, 10, 100 μM) <i>In vivo</i> , rat (i.p., 1, 5 or 10 mg/kg)	[28]
	Inflammation / polyarthrite rhumatoïde	Augmentation de miR-23a Inhibition de la phosphorylation de ASK1/p38 médiée par TLR4/TRA2 Réduction de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL-6 et IL-23)	<i>In vitro</i> , macrophage RAW 264.7 et macrophage modèle d'arthrite synoviale (AA-SM) (25-75 μM)	[29]
	Polyarthrite rhumatoïde	Contrôle du développement de la maladie Réduction de l'expression de TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-17, VEGF ( <i>vascular endothelial growth factor</i> ) (VEGF) et CD34 Inhibition de l'activation de p-ERK, p-p38 et p-JNK	<i>In vivo</i> , rats modèle d'arthrite (dose orale, 200 mg/kg)	[30]
	Polyarthrite rhumatoïde	Interférence avec IκBα et la translocation nucléaire de p65 Inhibition des voies NF-κB et Akt Inhibition de l'ostéoclastogenèse et résorption osseuse via RANKL (NF-κB ligand)	<i>Ex vivo</i> , cellule primaire ostéoblastique murine <i>In vitro</i> , cellule HEK	[31]

**Tableau 1 (Suite).** Activités biologiques des alcaloïdes de type isoquinoléine.

	Polyarthrite rhumatoïde	Réduction du niveau d'expression d'IL-6 et IL-17 Augmentation de l'expression d'IL-10 et TGF- $\beta$ Contrôle des symptômes de la PR (réduction de l'hyperplasie synoviale, de l'inflammation, de l'infiltration des cellules inflammatoires)	<i>In vivo</i> , rat modèle d'arthrite (75 et 150 mg/kg)	[32]
	Goutte / Arthrite	<i>In vitro</i> Suppression des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ et TNF- $\alpha$ ) et des ROS intracellulaires Augmentation de Nrf2 et de ses enzymes antioxydantes (HO-1, SOD1, GPx, NQO1 and CAT) Diminution de / IL-1 $\beta$ , caspase 1, NLRP3, TXNIP et Keap1 <i>In vivo</i> Réduction de l'œdème amélioration du score arthritique, de l'activité de l'élastase articulaire et réduction de la production des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ et TNF- $\alpha$ )	<i>In vitro</i> , macrophage RAW 264.7 (25, 50 et 75 $\mu$ M) <i>In vivo</i> , rat (50 mg/kg)	[33]
	Dysfonction endothéliale	Inhibition de l'expression de LOX1 Induction du stress oxydatif induit par les LDL oxydées et TNF- $\alpha$ Induction de l'activation de NOX2, MAPK/Erk1/2 et NF- $\kappa$ B Inhibition de l'expression de VCAM / ICAM	<i>In vitro</i> , cellule HUVEC (5 $\mu$ M)	[34]

**Tableau 1 (Suite).** Activités biologiques des alcaloïdes de type isoquinoléine.

	Colite hémorragique	Réduction de la production de cytokines Protection de l'intégrité et du fonctionnement de la barrière épithéliale intestinale Amélioration de la balance pro/anti-oxydant Réduction de la réponse des T <sub>HELPER</sub> et augmentation de la réponse des T <sub>REG</sub>	<i>In vitro</i>	[35]
	Colite hémorragique	Régulation de l'inflammation intestinale neurogénique	<i>In vitro</i> , cellule gliale intestinale, cellule dendritique dérivée de la moelle osseuse, cellule T, cellule épithéliale intestinale	[36]
	Diabète	Interférence avec l'expression des cytokines pro- et anti-inflammatoires et/ou des cytokines induites par les cellules Th1/Th2	<i>In vivo</i> , souris diabétique non-obèse (50, 150 or 500 mg/kg)	[37]
	Cancer	Induction de l'expression de p21 Arrêt du cycle cellulaire à la phase G2/M Inhibition de l'activation de la voie NF-κB Inhibition de la prolifération cellulaire et induction de l'apoptose	<i>In vitro</i> , cellule cancéreuse du côlon (200 μM)	[27]
	Cancer	Interférence avec la structure cellulaire Attachement à l'ADN Modifications épigénétiques	<i>In vitro</i> , cellule HeLa infectée par le papilloma virus humain (150-300 μM)	[38]

**Tableau 1 (Suite).** Activités biologiques des alcaloïdes de type isoquinoléine.

	Polyarthrite rhumatoïde	Réduction de la quantité du complexe IL-21R Réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23) Inhibition de PI3K Augmentation de PTEN Augmentation de mTOR, IL-23, NF- $\kappa$ B p65 Inhibition de la phosphorylation de Akt et NF- $\kappa$ B p65	<i>Ex vivo</i> , fibroblastes de rats (modèle AIA) <i>In vitro</i> , macrophage dérivé de la moelle osseuse (15 – 45 $\mu$ M)	[39]
	Arthrose	Régulation de la réponse immunitaire et de la dégradation cartilagineuse via l'inhibition de la voie TLR4/NF- $\kappa$ B et libération des complexes MD2/SP-D	<i>In vivo</i> , rat modèle arthrose (200 $\mu$ M)	[40]
	Inflammation chronique	Réduction du niveau sérique de protéine C réactive	<i>In vivo</i> , humain	[41]
	Inflammation des poumons / maladies pulmonaires	Inhibition de la phosphorylation et de la dégradation de I $\kappa$ B- $\alpha$ Suppression de la production de cytokines inflammatoires	<i>In vitro</i> , cellule A549, fibroblaste (HFL1) et cellule de lymphome (U-937)	[42]
	Cancer	Effets anti-prolifératifs	<i>In vitro</i> , cellule A549	[43]
	Insulino-résistance	Inhibition de l'activation des macrophage M1 dans le tissu adipeux Améliore l'insulino-résistance	<i>In vivo</i> , souris (modèle obésité) (dose orale, 50 mg/kg/jour pendant 24 jours)	[44]

**Tableau 1 (Suite).** Activités biologiques des alcaloïdes de type isoquinoléine.

	Polyarthrite rhumatoïde	Amélioration de l'état de la synovie Suppression de l'activation de p-ERK, p-38 et p-JNK Réduction du niveau des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-17) et VEGF Inhibition des voies NF- $\kappa$ B et Akt Inhibition de la formation et la survie des ostéoclastes Augmentation des niveaux d'IL-10 et TGF- $\beta$	<i>In vivo</i> , rat (modèle d'arthrite)	[45]
Palmatine ( <i>Fibraurea recisa</i> Pierre, Menispermaceae ; <i>Phellodendron amurense</i> , Rutaceae ; <i>Enantia chlorantha</i> Anacardiaceae ; <i>Corydalis yanhusuo</i> , Fumariaceae ; <i>Coptis chinensis</i> , Ranunculaceae)	<i>Flavivirus, Flaviviridae</i> ZIKV	Inhibition de l'attachement, de l'entrée et de la réplication du virus Diminution de la stabilité du virus	<i>In vitro</i> , cellule Vero (20-80 $\mu$ M)	[46]
	<i>Flavivirus, Flaviviridae</i> , YFV	Inhibition de l'infection	<i>In vitro</i> , cellules Vero, A549 et BHK (10-80 $\mu$ M)	[46]
Iodure de columbamine, chlorure de jatrorrhizine, chlorure de berbérine et chlorure de coptisine	Infection par le VIH-1 ( <i>Lentivirus, Retroviridae</i> )	Inhibition de la transcriptase inverse	<i>In vitro</i>	[47]

**Tableau 1 (Suite).** Activités biologiques des alcaloïdes de type isoquinoléine.

Coptisine ( <i>Coptidis Rhizoma</i> )		Inhibition de la voie Rho/ROCK Inhibition de l'apoptose des cellules cardiaques Réduction des niveaux d'IL-1 $\beta$ , IL- 6 et TNF- $\alpha$ et de l'inflammation Effet cardioprotecteur	<i>In vivo</i> , rat modèle d'ischémie (3, 10, 30 mg/kg)	[48]
Protoberbérines (composés 41, 47-49, 51, 52 et 55)	<i>Lymphocryptovirus</i> , <i>Orthoherpesviridae</i> , EBV	Inhibition de l'infection	<i>In vitro</i> , cellule Raji	[3]
<b>Aporphines</b>				
Norisoboldine ((+)- Laurelliptine) ( <i>Lindera aggregata</i> )	Polyarthrite rhumatoïde	Augmentation de caspase-3, caspase-9, PARP-clivé, Bcl-2, Bax et p53 Augmentation de l'apoptose via la voie intrinsèque	<i>Ex vivo</i> , fibroblastes de rat modèle d'arthrite	[49]
Boldine (1, 10-diméthoxy-2, 9-dihydroxyaporphine)	Cholestérol et cirrhose	Activité Activité anti-fibrotique	<i>In vivo</i> , rat modèle de cirrhose et hypercholestérolémie (5, 10 and 20 mg/kg/jour)	[50]
Oxoglaucine	Inflammation	Effets immunomodulateurs	<i>In vitro</i> , <i>In vivo</i> , souris (1 et 2 mg/kg)	[51]
Nuciférine ( <i>Nelumbo nucifera</i> , Nelumbonaceae)	Goutte / hyperuricémie	Diminution du niveau d'acide urique sérique Amélioration des fonctions rénales Inhibition de la production d'IL-1 $\beta$	<i>In vitro</i> , cellule épithéliale tubulaire rénale proximale humaine <i>In vivo</i> , souris modèle de hyperuricémie	[52]

**Tableau 1 (Suite).** Activités biologiques des alcaloïdes de type isoquinoléine.

<p>(+)-Corytubérine  Déméthylsonodione  7-  Formyldéhydrohernangérine  7-  Formyldéhydronornanténine  (+)-<i>N</i>-Formylnornanténine  Hernandonine  Hernanympine  (+)-Hernovine  7-Hydroxy-6-méthoxy-1-  méthylisoquinoléine  (+)-<i>N</i>-Hydroxyhernangérine  (+)-Laurotetanine  (+)-Magnoflorine  <i>N</i>-Méthylcorydaldine  (+)-<i>N</i>-Méthylhernangérine  <i>N</i>-Méthyllovigérine  (+)-Ovigérine  7-Formyldéhydroovigérine  (+)-<i>N</i>-  Formyldéhydroovigérine  (+)-<i>N</i>-Formylovigérine  <i>N</i>-Hydroxyovigérine  7-Oxohémagine  Thalifoline  (<i>Hernandia</i>  <i>moerenhoutiana</i>, <i>Hernandia</i>  <i>nymphaeifolia</i> and <i>Hernandia</i>  <i>voyronii</i>, Hernandiaceae)</p>	<p>Cancer</p>		<p><i>In vitro</i></p>	<p>[53]</p>
---	---------------	--	------------------------	-------------

**Tableau 1 (Suite).** Activités biologiques des alcaloïdes de type isoquinoléine.

<b>Morphinanes</b>				
Sinoméline (Cocculine)	Polyarthrite rhumatoïde	Inhibition de la voie ERK/Egr-1 Inhibition de $\alpha 7nAChR$ Inhibition des mécanismes liés à la polyarthrite rhumatoïde	<i>Ex-vivo</i> , fibroblast-like synoviocyte (FLS) of AIA rat	[54]
	Cancer	Inhibition de l'angiogenèse	<i>In vitro</i> , HUVEC (150 $\mu$ M-1 mM) <i>In vivo</i> , souris (150 $\mu$ M)	[55]
	Polyarthrite rhumatoïde	Effet anti-prolifératif Amélioration des symptômes arthritiques	<i>In vivo</i> , rat modèle d'arthrite (traitement de longue durée en i.p.) et rat modèle d'arthrite (traitement de courte durée en i.p.) <i>Ex vivo</i> , fibroblastes de rat modèle d'arthrite (IC <sub>50</sub> = 20.6 $\mu$ g/mL)	[56]
	Polyarthrite rhumatoïde	Réduction de l'hypersensibilité	<i>In vivo</i> , souris modèle d'arthrite (40 et 80 mg/kg)	[57]
	Fibrose rénale	Activation de la signalisation via Nrf2 Effet anti-oxydant (via enzymes) et anti-fibrotique via TGF- $\beta$ /Smad et Wnt- $\beta$ -catenin Réduction du développement de la fibrose	<i>In vitro</i> , cellule HEK (100 $\mu$ g/mL) et macrophages RAW 264.4 <i>In vivo</i> , souris modèle de fibrose (100 mg/mL)	[58]
		Diminution de l'expression de TLR4 et TRAF6	<i>In vivo</i> , souris C57BL/6	[59]
	Encéphalomyélite autoimmune	Réduction de l'expression de l'interféron- $\gamma$ (via son facteur de transcription T-bet $\rightarrow$ Inhibition de iNOS	<i>In vivo</i> , rat modèle d'encéphalomyélite (i.p., 50, 100 ou 200 mg/kg)	[60]

**Tableau 1 (Suite).** Activités biologiques des alcaloïdes de type isoquinoléine.

	Cancer	Suppression de l'expression d'IL-6, PIGF, Daxx, HSP27, ... Inhibition de la prolifération cellulaire	<i>In vitro</i> , cellule cancéreuse de la synovie Hs701.T	[61]
		Effets analgésiques	<i>In vivo</i> , rat et souris	[62]
	Inflammation	Amélioration du statut inflammatoire	<i>In vivo</i> , souris (1, 5, ou 10 mg/kg)	[63]
<b>Bisbenzyltétrahydroisoquinoléines</b>				
Aromoline ( <i>Stephania cepharantha</i> , Menispermaceae)	Infection par le VIH (VIH, <i>Lentivirus</i> , <i>Retroviridae</i> )			
Wariftéine ( <i>Cissampelos sympodialis</i> , Menispermaceae)	Asthme, allergie chronique, rhinite	Réduction de l'activité des éosinophiles et leucotriènes [64] Réduction de l'hyperactivité des poumons [65]	<i>In vivo</i> , souris (dose orale, 50 µg/animal) [64] <i>In vivo</i> , souris (inhalation, 2 mg/mL) [65]	[452,507, 508]
Néférine	Inflammation (lésions rénales)	Inhibition de l'activation de la voie NF-κB activation (via IκBα) Augmentation de l'expression de la protéine Klotho Inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoire et de l'infiltration des cellules inflammatoires Améliore l'activité du foie	<i>In vitro</i> , cellule NRK-52E (2, 4 ou 8 µM) <i>In vivo</i> , souris (20 mg/kg/jour)	[67]
	Cancer (ostéosarcome)	Augmentation de la phosphorylation de p21 (Ser130) via p38 Arrêt du cycle cellulaire et de la croissance cellulaire	<i>In vitro</i> , cellule d'ostéosarcome humain (1-20 µM)	[68]

**Tableau 1 (Suite).** Activités biologiques des alcaloïdes de type isoquinoléine.

	Cancer du foie	Induction de la phase G1/S Réduction de l'expression de c-Myc et cyclines D1, D3 CDK4, E2F-1 Déphosphorylation de cdc2 Induction du stress de reticulum endoplasmique Induction de l'apoptose	<i>In vitro</i> , Hep3B	[69]
	Hypoxie	Réduction de la sécrétion de TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-8 Amélioration de l'équilibre rédox intracellulaire	<i>In vitro</i> , cellule monoculée du sang périphérique humain	[70]
Tétrandrine	Arthrite chronique	Inhibition de la production de TNF- $\alpha$ et IL-1	<i>In vivo</i> , rat modèle d'arthrite (dose orale ou injection sous-cutanée 30mg/kg/jour – 80 mg/kg/jour)	[71]
		Amélioration de la survie cellulaire, de la balance rédox	<i>Ex vivo</i> , astrocyte de rat modèle d'hypoxie / ischémie (pré-traitement, 0.1, 1, 10 et 20 $\mu$ M)	[72]
	Glomérulonéphrite	Inhibition de ERK et NF- $\kappa$ B Réduction de l'activité de iNOS Inhibition de la production de médiateurs pro-inflammatoires (NO, MMP-9)	<i>In vitro</i> , cellule primaire mésangiale de rat (PRMC) (10 $\mu$ g/mL)	[73]
	Cancer (côlon)	Induction de l'apoptose via l'activation de p38 MAPK et ERK1/2	<i>Ex vivo</i> , cellule de cancer du côlon de souris (CT-26)	[74]
	Cancer	Induction de l'apoptose	<i>In vitro</i> , cellule Jurkat (5-15 $\mu$ M)	[75]
	Inflammation	Réduction du niveau d'IL-6	<i>In vitro</i> , (6mM et 4 mM)	[12]

**Tableau 1 (Suite).** Activités biologiques des alcaloïdes de type isoquinoléine.

Cépharanthine ( <i>Stephania cepharantha</i> Hayata, Menispermaceae)	Encéphalopathie induite par le VIH ( <i>Lentivirus</i> , <i>Retroviridae</i> )	Suppression des cytokines et chimiokines inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-8) Arrêt de la mort cellulaire	<i>In vitro</i> , monocyte (0.1 $\mu$ g/mL) Neuroblastoma (0.04 et 0.2 $\mu$ g/mL)	[76]
	Inflammation	Inhibition des voies NF- $\kappa$ B et MAPK Inhibition de la production de TNF- $\alpha$ et IL-6	<i>In vitro</i> , macrophage (RAW 264.7) (2.5-10 $\mu$ g/mL) <i>In vivo</i> , souris traitée au LPS (i.p., 5mg/kg)	[77]
	Syndrome de Sjögren et maladies rhumatiques	Inhibition de la voie NF- $\kappa$ B Perturbation de la formation de la MMP-9 induite par TNF- $\alpha$	<i>In vitro</i> , cellule des glandes salivaires (10 $\mu$ g/mL)	[78]
	Cancer	Augmentation de la production de ROS Activation de JNK 1/2 Induction de l'apoptose via la voie intrinsèque	<i>In vitro</i> , cellule HuH-7 (20 $\mu$ M)	[79]
	Cancer	Induction de l'apoptose Activation de la voie MAPK via p38 (cellule Jurkat et K562) Activation de MAPK via ERK (cellule K562)	<i>In vitro</i> , lignée cellulaire de lymphome (cellule Jurkat et K562)	[80]
	Cancer	Induction de l'apoptose	<i>In vitro</i> , cellule Jurkat (5-15 $\mu$ M)	[75]
	Athéroscléroses	Inhibition de iNOS et COX-2 Inhibition de la production de NO et PGE <sub>2</sub> production Réduction de l'inflammation, de la péroxydation des lipides et de la migration/prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires	<i>In vitro</i> , macrophage RAW 264.7	[81]

**Tableau 1 (Suite).** Activités biologiques des alcaloïdes de type isoquinoléine.

	Maladies auto-immunes et allergie	Inhibition de l'absorption des antigènes par les cellules dendritiques Inhibition de la maturation des cellules dendritiques Diminution des niveaux de IL-6 et TNF- $\alpha$	<i>In vitro</i> , cellule dendritique (1 et 5 $\mu$ g/mL)	[82]
	Maladies aiguës et chroniques (leucopénie, morsure de serpent, xérostomie, alopecie)	Modulation de l'activité des pompes membranaires Rigidification de la membrane cellulaire Interférence avec les voies de signalisation AMPK et NF- $\kappa$ B		[83]
	Infection par le virus de l'hépatite B ( <i>Orthohepadnavirus</i> , <i>Hepadnaviridae</i> )	Inhibition de la réplication virale peut-être via la protéine Hsc70	<i>In vitro</i> , cellule HepG2 (0.01-100 $\mu$ M)	[84]
Fangchinoline ( <i>Stephania tetrandra</i> , Menispermaceae)	Inflammation	Réduction du niveau d'IL-6	<i>In vitro</i> , (6mM et 4 mM)	[12]
	Inflammation	Amélioration du statut inflammatoire	<i>In vivo</i> , souris (1, 5, ou 10 mg/kg)	[63]
<b>Phénéthyltétrahydroisoquinoléines</b>				
Céphalotaxine ( <i>Cephalotaxus drupacea</i> , Taxaceae)	Infection par le ZIKV (Virus Zika, <i>Flavivirus</i> , <i>Flaviviridae</i> ,	Inhibition de la réplication virale Virucide	<i>In vitro</i> , cellules Vero et A549 (20-80 $\mu$ M)	[85]
	Infection par les DENV 1-4 (Virus de la Dengue 1-4, <i>Flavivirus</i> , <i>Flaviviridae</i> ,	Inhibition de la réplication virale	<i>In vitro</i> , cellule Vero (20-80 $\mu$ M)	
Harringtonine ( <i>Cephalotaxus harringtonia</i> , Taxaceae)	<i>Alphavirus</i> , <i>Togaviridae</i> , CHIKV et SINV	Inhibition de la réplication et de la synthèse protéique virales	<i>In vitro</i> , cellule BHK21 et myoblaste du muscle squelettique humain (0.01-10 $\mu$ M)	[86]

**Tableau 1** (*Suite et fin*). Activités biologiques des alcaloïdes de type isoquinoléine.

<b>Alcaloïde de type tropolone dérivé de phénéthyltétrahydroisoquinoléine (proto-alcaloïde)</b>				
Colchicine	Cancer		<i>In vivo</i> , souris	[87]
	Maladies inflammatoires dégénératives et immunologiques	Perturbation de l'activité des cellules inflammatoires	<i>In vivo</i> , humain (dose orale, 0.5 mg/personne)	[88]
	Goutte, maladies rhumatismales et cardiaques			[89]

**Tableau 2.** Activités biologiques des alcaloïdes de type indole.

<b>Structure (source)</b>	<b>Pathologie</b>	<b>Mécanisme d'action</b>	<b>Modèle</b>	<b>Réf.</b>
1-Méthoxycanthin-6-one ( <i>Ailanthus altissima</i> Swingle, Simaroubaceae)	Cancer	Induction de l'apoptose	<i>In vitro</i> , cellules cancéreuses HeLa, HuH7, NPA et ARO	[90]
Indole-3-carboxaldéhyde ( <i>Perilla frutescens</i> (L.) Britt., Lamiaceae)	Inflammation	Inhibition de la production de NO et cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ / IL-6)	<i>In vitro</i> , macrophage (RAW 264.7)	[91]
Dérivé de Méridianin C (Ascidie, tunicate <i>Aplidium meridianum</i> , Polyclinidae)	Obésité et maladies métaboliques associées	Diminution de l'expression et/ou de la phosphorylation de C/EBP- $\alpha$ , PPAR- $\gamma$ , FAS, STAT3 et STAT5 Inhibition de l'adipogenèse	<i>In vitro</i> , cellule préadipocytaire 3T3-L1 (1, 5 et 10 $\mu$ M)	[92]
Gramine ( <i>Hordeum vulgare</i> , Poaceae)	Cancer	Inhibition de différentes voies de signalisation : EGFR/PI3K/AKT/mTOR/IKK/NF- $\kappa$ B et JAK/STAT3	<i>In vivo</i> , modèle hamster de carcinogenèse (80 mg/kg)	[93]
	Inflammation			

**Tableau 2 (Suite).** Activités biologiques des alcaloïdes de type indole.

Hippéastrine (Amaryllidaceae)	Infection par le virus de l'herpès 1 (HSV-1) <i>Simplexvirus</i> , <i>Orthoherpesviridae</i>		<i>In vitro</i> , cellule Vero	[94]
Néoechinuline A (champignon <i>Microsporium</i> <i>sp.</i> , Arthrodermataceae)	Alzheimer	Diminution de l'expression de iNOS, COX-2 Inhibition de la production de ROS, NO and médiateurs inflammatoires neurotoxiques (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et PGE <sub>2</sub> ) Interférence probable avec les voies NF- $\kappa$ B and MAPK	<i>In vitro</i> , cellule microgliale active « <i>A<math>\beta</math>42-activated BV-2 cells</i> » (25, 50 et 100 $\mu$ M)	[95]
Tabersonine ( <i>Catharanthus roseus</i> , Apocynaceae)	Lésion pulmonaire aiguë	Inhibition de l'infiltration des neutrophiles Inhibition de l'activité de MPO Inhibition de la production de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ Inhibition des voies MAPK et NF- $\kappa$ B Inhibition de l'activité de iNOS et de la production de NO	<i>In vivo</i> , modèle souris de lésion pulmonaire aiguë (10, 20 et 40 $\mu$ M)	[96]
Camptothécine ( <i>Camptotheca acuminata</i> , Nyssaceae)	Infection par le IAV (virus de la grippe, <i>Alphainfluenzavirus</i> <i>Orthomyxoviridae</i> )	Inhibition de la synthèse de haemagglutinine et neuraminidase Réduction de l'infection	<i>In vitro</i> , cellule BHK 21/13 (50 $\mu$ M)	[97]
	Infection par le VIH ( <i>Lentivirus</i> , <i>Retroviridae</i> )	Réduction de l'infection	<i>In vitro</i> , cellule H9 (0.01-0.02 $\mu$ M) <i>In vivo</i> , souris (1 mg/kg)	[98,99]
	Infection par le JC polyomavirus ( <i>Betapolyomavirus</i> , <i>Polyomaviridae</i> )	Réduction de la réplication virale	<i>In vitro</i> , cellule IMR-32 (0.1-10 $\mu$ M)	[100]

**Tableau 2 (Suite).** Activités biologiques des alcaloïdes de type indole.

	Cancer	Inhibition de la topoisomérase 1		[101–103]
Mitraphylline ( <i>Uncaria tomentosa</i> ) (Rubiaceae)	Inflammation	Inhibition de la production d'IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-17 et TNF- $\alpha$	<i>In vivo</i> , souris (dose orale, 30 mg/kg/jour) <i>In vitro</i> , cellule K65 et macrophage murin (1-100 $\mu$ M)	[104]
<b>Bisindole</b>				
Voacamine ( <i>Voacanga africana</i> , Apocynaceae)	Alzheimer	Effets neuroprotecteurs		[105]
<b>Indolo-monoterpéniques</b>				
Vinblastine ( <i>Catharanthus roseus</i> , Apocynaceae)	Cancer		<i>In vitro</i>	[87]
Vincristine ( <i>Catharanthus roseus</i> , Apocynaceae)	Cancer		<i>In vitro</i>	[103]
Ellipticine	Inflammation	Inhibition de IKK $\beta$ Inhibition of NF- $\kappa$ B Inhibition des mécanismes pro- inflammatoires via l'inhibition de COX-2, PGE <sub>2</sub> , iNOS, NO et IL-6 Augmentation de l'autophagie via l'inhibition de p62	<i>In vitro</i> , macrophage dérivé de la moelle osseuse <i>In vivo</i> , souris	[106]
Ellipticine	Cancer	Augmentation de la production de ROS Activation de ERK et JNK Activation de la voie MAPK Induction de l'apoptose	<i>In vitro</i> , cellules cancéreuses de l'endomètre RL95-2 (1–10 $\mu$ M)	[107]

**Tableau 2 (Suite).** Activités biologiques des alcaloïdes de type indole.

Vinpocétine (dérivé synthétique de la vincamine) (Periwinkle plant, <i>Vinca minor</i> , Apocynaceae)	Ostéoporose	<i>In vitro</i> : Diminution de la résorption osseuse et du statut inflammatoire <i>In vivo</i> : Diminution de la perte osseuse après ovariectomie Réduction de l'inflammation Amélioration des symptômes	<i>In vitro</i> , macrophage dérivé de la moelle osseuse <i>In vivo</i> , souris (0 – 20 µM)	[108]
Brucine ( <i>Strychnos nux-vomica</i> L., Loganiaceae)	Cancer	Réduction de l'angiogenèse	<i>In vivo</i> , souris	[109]
Brucine et Brucine-N-oxide ( <i>Strychnos nux-vomica</i> L., Loganiaceae)	Inflammation	Réduction de la perméabilité vasculaire Inhibition de la production de PGE <sub>2</sub>	<i>In vivo</i> , rat	[66,110]
17-Nor-excelsinidine, Singaporentinidine ( <i>Alstonia scholaris</i> , Apocynaceae)	Infection par le virus de l'herpès (HSV) <i>Simplexvirus</i> , Orthoherpesviridae Infection par l'adénovirus (ADV)		<i>In vitro</i>	[111]

**Tableau 2 (Suite).** Activités biologiques des alcaloïdes de type indole.

<b><math>\beta</math>-Carbolines</b>				
<p>Monoacétylarénarine B 3-Hydroxyméthyl-<math>\beta</math>-carboline Glusodichotomine AK Arénarines A, B, D Cordysinine C 7-Méthoxy-1-oxo-1,2,3,4-tétrahydro-<math>\beta</math>-carboline 3-hydroxy-<math>\beta</math>-carboline <math>\beta</math>-Carboline (acide carboxylique) 1,2,3,4-Tétrahydro-1,3,4-trioxo-<math>\beta</math>-carboline Cordysinine E (<i>Arenaria kansuensis</i> Caryophyllaceae)</p>	Fibrose pulmonaire	Inhibition de la voie NF- $\kappa$ B via p65	<p><i>In vivo</i>, souris modèle de fibrose (50, 100 or 150 mg/kg/jour, pendant 15 jours) <i>In vitro</i>, macrophage RAW 264.7 et cellules A549</p>	[112]
<p>Harmine (<i>Peganum harmala</i>, Nitrariaceae ; <i>Symplocos setchuensis</i>)</p>	Entérovirus 71 (EV71)	<p>Réduction de la production de ROS Réduction de l'activation de la voie NF-<math>\kappa</math>B Inhibition de la réplication virale</p>	<p><i>In vitro</i>, Vero et cellules de rhabdomyosarcome (EC<sub>50</sub>= 20 <math>\mu</math>M, CC<sub>50</sub>= 500 <math>\mu</math>M) <i>In vivo</i>, souris (i.p., 12.5 <math>\mu</math>g/mL, i.p injection)</p>	[113]
	Infection par le virus de l'herpès 2 (HSV-2) <i>Simplexvirus</i> , Orthoherpesviridae	<p>Inhibition de la production de ROS Réduction de l'activation de NF-<math>\kappa</math>B (via I<math>\kappa</math>B-<math>\alpha</math> et p65) Réduction de l'expression des molécules inflammatoires Inhibition de la phosphorylation de p38 et JNK</p>	<p><i>In vitro</i>, EC<sub>50</sub> = 1.47 <math>\mu</math>M and CC<sub>50</sub> = 337.10 <math>\mu</math>M</p>	
	Infection par le VIH-1 ( <i>Lentivirus</i> , <i>Retroviridae</i> )	Inhibition de la réplication virale	<i>In vitro</i>	[2]

**Tableau 2 (Suite et fin).** Activités biologiques des alcaloïdes de type indole.

Harmaline ( <i>Ophiorrhiza nicobarica</i> , Rubiaceae)	Infection par le virus de l'herpès 1 (HSV-1) <i>Simplexvirus</i> , Orthoherpesviridae	Interférence avec la réplication virale	<i>In vitro</i> , cellule Vero (5µg/mL) <i>In vivo</i> , souris (0.1-0.5 mg/kg)	[114]
Flavopérérine ( <i>Geissospermum sericeum</i> et <i>G. laeve</i> , Apocynaceae)	Cancer	Induction de l'apoptose via l'arrêt du cycle cellulaire (phase G0/G1) et de la voie de signalisation MAPK	<i>In vitro</i> , cellule cancéreuse de sein (15 µM)	[115]
4,8-Diméthoxy-1-vinyl-β- carboline 4-Méthoxy-1-vinyl-β- carboline ( <i>Melia azedarach</i> Meliaceae)	Inflammation	Réduction de l'expression de iNOS et COX-2 Inhibition de l'activation de NF-κB Réduction de la production de PGE2 and NO	<i>In vitro</i> , macrophage RAW 264.7 (2 à 10 µM)	[116]
Evodiamine	Inflammation	Amélioration des symptômes (poids, température, dysfonction des organes, ...)	<i>In vivo</i> , souris (1, 5 ou 10 mg/kg)	[63]
	Fibrose hépatique	Amélioration des fonctions hépatiques Diminution du niveau de médiateurs pro-inflammatoires et fibrotiques	<i>In vivo</i> , rat modèle de fibrose <i>In vitro</i> , cellule hépatique étoilée	[117]
<b>Carbazoles</b>				
Murrayanine (genre <i>Murraya</i> , Rutaceae)	Inflammation	Inhibition de la production de NO	<i>In vitro</i> , cellules microgliales (EV-2), (IC <sub>50</sub> = 12.2 ± 0.2 µM)	[118]
Staurosporine (microorganisme : <i>Streptomyces staurosporeus</i> , Streptomycetaceae)	Maladie osseuse	Augmentation de l'activité de JNK1, AP-1, protéase « like caspase-3 » et NF-κB	<i>In vitro</i> , MC3T3E-1 (100 nM)	[119]
	Inflammation	Inhibition de IKKα et IKKβ	<i>In vitro</i> , THP-1 (IC <sub>50</sub> = 0.85 and 1.6 mM)	[120]

**Tableau 3.** Activités biologiques des alcaloïdes de type quinolizine et quinolizidine.

<b>Quinolizidines (octahydro-2H-quinolizines)</b>				
<b>Structure (source)</b>	<b>Pathologie</b>	<b>Mécanisme d'action</b>	<b>Modèle</b>	<b>Réf.</b>
(+)-Oxysophocarpine, (-)-Sophocarpine, (+)-Lehmannine, (-)-13,14-Déhydrosophoridine ( <i>Sophora flavescens</i> , Fabaceae)	Infection par le virus de l'hépatite B ( <i>Orthohepadnavirus</i> , <i>Hepanaviridae</i> )	Réduction de la réplication virale		[121]
Alopérine ( <i>Sophora alopecuroides</i> , Fabaceae)	Athérosclérose	Réduction de la production de ROS Réduction de l'expression de IL-6, MCP-1, VCAM-1 et E-selectin	<i>In vitro</i> , cellule HUVEC (human (50 ou 100 µM)	[122]
	Cancer	Induction de l'apoptose via la voie intrinsèque Diminution de l'expression de MMP- 2 et MMP-9	<i>In vitro</i> , cellule d'ostéosarcome humain (Mg-63 et U2OS)	[123]
	Infection par le VIH-1 ( <i>Lentivirus</i> , <i>Retroviridae</i> )	Inhibition de la fusion cellule-cellule Inhibition de l'entrée du virus	<i>In vitro</i> , cellule MT4 (1,75 µM)	[124]
Matrine ( <i>Sophora sp</i> , Fabaceae)	Maladies cardiovasculaires	Activation de la voie JAK2/STAT3 Augmentation de l'expression de HSP70	<i>In vivo</i> , rat (50 ou 100 mg/kg) <i>Ex vivo</i> , cardiomyocytes de rat (200 ou 400 µM)	[125]
	Ischémie cérébrale	Réduction des dégâts entraînés par l'ischémie	<i>In vivo</i> , souris (i.p., 7,5, 15 et 30 mg/kg, pendant 7 jours)	[126]
	Fibrose cardiaque liée à une cardiopathie diabétique	Inhibition de la voie TGF-β/Smad Amélioration de la fibrose cardiaque	<i>In vivo</i> , rat (300 mg/kg/jour)	[127]
	Encéphalomyélite autoimmune (EAE)	Inhibition du facteur de risque (BACE-1) Augmentation du facteur neuroprotecteur (BDNF)	<i>In vivo</i> , rat (i.p., 200 mg/kg)	[128]

**Tableau 3 (Suite).** Activités biologiques des alcaloïdes de type quinolizine et quinolizidine.

<p style="text-align: center;">Oxymatine <i>(Sophora alopecuroides L, S. flavescens et S. subprostrata, Fabaceae)</i></p>	<p style="text-align: center;">Infection par le virus de l'hépatite B <i>(Orthohepadnavirus, Hepadnaviridae)</i></p>	<p style="text-align: center;">Inhibition de la replication du virus Régulation de l'inflammation via la voie TLR4/NF-<math>\kappa</math>B</p>	<p style="text-align: center;"><i>In vivo</i>, souris</p>	<p style="text-align: center;">[129]</p>
		<p style="text-align: center;">Amélioration des fonctions immunitaires Inhibition de la réplication virale Amélioration de la production d'IFN-<math>\gamma</math></p>	<p style="text-align: center;"><i>In vivo</i>, souris modèle infection au HBV (i.p., 2,2, 6,7, et 20 mg/kg/jour pendant 6 jours)</p>	<p style="text-align: center;">[130]</p>
		<p style="text-align: center;">Amélioration de l'activité du foie</p>	<p style="text-align: center;"><i>In vivo</i>, homme</p>	<p style="text-align: center;">[131]</p>
	<p style="text-align: center;">Infection par le IAV (virus de la grippe, <i>Alphainfluenzavirus Orthomyxoviridae</i>)</p>	<p style="text-align: center;">Inhibition de l'expression de TLR3-4/7, MyD88 et TRA6 Inhibition de l'activation des voies Akt, ERK1/2, p38 MAPK et NF-<math>\kappa</math>B Inhibition de l'expression des cytokines inflammatoires et des MMP-2/-9</p>	<p style="text-align: center;"><i>In vitro</i></p>	<p style="text-align: center;">[132]</p>
	<p style="text-align: center;">Cancer</p>	<p style="text-align: center;">Arrêt du cycle cellulaire Réduction du volume et du poids de la tumeur</p>	<p style="text-align: center;"><i>In vitro</i>, cellules NSCLC, A549, HCC827 et H1975 (30, 60 et 120 <math>\mu</math>mol/L) <i>In vivo</i>, souris (50 mg/kg/jour)</p>	<p style="text-align: center;">[133]</p>
	<p style="text-align: center;">Cancer</p>	<p style="text-align: center;">Inhibition de la phosphorylation de EGFR Inhibition de la prolifération, migration et invasion cellulaire</p>	<p style="text-align: center;"><i>In vitro</i>, cellules gastriques SGC7901 et BGC823 (20-80 <math>\mu</math>mol/L)</p>	<p style="text-align: center;">[32]</p>
	<p style="text-align: center;">Cancer</p>	<p style="text-align: center;">Augmentation des niveaux de Bax et Bcl-2 Induction de l'apoptose</p>	<p style="text-align: center;"><i>In vitro</i>, cellule cancéreuse de sein (MCF-7) (25-100 <math>\mu</math>g/mL)</p>	<p style="text-align: center;">[134]</p>

**Tableau 3 (Suite).** Activités biologiques des alcaloïdes de type quinolizine et quinolizidine.

	Cancer	Induction du stress oxydant et libération du cytochrome c Induction de l'apoptose	<i>In vitro</i> , cellule cancéreuse de mélanome (A375, Sk-Mel-28, MM96L)	[135]
	Cancer	Inhibition de l'invasion et de la migration cellulaire	<i>In vitro</i> , cellule de carcinome hépatique humain	[136]
	Polyarthrite rhumatoïde	Réduction de l'expression de IL-6 et IL-8 Inhibition des voies NF- $\kappa$ B et MAPK Inhibition de la prolifération, migration et invasion des cellules Réduction des niveaux de IL-6 et TNF- $\alpha$ sériques Amélioration des symptômes	<i>In vitro</i> (10–100 $\mu$ M) <i>In vivo</i> , souris modèle d'arthrite (100 mg/kg)	[137]
	Arthrite	Réduction de TNF- $\alpha$ , IL-17A, ROR $\gamma$ t (retinoic acid-related receptor $\gamma$ t) Augmentation de FOXP3 (forkhead bow P3) Régulation de T <sub>reg</sub> /Th17 Amélioration des symptômes	<i>In vivo</i> , rat modèle d'arthrite (25, 50 et 100 mg/kg/jour)	[138]
	Ischémie/Hypoxie	Réduction de l'apoptose et du stress oxydant Amélioration des symptômes	<i>In vivo</i> , rat (120 mg/kg)	[139]
	Ischémie/Hypoxie	Régulation de la balance redox Réduction de l'apoptose Amélioration des symptômes	<i>In vivo</i> , rat (30, 60 et 120 mg/kg)	[140]
	Fibrose hépatique	Inhibition de la production de molécules pro-inflammatoires et pro-fibrotiques Inhibition de l'activation et de prolifération des cellules pro-fibrotique	<i>In vivo</i> , souris modèle de fibrose hépatique	[141]

**Tableau 3 (Suite).** Activités biologiques des alcaloïdes de type quinolizine et quinolizidine.

	Fibrose hépatique	Réduction de la production et du dépôt du collagène dans le foie Augmentation de l'expression de Smad 7 Inhibition de TGF- $\beta$ 1, Smad 3 et CREB	<i>In vivo</i> , rat modèle de fibrose (10 mg/kg)	[142]
	Fibrose hépatique	Inhibition de TGF- $\beta$ 1 Réduction des niveaux d'alanine aminotransférase, aspartate aminotransférase et glutathion	<i>In vivo</i> , rat modèle de fibrose hépatique (22,5, 45 et 90 mg/kg)	[143]
	Fibrose cardiaque	Inhibition de la voie MAPK (via ERK 1/2 et p38) Inhibition de l'activité des cellules pro-fibrotiques	<i>Ex vivo</i> , cellule de rat ( $1,89 \times 10^{-4}$ , $3,78 \times 10^{-4}$ et $7,56 \times 10^{-4}$ mol/L)	[144]
	Lésions rénales aiguës	Inhibition de l'activation de p 38 MAPK Inhibition de la production de TNF- $\alpha$	<i>In vivo</i> , souris (12,5, 25 et 50 mg/kg)	[145]
	Mastite	Inhibition de la NF- $\kappa$ B et MAPK	<i>In vivo</i> , souris (30, 60, 120 mg/kg)	[146]
	Colite ulcéreuse	Inhibition de la voie PI3K/AKT	<i>In vivo</i> , souris	[147]
Oxymatine et matrine	Inflammation	Activité antioxydante Inhibition de la cyclooxygénase	<i>In vitro</i>	[66]
Oxymatine et matrine	Colite ulcéreuse		<i>In vitro</i> , macrophage RAW 264.7	[35]
Sophocarpine ( <i>Sophora alopecuroides</i> , Fabaceae)	Inflammation	Inhibition de la voie NF- $\kappa$ B (via inhibition de la phosphorylation de I $\kappa$ B phosphorylation) p38 MAPK et JNK Réduction de l'expression de iNOS et COX-2 expression Inhibition de la production de NO, TNF- $\alpha$ et IL-6	<i>In vitro</i> , macrophage RAW 264.7 (50 et 100 $\mu$ g/mL)	[148]

**Tableau 3** (*Suite et fin*). Activités biologiques des alcaloïdes de type quinolizine et quinolizidine.

	Lésions pulmonaires	Inhibition de la voie NF-κB via TLR4 et IκBα Inhibition de la production de TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8	<i>In vitro</i> , cellule A549 (10, 20 et 40 µg/mL) <i>In vivo</i> , souris (12.5, 25 et 50 mg/kg)	[149]
	Ischémie	Améliore les fonctions cardiaques et les symptômes Inhibition des voies NF-κB et MAPK (via p38 / JNK) phosphorylation Réduction de la production de molécules pro-inflammatoires (TNF-α, IL-6, IL-10) Réduction de l'infiltration des neutrophiles Réduction de l'activité de la myéloperoxydase	<i>In vivo</i> , rat (15 et 30 mg/kg)	[150]
Sophoridine ( <i>Sophora flavescens</i> Aiton et <i>Sophora subprostrata</i> , Fabaceae)	Infection par le virus de l'hépatite B ( <i>Orthohepadnavirus</i> , <i>Hepadnaviridae</i> )	Réduction de l'infection Régulation des niveaux de p38 MAPK, TRAF6, ERK1, NLRP10 et caspase-1	<i>In vitro</i> , cellule HepG2.2.15 (0,4-1,6 mM)	[151]
	Infection par l'enterovirus 71 (EV71) ( <i>Enterovirus</i> , <i>Picornaviridae</i> )	Inhibition de l'attachement du virus	<i>In vitro</i> , cellule Vero (pré-traitement et co-traitement (> 250 µg/mL))	[152]
<b>Octahydroquinolizine à noyau cyclohexane fusionné (COHQ)</b>				
β-myriofabral C (1), α-myriofabral C (2) ( <i>Myrioneuron faberi</i> , Rubiaceae)	Infection par le HCV (Virus de l'hépatite C, <i>Hepacivirus</i> , <i>Flaviridae</i> )	Inhibition de la réplication virale	<i>In vitro</i> , CC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub> = 74	[153]

**Tableau 4.** Activités biologiques des alcaloïdes de type terpénique.

Structure (source)	Pathologie	Mécanisme d'action	Modèle	Réf.
<b>Monoterpéniques</b>				
Protostémonine ( <i>Stemona sessilifolia</i> , Stemonaceae) (type monoterpénoïde pyrrolidine)	Lésions pulmonaires aigües / maladies respiratoires	Inhibition des voies MAPK et NF-κB Réduction des niveaux des composants pro- inflammatoires (TNF-α, IL-1β, IL-6, iNOS et NO)	<i>In vivo</i> , souris modèle de pneumonie (20 mg/kg)  <i>Ex vivo</i> , macrophage dérivé de la moelle osseuse (3-100 μM)	[154]
Protostémonine ((5Z)-4- Méthoxy-3-méthyl-5- furan-2(5H)-one) ( <i>Stemona sessilifolia</i> , Stemonaceae)	Asthme	Inhibition de l'inflammation intra- pulmonaire Amélioration de l'activité des poumons	<i>In vivo</i> , souris modèle d'asthme (100 μg/souris) <i>In vitro</i> , macrophage dérivé de la moelle osseuse (3-100 μM)	[155]
<b>Diterpéniques</b>				
Composés 1 et 5 <i>Aconitum tanguticum</i> (Maxim.) Stapf. Ranunculaceae	Infection par le IAV (virus de la grippe) <i>Alphainfluenzavirus</i> Orthomyxoviridae)		IC <sub>50</sub> = 2,9 μg/mL IC <sub>50</sub> = 2,4 μg/mL	[156]
Bullatine A (genre <i>Aconitum</i> , Ranunculaceae)	Maladies neurodégénératives et arthrites	Inhibition de l'expression de P2X7 Réduction des réponses pro- inflammatoires et de la mort cellulaire/apoptose	<i>In vitro</i> , lignée cellulaire de cellules microgliales murines (BV-2) (1-50 μM)	[157]

**Tableau 4 (Suite et fin).** Activités biologiques des alcaloïdes de type terpénique.

Benzoylmésaconine Fuziline Néoline	Maladie cardiaque coronarienne	Inhibition de la voie NF-κB	<i>In vitro</i> , cellule HEK 293	[5]
<b>Stéroïdiques</b>				
Jervine ( <i>Veratrum album</i> , Liliaceae)	Inflammation	Suppression de TNF-α, IL-1β, MPO et LPO	<i>In vivo</i> , rat (dose orale, 50, 100, 200 et 400 mg/kg)	[158]
Impérialine, Verticine, Délavine et Péimisine ( <i>Fritillariae cirrhosae</i> bulbus = 6 <i>Fritillaria sp.</i> , Liliaceae)	Inflammation	Inhibition de la voie MAPK (via ERK 1/2, p38 MAPK, JNK/SAPK) Réduction de la production de NO, TNF-α et IL-6	<i>In vitro</i> , macrophage RAW 264.7 (1-40 μM)	[159]
Solasodine ( <i>Solanum trilobatum</i> , Solanaceae)	Inflammation	Inhibition de la cyclooxygénase et de la voie 5- lipoxygénase	<i>In vivo</i> , rat modèle d'arthrite (75mg/kg)	[160]
Vératramines A-H ( <i>Veratrum taliense</i> , Liliaceae)	Inflammation / Douleur	Réduction de la douleur	<i>In vivo</i> , souris modèle d'inflammation / douleur, (i.p., 1 mg/kg)	[161]
<b>Sesquiterpénique</b>				
Huperzine A ( <i>Huperzia serrata</i> , Lycopodiaceae)	Alzheimer / démence	Inhibition de l'acétylcholinestérase Inhibition de la dégradation de l'acétylcholine Effet protecteur	<i>In vitro</i> , cellules HEK293 et PC12 (0,01-10 μM) <i>In vivo</i> , rat (i.p., 0,2 mg/kg pendant 12 jours)	[162]

**Tableau 5.** Activités biologiques des activités de type quinoléine.

Structure (source)	Pathologie	Mécanisme d'action	Modèle	Réf.
Ascididémine et son analogue 2-bromo	Cancer			[163]
<b>Acridone</b>				
Citrusinine-I ( <i>Citrus</i> sp, Rutaceae)	Infection par le virus de l'herpès 1 (HSV-1) <i>Simplexvirus</i> , Orthoherpesviridae Infection par le virus de l'herpès 2 (HSV-2) Infection par le cytomegalovirus humain (CMVH)	Inhibition de la synthèse d'ADN	ED <sub>50</sub> = 0.56 µg/mL ED <sub>50</sub> = 0.74 µg/mL ED <sub>50</sub> = 1.5 µg/mL	[164]
<b>Aminoquinoléines</b>				
Chloroquine	Périodontite	Réduction de l'infiltration des cellules inflammatoires Réduction de la résorption osseuse		[165]
Chloroquine, amodiaquine	Inflammation, maladie immunologique (polyarthrite rhumatoïde, cancer, ...)	Réduction de la différenciation des cellules T Réduction de niveau de produits par les cellules T <sub>H1</sub> Réduction de l'inflammation	<i>In vitro</i> , cellule T CD4+ primaire (10 µM)	[166]
<b>Indoloquinoléine</b>				
Cryptolépine ( <i>Cryptolepis sanguinolenta</i> , Apocynaceae)	Neuroinflammation	Inhibition de la production de TNF-α, IL-6 et PGE2 Inhibition p38 MAPK Inhibition de COX-2 et de la production de mPGES-1	<i>In vitro</i> , cellule de neuroblastoma (SK-N-SH) (co-traitement, 2.5–20 µM; pré-traitement, 10 et 20 µM)	[167]

**Tableau 5 (Suite et fin).** Activités biologiques des activités de type quinoléine.

<b>Tétrahydroquinoléine</b>				
Antidesmone ( <i>Ajuga decumbens</i> Thunb, Labiatae)	Lésions pulmonaires aigües	Inhibition des voies NF-κB et MAPK Réduction de la production de molécules pro-inflammatoires	<i>In vitro</i> , macrophage RAW264.7 (15, 30 et 60 μM) <i>In vivo</i> , souris (2, 4 et 8 mg/kg)	[168]
<b>Décahydroquinoléine</b>				
Isomyrionine (12- oxomyribérine A) ( <i>Myrioneuron faberi</i> , Rubiaceae)	Infection par le HCV (Virus de l'hépatite C, <i>Hepacivirus</i> , <i>Flaviridae</i> )	Inhibition de l'infection	<i>In vitro</i>	[169]
<b>Quinolones</b>				
Buchapine ( <i>Haplophyllum bucharicum</i> , <i>Haplophyllum. tuberculatum</i> and <i>Euodia roxburghiana</i> , Rutaceae)	Infection par le VIH-1 ( <i>Lentivirus</i> , <i>Retroviridae</i> )		<i>In vitro</i>	[170]
<i>N</i> -Méthylcorydaldine ( <i>Hernandia</i> <i>moerenhoutiana</i> , <i>Hernandia</i> <i>nymphaeifolia</i> and <i>Hernanda</i> <i>voyronii</i> , Hernandiaceae)	Cancer		<i>In vitro</i>	[53]
<b>Furoquinoléines</b>				
Dictamine ( <i>Dictamnus dasycarpus</i> Turcz, Rutaceae)	Cancer	Réduction de la transition des cellules	<i>In vitro</i> , cellules HCT116, HeLa et A549 (10, 30, 100 μM) <i>In vivo</i> , souris (50 ou 100 mg/kg)	[171]
Dictamalkoside A Dictamalkoside B Haplopine ( <i>Dictamnus dasycarpus</i> Turcz., Rutaceae)	Inflammation	Inhibition de la production de NO	<i>In vitro</i> , Macrophage RAW 264.7	[172]

**Tableau 6.** Alcaloïdes de type benzophénanthridine.

Structure (source)	Pathologie	Mécanisme d'action	Modèle	Réf.
Nitidine (chlorure) ( <i>Toddalia asiatica</i> , Rutaceae ; <i>Zanthoxylum nitidium</i> , Rutaceae)	VIH	Inhibition de la transcription inverse	<i>In vitro</i> , IC <sub>50</sub> =1 µM	[2]
	Cancer	Réduction de l'activité des MMP (2 et 9) Phosphorylation c-Src/FAK, c-Src, MAPK, Activation de l'activité de RHoA, Rac1 et AP-1	<i>In vitro</i> , lignée cellulaire de carcinome mammaire humain (0,1-10 µM) <i>In vivo</i> , souris (5 mg/kg/jour)	[173]
	Inflammation	Inhibition des voies MAPK et NF-κB Réduction du niveau d'expression de cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-1β, IL-6)	<i>In vitro</i> , macrophage RAW 264.7 (1-5 µM)	[174]
Chlorure de fagaronine et chlorure de nitidine	VIH			[47]
Sanguinarine ( <i>Sanguinaria canadensis</i> , <i>Argemone mexicana</i> , Papaveraceae) Sanguinarine ( <i>Sanguinaria canadensis</i> , <i>Argemone mexicana</i> , Papaveraceae)	Cancer	Activation des caspases et de la voie MAPK Augmentation de l'expression de MKP-1 Augmentation de l'apoptose	<i>In vitro</i> , cellules cancéreuses pulmonaires (A549) (1, 2,5 et 5 µM)	[175]
	Cancer	Diminution du marqueur de prolifération Ki67 Activation des voies MAPK et JAK-STAT (Akt)	<i>In vitro</i> , cellules cancéreuses de mélanome <i>In vivo</i> , souris (dose orale, 5 mg/kg/jour)	[176]
	Cancer	Effet angiogénique via l'inhibition de la phosphorylation de Akt et p38 via VEGF	<i>In vitro</i> , cellule endothéliale microvasculaire (HMVEC) et cellule A549	[177]
Sanguinarine et Chélérythrine ( <i>Papaveraceae</i> , <i>Fumariaceae</i> , <i>Rutaceae</i> , <i>Ranunculaceae</i> et <i>Meliaceae</i> )	Inflammation	Diminution de l'expression de CCL2, IL-6 et IL-1RA	<i>In vitro</i> , macrophage (0,5 µM)	[178]

**Tableau 6** (*Suite et fin*). Alcaloïdes de type benzophénanthridine.

	Inflammation	Induction la translocation nucléaire de la sous-unité p de NF-κB (p65) Accumulation du GR dans le noyau et diminution du GR cytosolique	<i>In vitro</i> , cellule HeLa (1 et 10 μM)	[179]
Chélérythrine	Inflammation	Inhibition de l'expression de TNF-α, IL-6 et NO	<i>In vivo</i> , souris	[180]
	Inflammation	Régulation de COX-2 et réduction du niveau de PGE <sub>2</sub>	<i>In vivo</i> , souris (i.p., 1 et 5 mg/kg) <i>In vitro</i> , macrophage (0,0001 à 1 μg/mL)	[181]

**Tableau 7.** Activités biologiques des alcaloïdes de type pyridine.

Structure (source)	Pathologie	Mécanisme d'action	Modèle	Réf.
5,6-dihydro-2(1H)-pyridinone ( <i>Piper longum</i> , Piperaceae)	Infection par le virus de l'hépatite B ( <i>Orthohepadnavirus</i> , <i>Hepadnaviridae</i> )	Inhibition de la réplication virale	<i>In vitro</i> , cellule Hep G 2.2.15 (SI = 15,7 et 16,8 μM)	[182]
Nicotine (Tabac, <i>Nicotiana tabacum</i> , Solanaceae)	Infection par le virus de l'herpès 1 (HSV-1) <i>Simplexvirus</i> , <i>Orthoherpesviridae</i>	Réduction de l'attachement du virus à la cellule	<i>In vitro</i>	[183]
Arécoline ( <i>Areca nuts</i> , Arecaceae)	Fibrose sous-muqueuse buccale	Activation de la voie MAPK et augmentation du facteur HIF-1α (hypoxia-inducible factor-1 α)	<i>Ex vivo</i> , mucosalfibroblaste buccal humain (10-160 μg/mL)	[184]

**Tableau 7** (*Suite et fin*). Activités biologiques des alcaloïdes de type pyridine.

Trigonelline	Inflammation du cerveau	Inhibition de la voie TLR4/NF-κB Inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase Réduction du stress oxydant Réduction du déclin cognitif	<i>In vivo</i> , rat (20, 40 et 80 mg/kg/jour)	[185]
<b>Sesquiterpène Pyridine</b>				
Triptonine A/B/C ( <i>Tripterygium hypoglaucum</i> , <i>T. wilfordii</i> , Celastraceae)	Infection par le VIH ( <i>Lentivirus</i> , <i>Retroviridae</i> )	Inhibition de l'infection	<i>In vitro</i>	[2]
Wilfordinines A/B/C ( <i>Tripterygium hypoglaucum</i> , <i>T. wilfordii</i> , Celastraceae)				
Hypoglaunines A/B ( <i>Tripterygium hypoglaucum</i> , <i>T. wilfordii</i> , Celastraceae)				
Triptonine A/B ( <i>Toddalia asiatica</i> , Rutaceae)	Infection par le VIH ( <i>Lentivirus</i> , <i>Retroviridae</i> )	Inhibition de la transcription inverse	<i>In vitro</i>	[2]
Aquifonine E ( <i>Maytenus ilicifolia</i> , Celastraceae)	Infection par le HCV (Virus de l'hépatite C, <i>Hepacivirus</i> , <i>Flaviridae</i> )	Inhibition de la réplication virale	<i>In vitro</i> , Huh 7.5 (EC <sub>50</sub> = 2.3 μM)	[186]
<b>Pyridinium</b>				
Spongidines A–D (Eponge marine, <i>Petrosaspongia nigra</i> , Thorectidae)	Maladie rhumatique	Inhibition de l'activité de la PLA2 synoviale	<i>In vitro</i> , fibroblaste humain	[187]

**Tableau 8.** Activités biologiques des alcaloïdes de type pipéridine.

Structure (source)	Pathologie	Mécanisme d'action	Modèle	Réf.
<p><i>Erythro</i>-1-[1-oxo-9(3,4-méthylènedioxyphényl)-8,9-dihydroxy-2E-nonényl]-pipéridine</p> <p><i>Threo</i>-1-[1-oxo-9(3,4-méthylènedioxyphényl)-8,9-dihydroxy-2E-nonényl]-pipéridine</p> <p>3β,4α-Dihydroxy-2-pipéridinone</p> <p>Pipérine (<i>Piper nigrum</i>, Piperaceae)</p>	<p>Infection par le virus de l'hépatite B (<i>Orthohepadnavirus</i>, <i>Hepadnaviridae</i>)</p>	<p>Inhibition de la réplication virale</p>	<p><i>In vitro</i>, Hep G 2.2.15</p>	<p>[182]</p>
<p>Pipérine (<i>Piper nigrum</i>, Piperaceae)</p>	<p>Cancer</p>	<p>Arrêt du cycle cellulaire à la phase G2/M Augmentation de TIMP-1/2 Diminution des MMPs 2 et 9 Inhibition de la prolifération et de l'invasion des cellules cancéreuses</p>	<p><i>In vitro</i>, cellule HOS (IC<sub>50</sub> = 72 μM) Cellule U2OS (IC<sub>50</sub> = 126 μM, 25-200 μM)</p>	<p>[188]</p>
	<p>Arthrite</p>	<p>Réduction des niveaux de TNF-α, IL-1β, TBARS et NOX Réduction de l'expression de NF-κB p65</p>	<p><i>In vivo</i>, rat modèle d'arthrite (dose orale, 20 mg/kg)</p>	<p>[189]</p>

**Tableau 8** (*Suite et fin*). Activités biologiques des alcaloïdes de type pipéridine.

	Déficiences cognitive	Restauration de la fonction cholinergique, de la balance redox Réduction de l'inflammation Réduction de l'hyperphosphorylation de la protéine Tau	<i>In vivo</i> , souris (2,5, 5 ou 10 mg/kg)	[190]
		Réduction de la migration cellulaire Réduction de l'activité des cellules Réduction de la production d'IL-6, TNF- $\alpha$ et MCP-1	<i>In vitro</i> , cellule dendritique dérivée de la moelle osseuse <i>In vivo</i> , souris (100 $\mu$ M)	[191]
Homonojirimycine ( <i>Commelina communis</i> , Commelinaceae)	Infection par le IAV (virus de la grippe, <i>Alphainfluenzavirus</i> <i>Orthomyxoviridae</i> )	Augmentation des niveaux de INF- $\gamma$ et IL-10 Réduction des niveaux de TNF- $\alpha$ et IL-6	<i>In vivo</i> , souris (dose orale, 1 mg/kg)	[192]
Cassine ( <i>Senna spectabilis</i> , Fabaceae)	Inflammation et neuropathie	Inhibition de l'activation de COX-2, MAPK/ERK et NF- $\kappa$ B Réduction de la production des cytokines et chimiokines Inhibition des réponses nociceptives et inflammatoires	<i>In vivo</i> , souris modèle d'arthrite (dose orale, 3–60 mg/kg)	[193]

**Tableau 9.** Activités biologiques des alcaloïdes de type indolizidine.

Structure (source)	Pathologie	Mécanisme d'action	Modèle	Réf.
Castanospermine ( <i>Castanospermum australe</i> , Fabaceae)	Infection par le VIH (VIH, <i>Lentivirus</i> , <i>Retroviridae</i> )	Inhibition de la $\alpha$ -galactosidase Altération de la glycosylation de la protéine gp120 Inhibition de l'attachement du virus à la cellule hôte	<i>In vitro</i> , IC <sub>50</sub> = 5 $\mu$ M	[2]
		Inhibition de la réplication virale	<i>In vitro</i> , IC <sub>50</sub> = 5 $\mu$ M	

**Tableau 9** (Suite et fin). Activités biologiques des alcaloïdes de type indolizidine.

Lycorine	Infection par SINV, SFV et CHIKV ( <i>Alphavirus, Togaviridae</i> ).	Inhibition de la traduction des protéines virales		[194]
<b>Phénanthroindolizidine</b>				
(-)-Antofine ( <i>Cryptocarya chinensis</i> )	Infection par le VIH (VIH, <i>Lentivirus, Retroviridae</i> )	Inhibition de la transcription inverse	<i>In vitro</i> , IC <sub>50</sub> =1.88 mg/mL	[2]

**Tableau 10.** Activités biologiques d'autres classes d'alcaloïdes.

Structure (source)	Classe	Pathologie	Mécanisme d'action	Modèle	Réf.
Oleracone ( <i>Portulaca oleracea</i> L, Portulacaceae)	Pyrrole	Inflammation	Réduction de la production de molécules pro-inflammatoires (NO, IL-6, TNF- $\alpha$ , PGE2)	<i>In vitro</i> , macrophage RAW 264.7 (50 $\mu$ M)	[195]
Anisomycine	Pyrrole	Infection par les virus DENV et ZIKV ( <i>Flavivirus, Flaviviridae</i> )	Inhibition de la synthèse d'ARN et protéique virale	<i>In vitro</i> , cellule Vero (>25 nM) <i>In vivo</i> , souris (4 mg/kg/jour)	[196]
Baculiférines C, E, F, G, H, K et N (Eponge marine, <i>Iotrochota baculifera</i> Iotrochotidae)	Pyrrole	Infection par le VIH-1 ( <i>Lentivirus, Retroviridae</i> )		<i>In vitro</i> , MT4 and MAGI cells	[197]
Feruloylhistamine ( <i>Ephedra sp</i> , Ephedraceae)	Imidazole	Lésion hépatiques		<i>In vitro</i>	[198]

**Tableau 10 (Suite).** Activités biologiques d'autres classes d'alcaloïdes.

Epiisopiloturine	Imidazole	Maladie de Crohn	Inhibition de l'activité des enzymes clés (iNOS, COX-2) Réduction des niveaux des composants pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA))	<i>In vivo</i> , rat modèle de la maladie de Crohn (1 mg/kg)	[199]
		Inflammation	Inhibition of IKK $\alpha$ et IKK $\beta$	<i>In vitro</i> , THP-1 (IC <sub>50</sub> = 0,85 et 1,6 mM)	[12]
4-Butyl-2-chloro-5-formyl-1H-imidazole ( <i>Jatropha curcas</i> L., Euphorbiaceae)	Imidazole	Cancer			[200]
Caféine (Caféier, <i>Coffea sp.</i> )	Base purique	Inflammation	Inhibition de p38 MAPK et NF- $\kappa$ B (via I $\kappa$ B $\alpha$ ) Réduction des niveaux de NO, iNOS, IL-3, IL-6, IL-12 et COX-2	<i>In vitro</i> , macrophage RAW 264.7 <i>In vivo</i> , poisson zèbre (100-1200 $\mu$ M)	[201]
Théacrine (Acide 1, 3, 7, 9-tétraméthylurique), ( <i>Camellia kucha</i> , Theaceae)	Base purique	Stéatose hépatique non alcoolique	Effet anti-inflammatoire, analgésiques Inhibe la stéatose et l'inflammation du foie	<i>In vivo</i> , souris (dose orale, (8–32mg/kg) <i>In vitro</i> , cellules HepG2 et L-02	[202,203]
Théophylline (“ <i>Viridis</i> tea “ et <i>Camellia crassicaolumna</i> , Theaceae)	Base purique	Colite ulcéreuse	Augmentation du niveau de médiateurs anti-inflammatoires (IL-4, IL-10 et SOD) Diminution du niveau des médiateurs pro-inflammatoires	<i>In vitro</i>	[35]

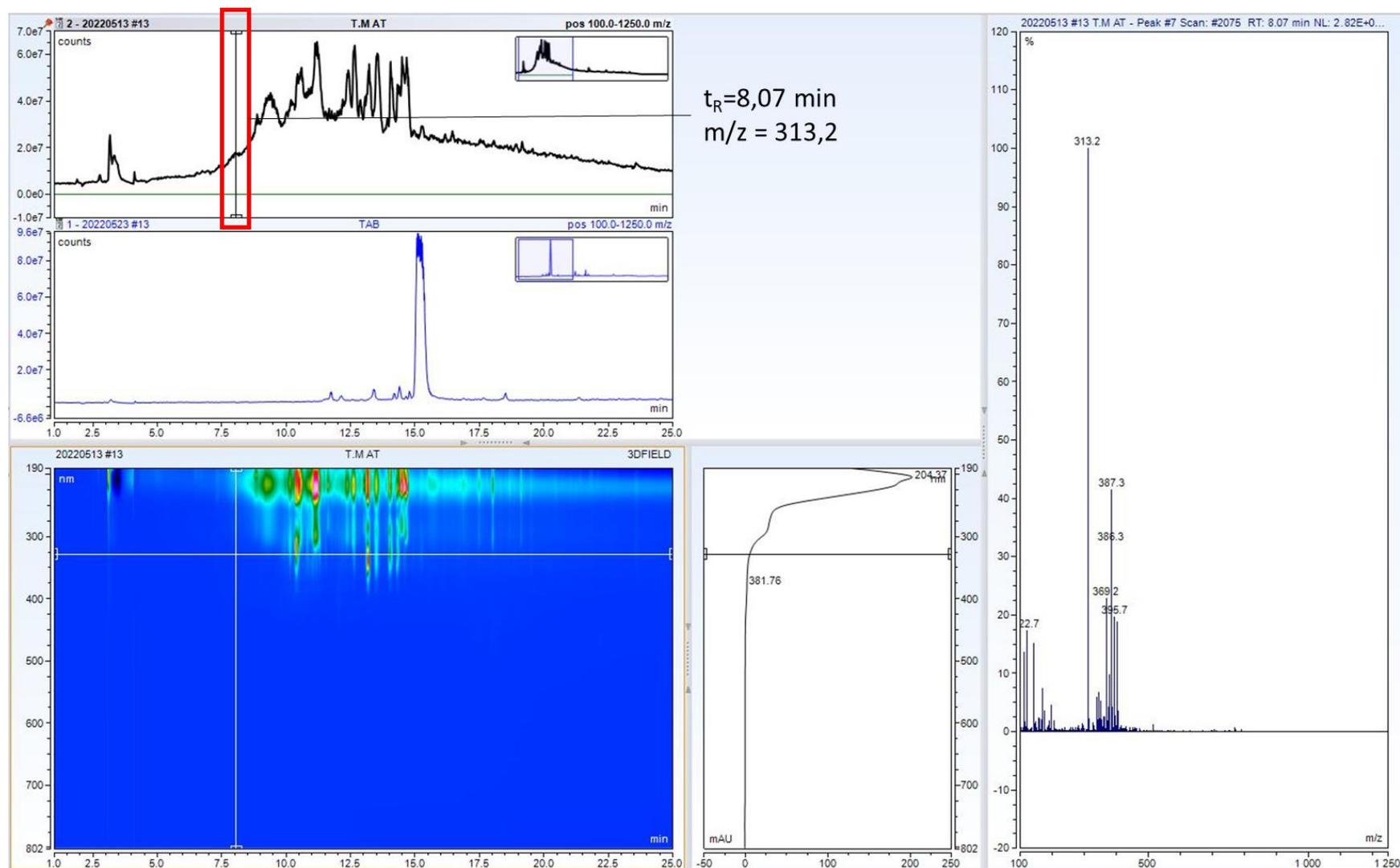
**Tableau 10 (Suite).** Activités biologiques d'autres classes d'alcaloïdes.

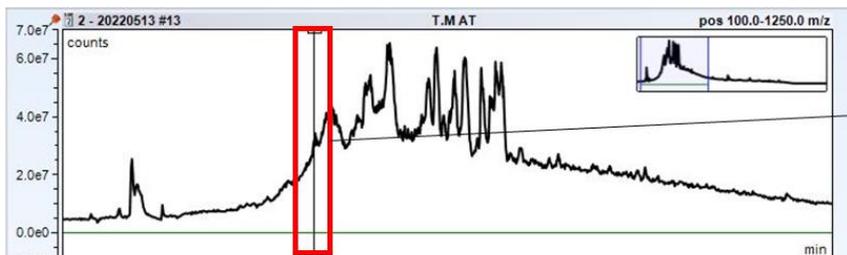
Héricirine (fungus <i>Hericum erinaceum</i> , Hericiaceae)	Isoindolinone	Inflammation	Inhibition des niveaux de iNOS, COX-2, NO, PGE <sub>2</sub> , TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-1 $\beta$	<i>In vitro</i> , macrophage RAW264.7	[204]
Isohéricénone, Isohéricérine, et Erinacérine A (fungus <i>Hericum erinaceum</i> Hericiaceae)	Isoindolinones	Cancer		<i>In vitro</i> , cellules cancéreuses (HCT-15, SK-MEL, SK-OV-3 et A549) (IC <sub>50</sub> = 1.9 – 21 $\mu$ M)	
Chartarutines B, G et H (Eponge marine associée à des champignons, <i>Stachybotrys chartarum</i> , Stachybotryaceae)	Isoindolinones	Infection par le VIH-1 ( <i>Lentivirus</i> , <i>Retroviridae</i> )	Inhibition de l'infection	<i>In vitro</i>	[205]
Déoxyvasicine ( <i>Peganum harmala</i> Linn, Nitrariaceae)	Quinazoline	Amnésie	Régulation de la neuroinflammation et de la balance rédox Amélioration du fonctionnement cerebral	<i>In vivo</i> , souris (5, 15 et 45 mg/kg)	[206]
Hymenialdisine (Eponge marine, <i>Axinella verrucosa</i> , Axinellidae)	Alcaloïde de type pyrroloazépine	Maladie rhumatique	Inhibition de NF- $\kappa$ B, de iNOS et de la production de PGE <sub>2</sub>	<i>In vitro</i> , fibroblaste humain (IC <sub>50</sub> = 1mM)	[187]
Rohitukine ( <i>Dysoxylum binectariferum</i> , Meliaceae)	Alcaloïde de type chromone	Maladies intestinales	Inhibition de la voie NF- $\kappa$ B (via I $\kappa$ $\beta$ - $\alpha$ et p65) Réduction de la production de NO, PGE <sub>2</sub> , IL et TNF- $\alpha$	<i>In vitro</i> , J774A.1 macrophages <i>In vivo</i>	[207]

**Tableau 10** (*Suite et fin*). Activités biologiques d'autres classes d'alcaloïdes.

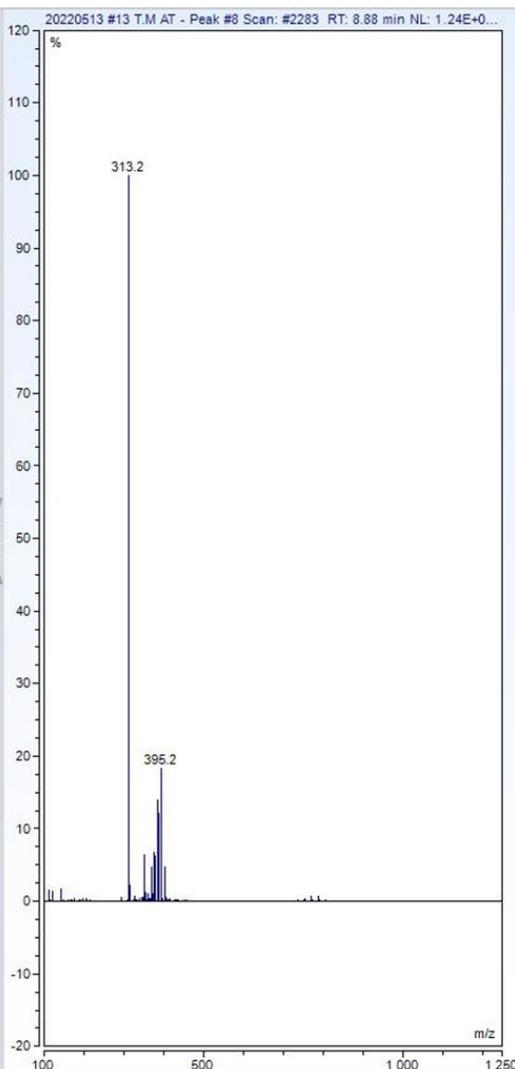
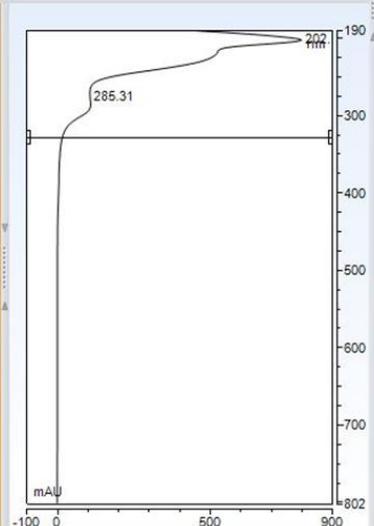
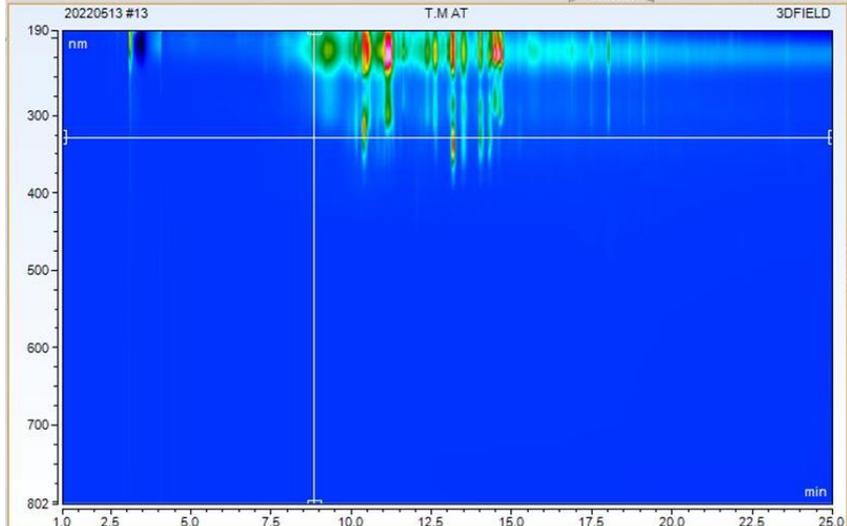
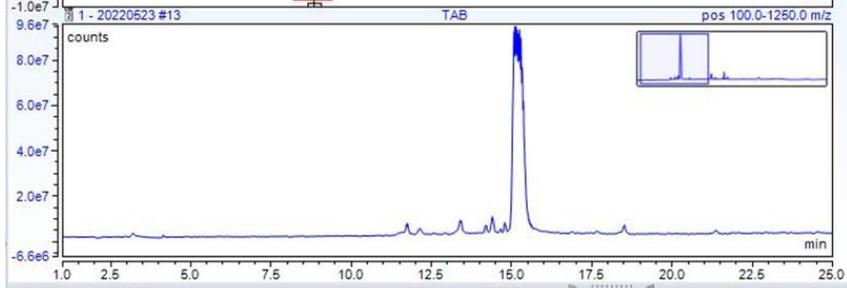
Epigoitrine ( <i>Isatis indigotica</i> , Brassicaceae)	Oxazolidine	Infection par le IAV (virus de la grippe, <i>Alphainfluenzavirus</i> <i>Orthomyxoviridae</i> )	Inhibition de l'attachement du virus et réplication	<i>In vitro</i> , cellule rénale canine (Madin-Darby canine kidney) et cellule HeLa	[208]
--	-------------	---	--	---	-------

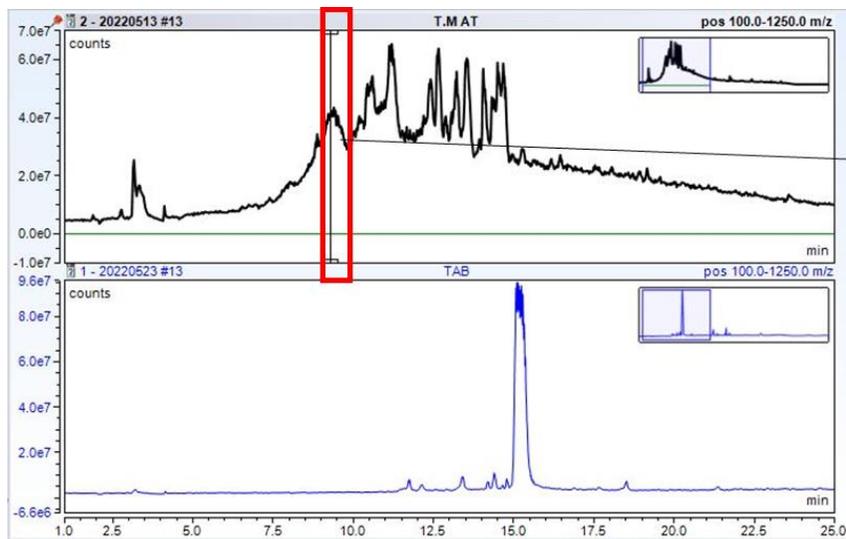
## Annexe 2 : Analyses HPLC-UV-MS de l'extrait AT de l'espèce *Tabernaemontana mauritiana*



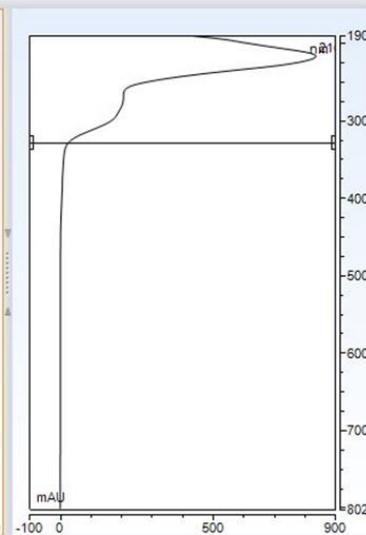
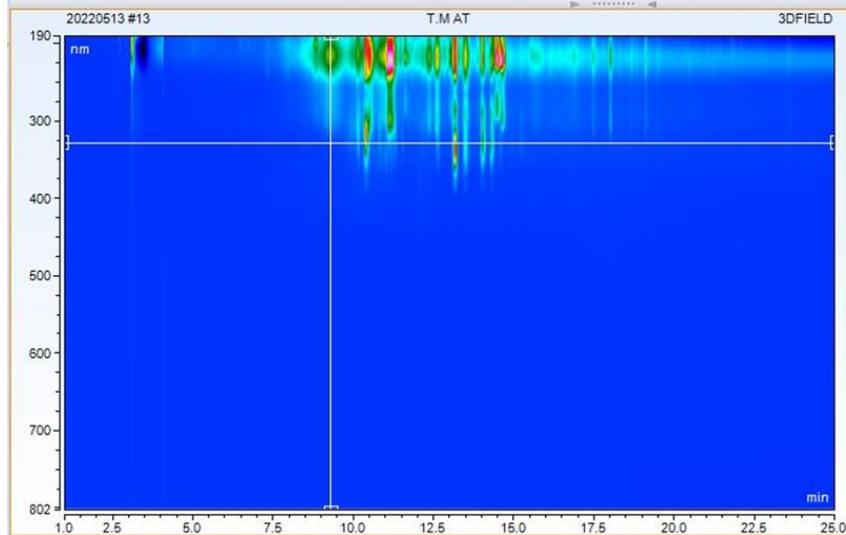
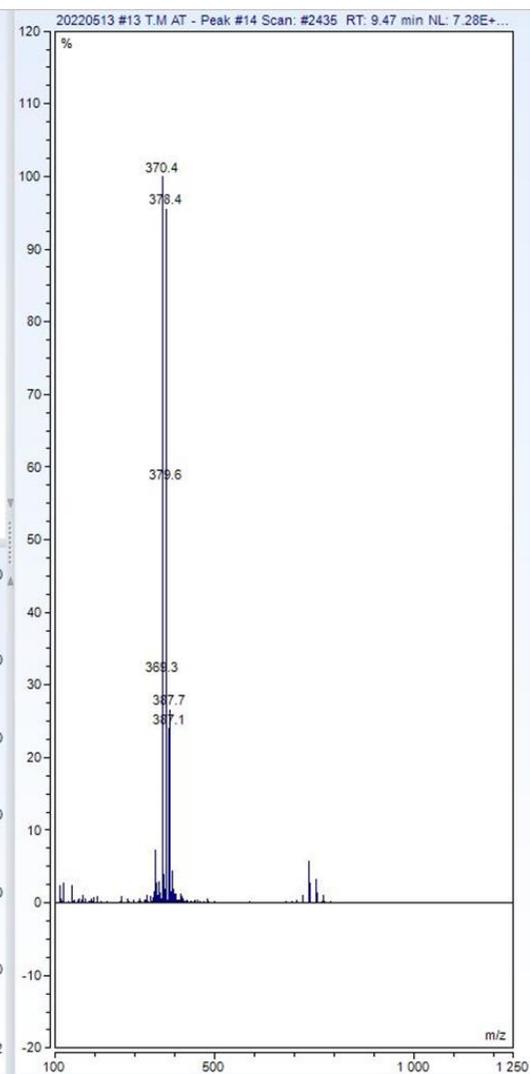


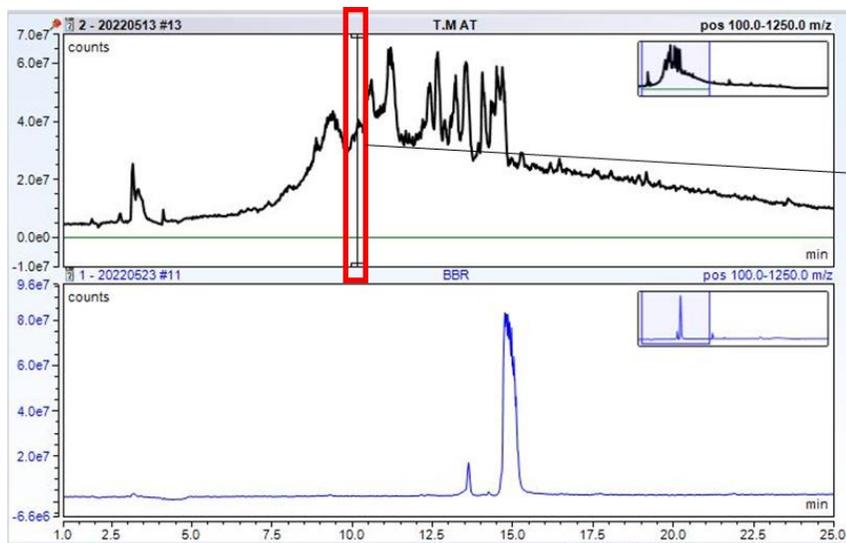
$t_R = 8,88 \text{ min}$   
 $m/z = 313,2$



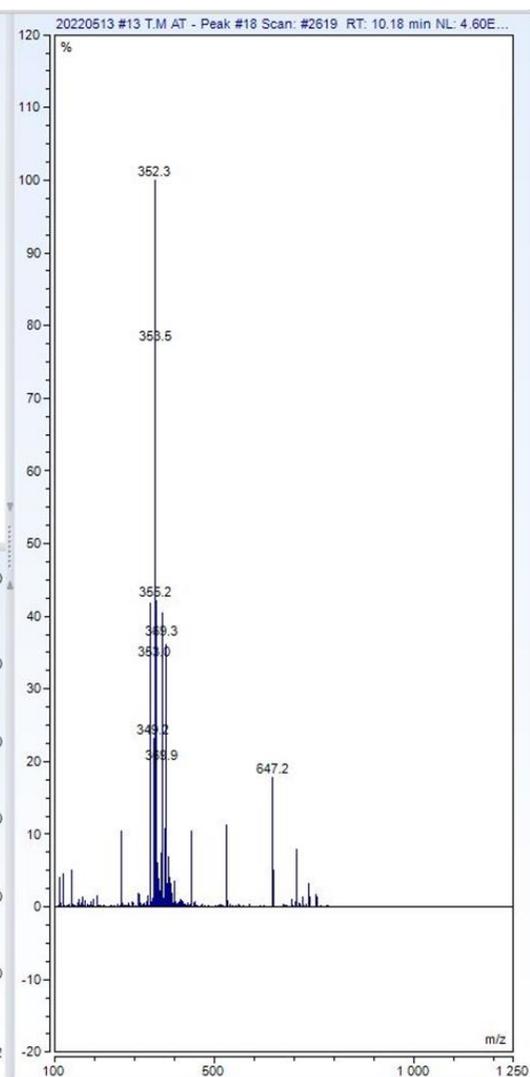
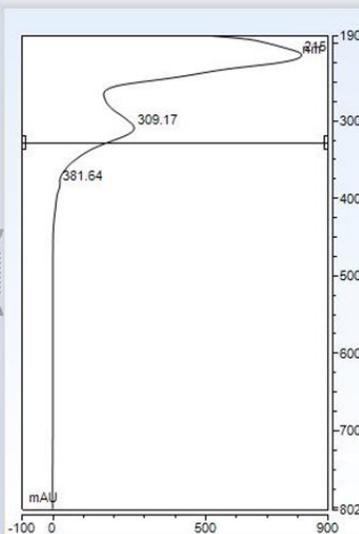
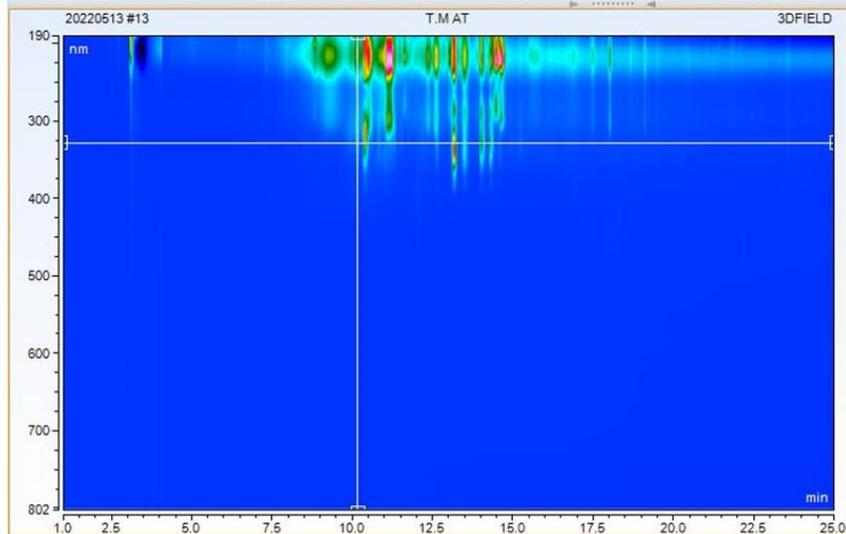


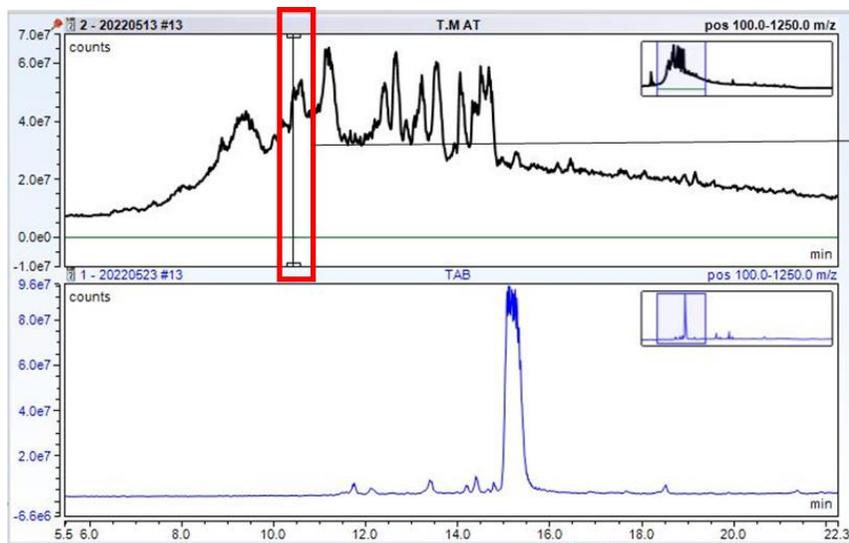
$t_R = 9,47$  min  
 $m/z = 370$   
 et 378



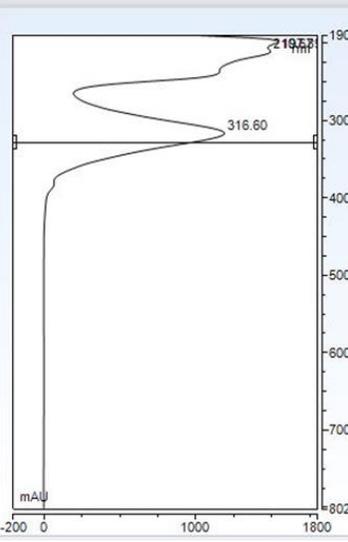
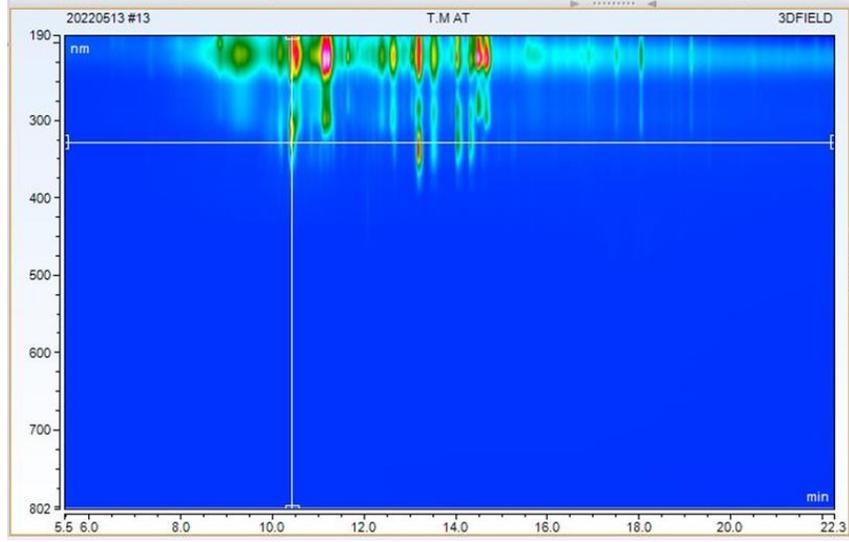
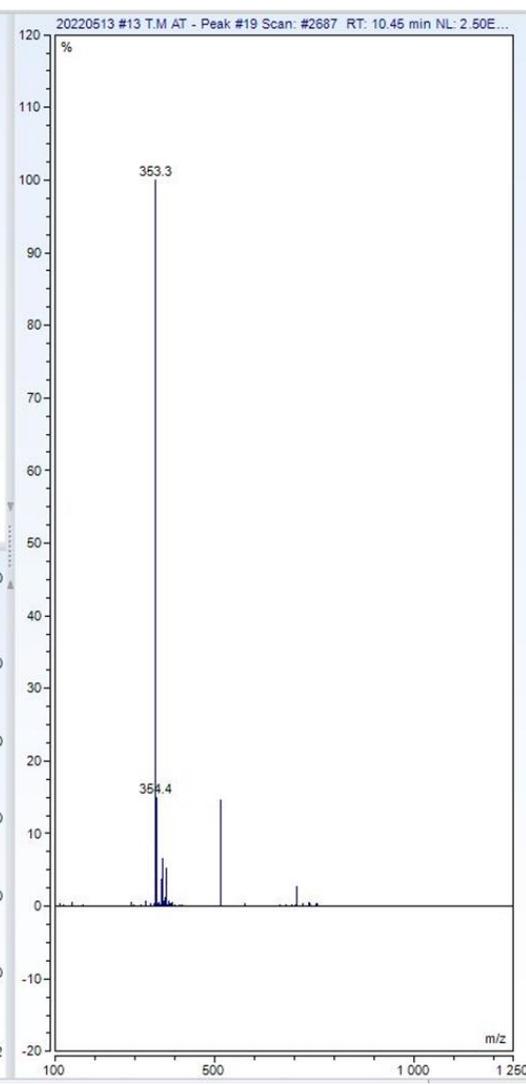


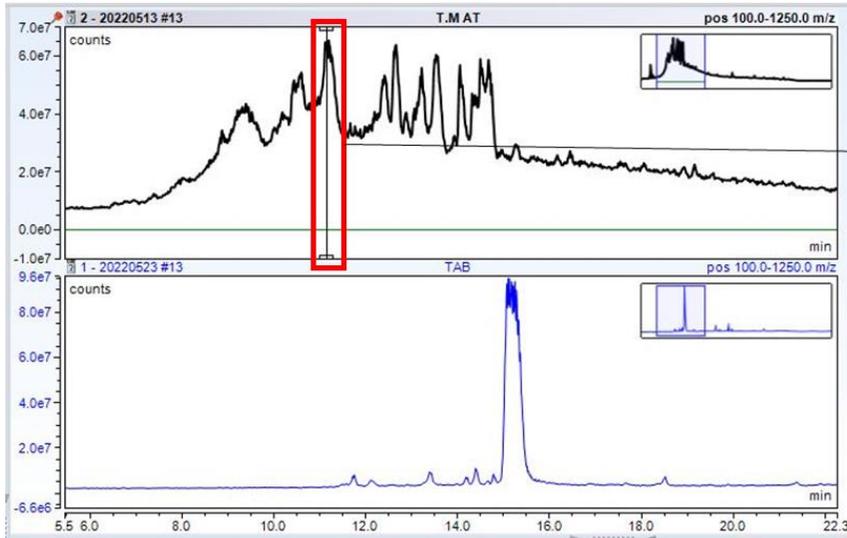
$t_R = 10,18 \text{ min}$   
 $m/z = 352 \text{ et } 353$



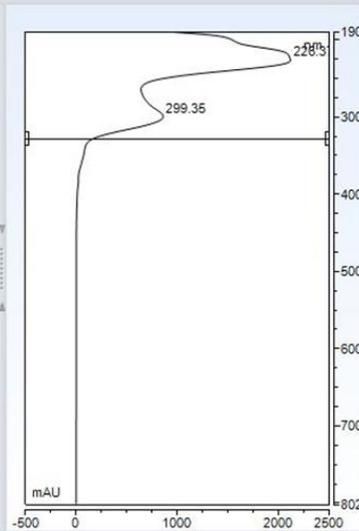
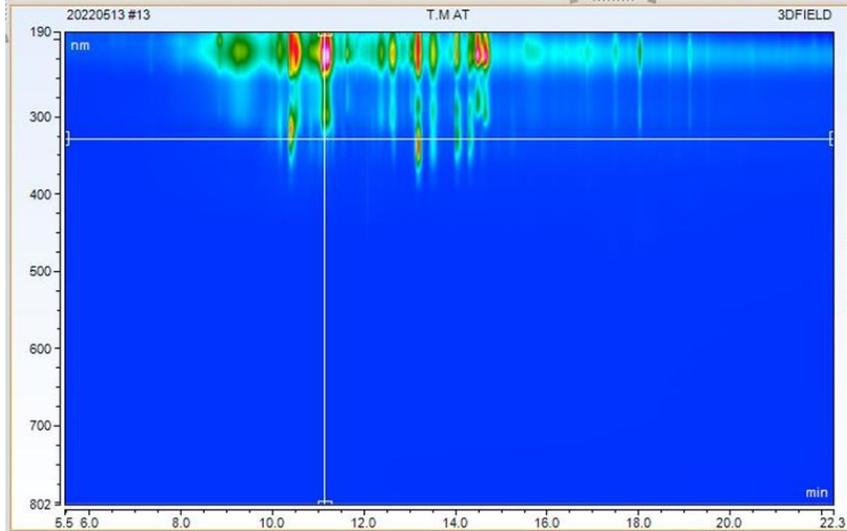
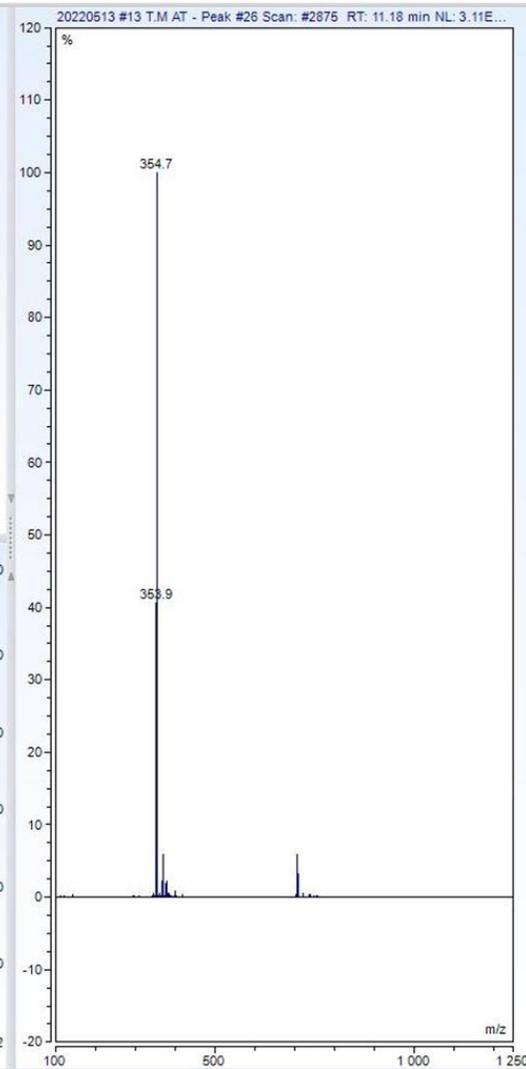


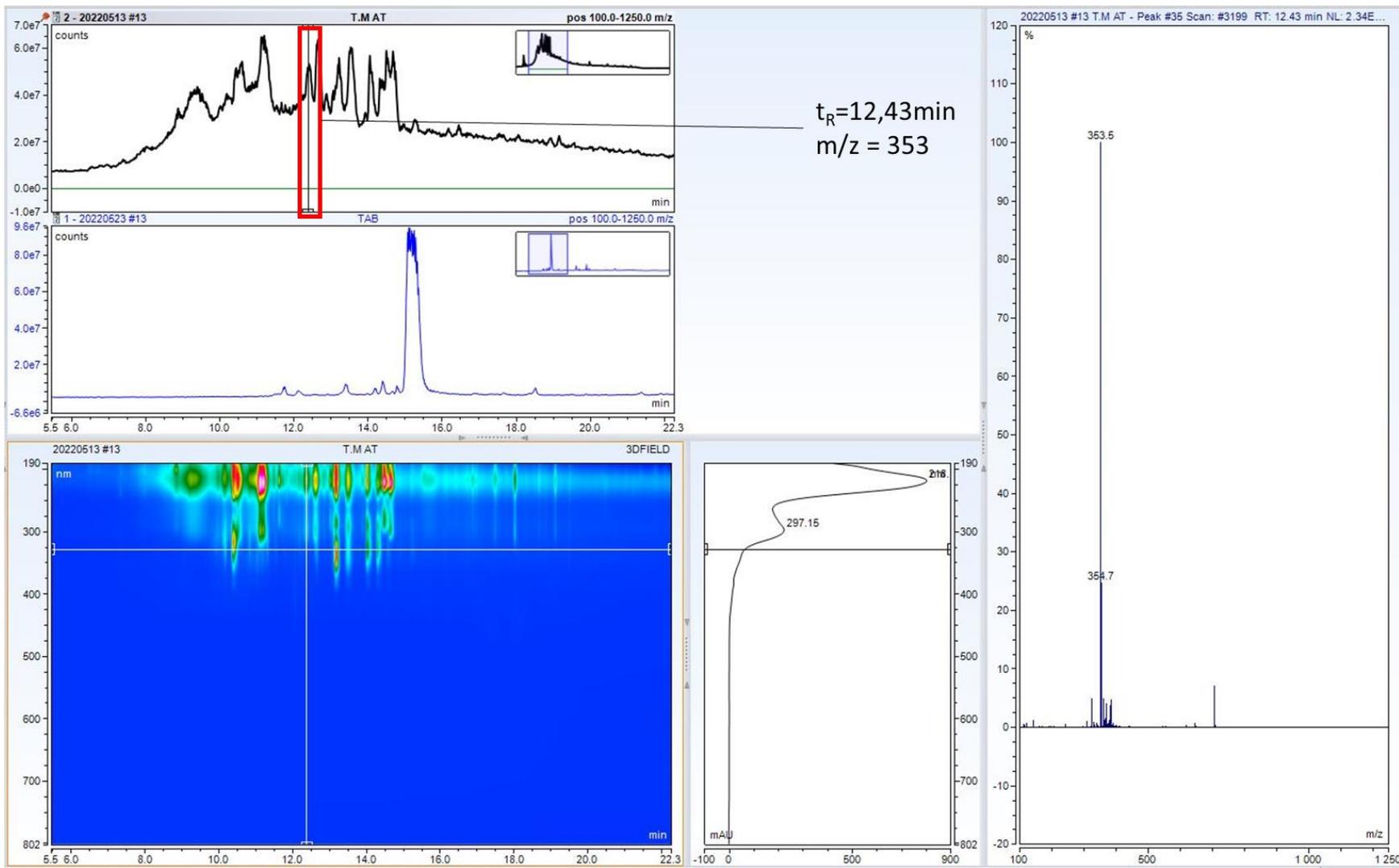
$t_R = 10,45 \text{ min}$   
 $m/z = 353$

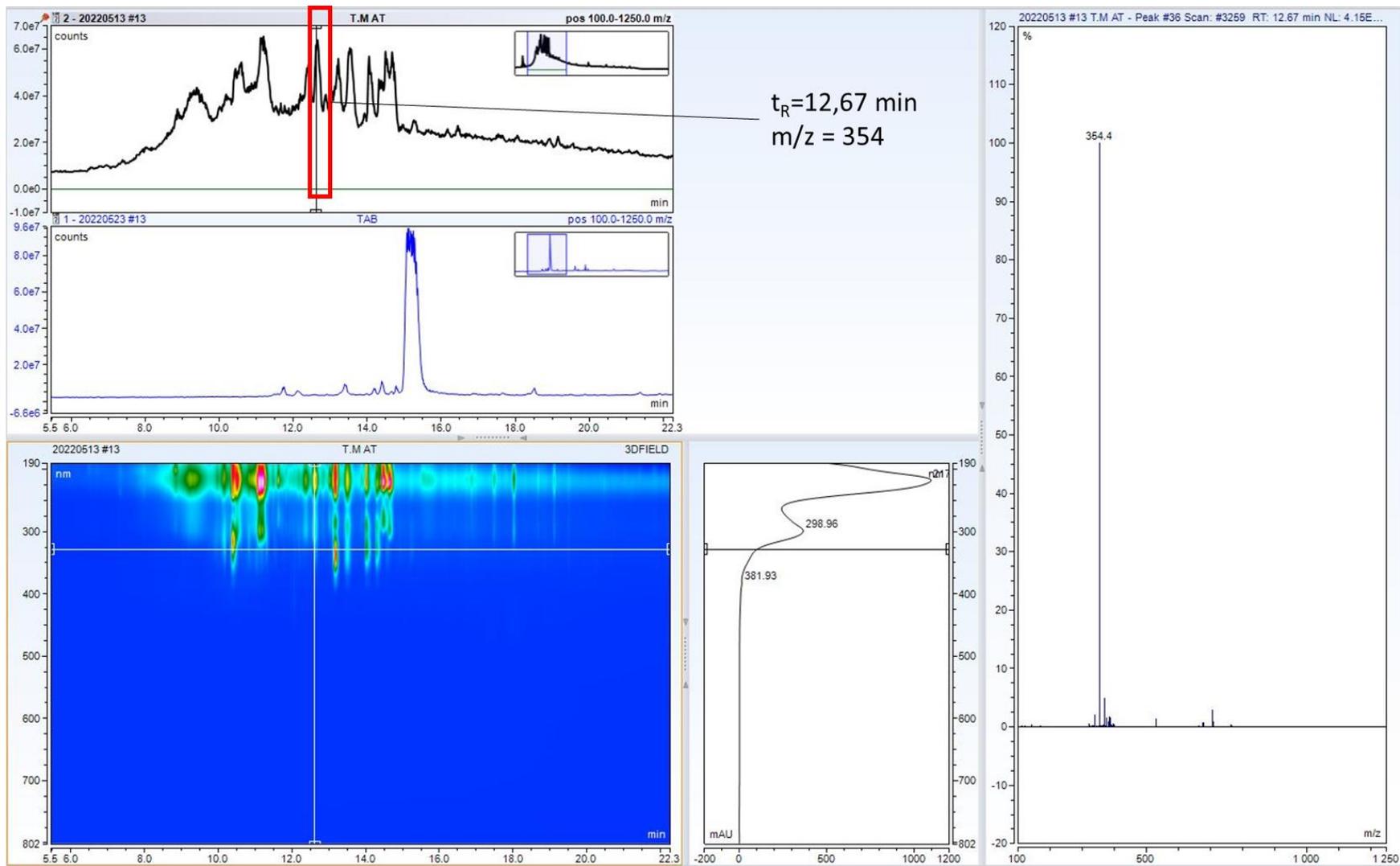


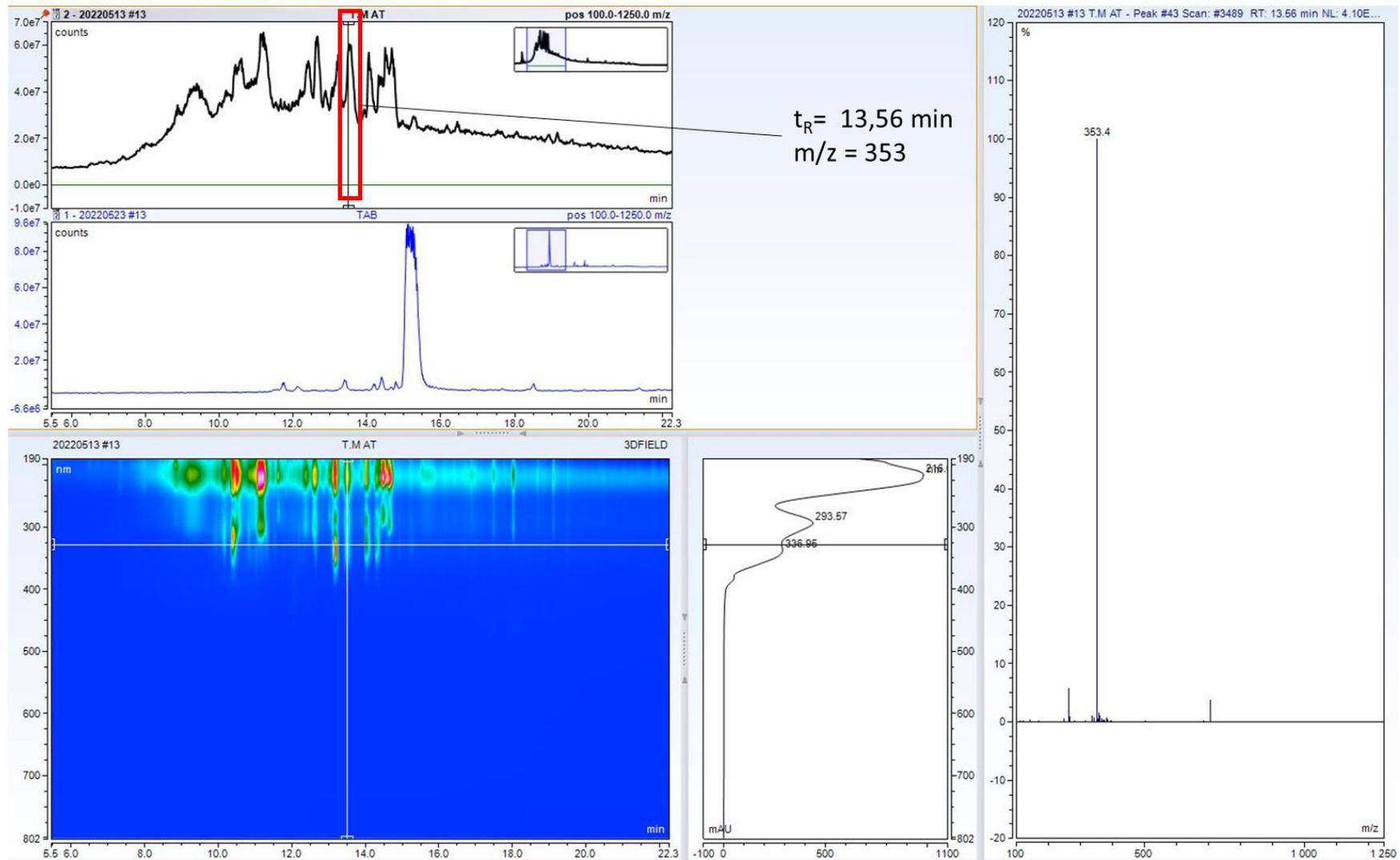


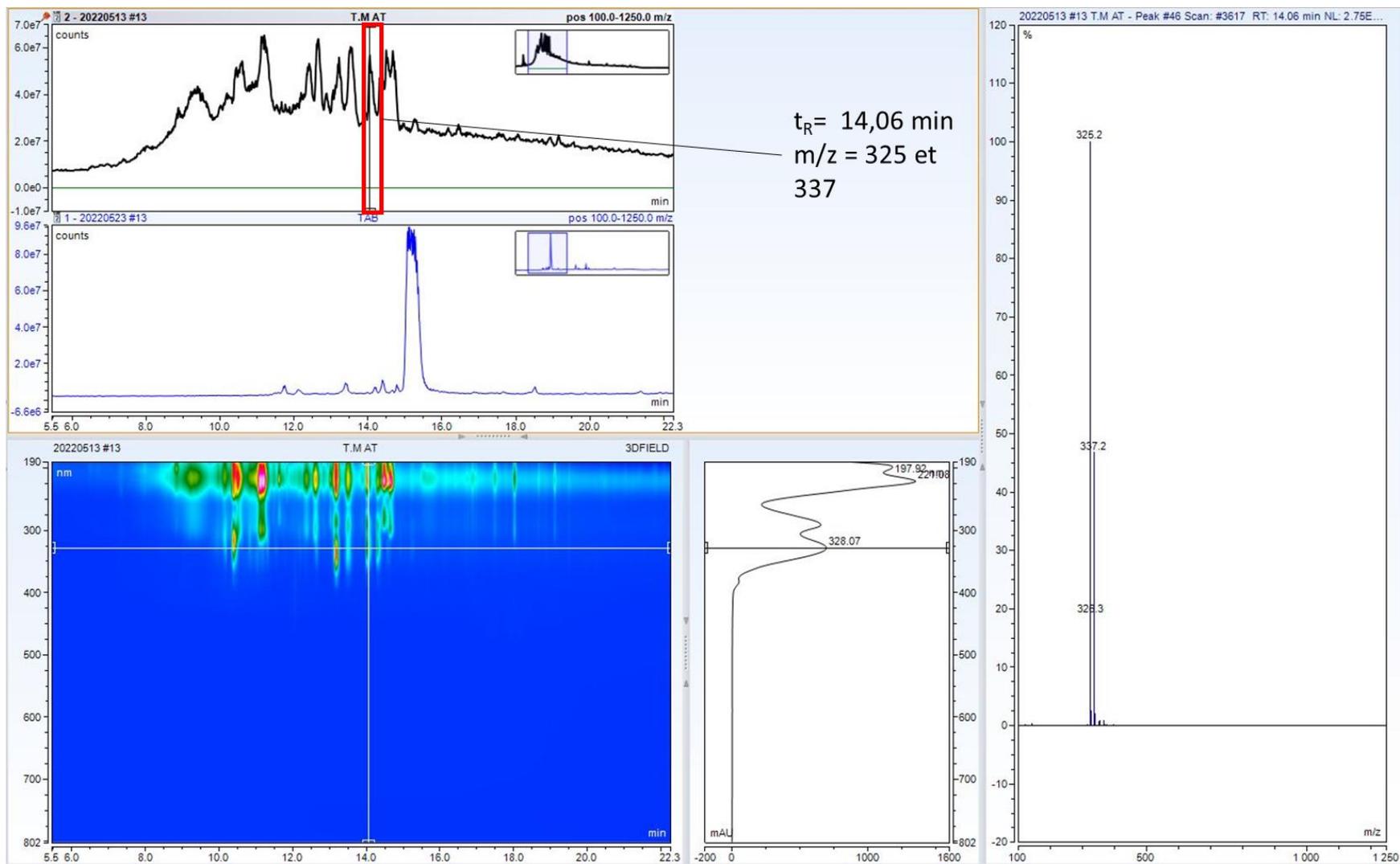
$t_R = 11,18 \text{ min}$   
 $m/z = 353$

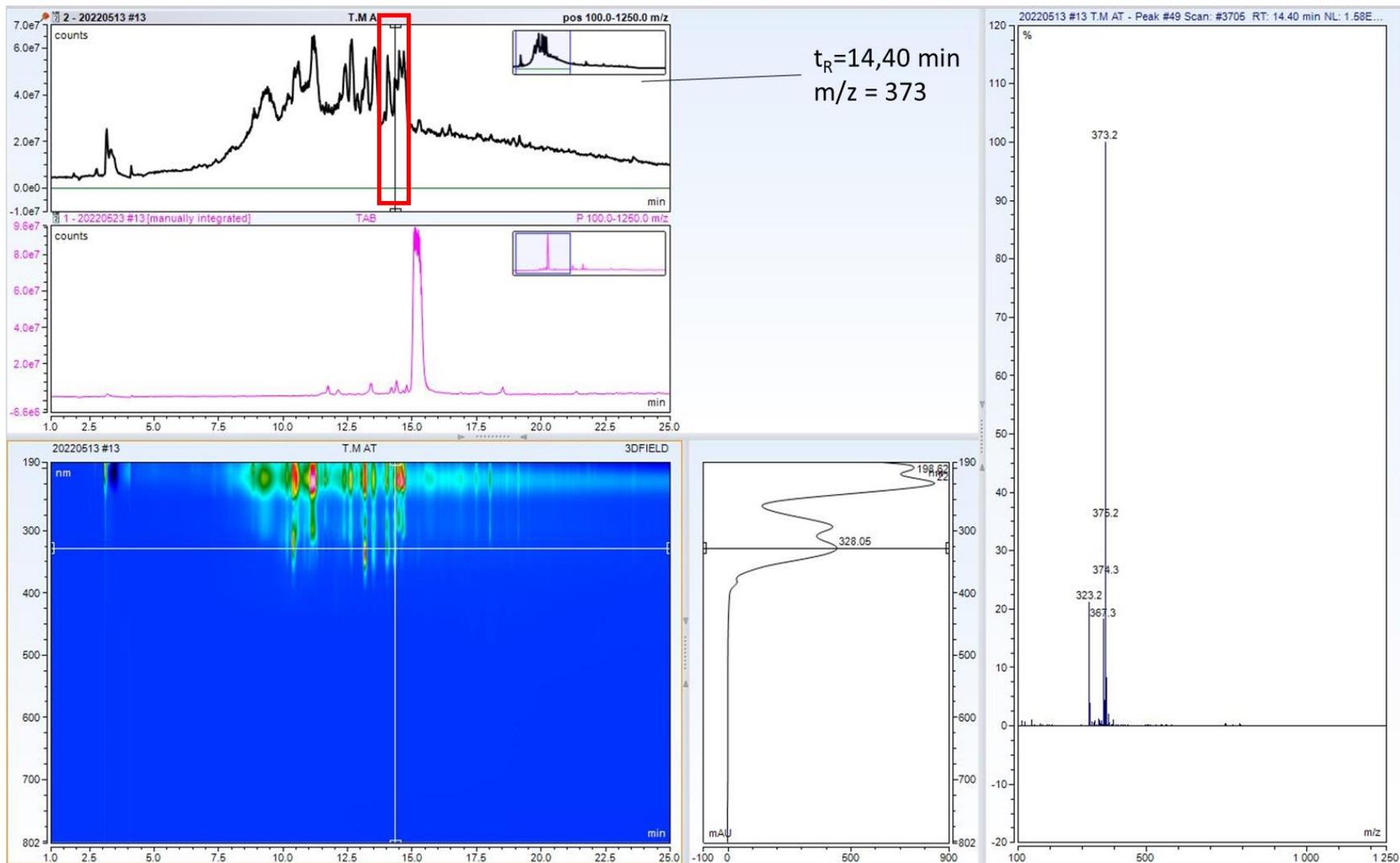


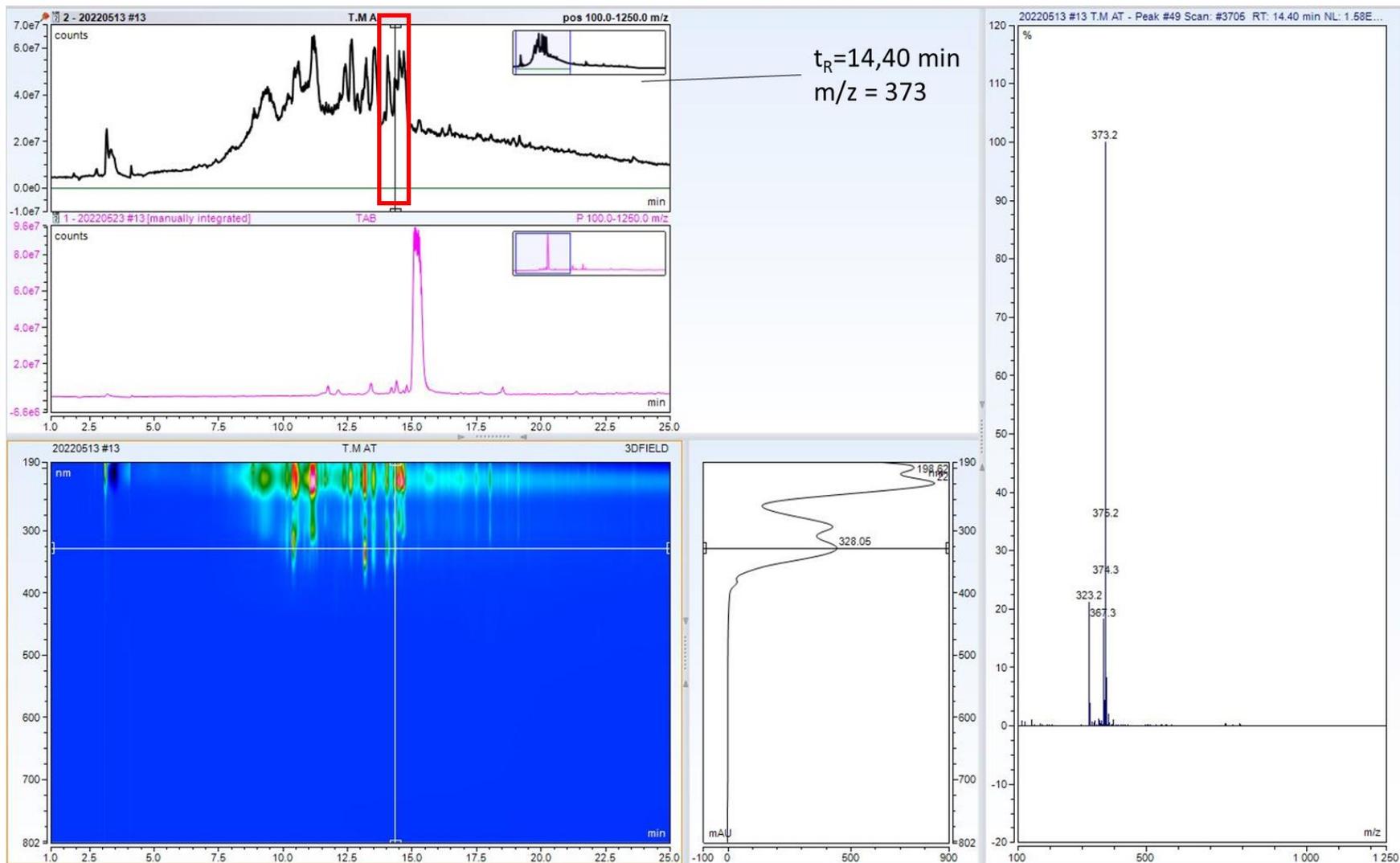


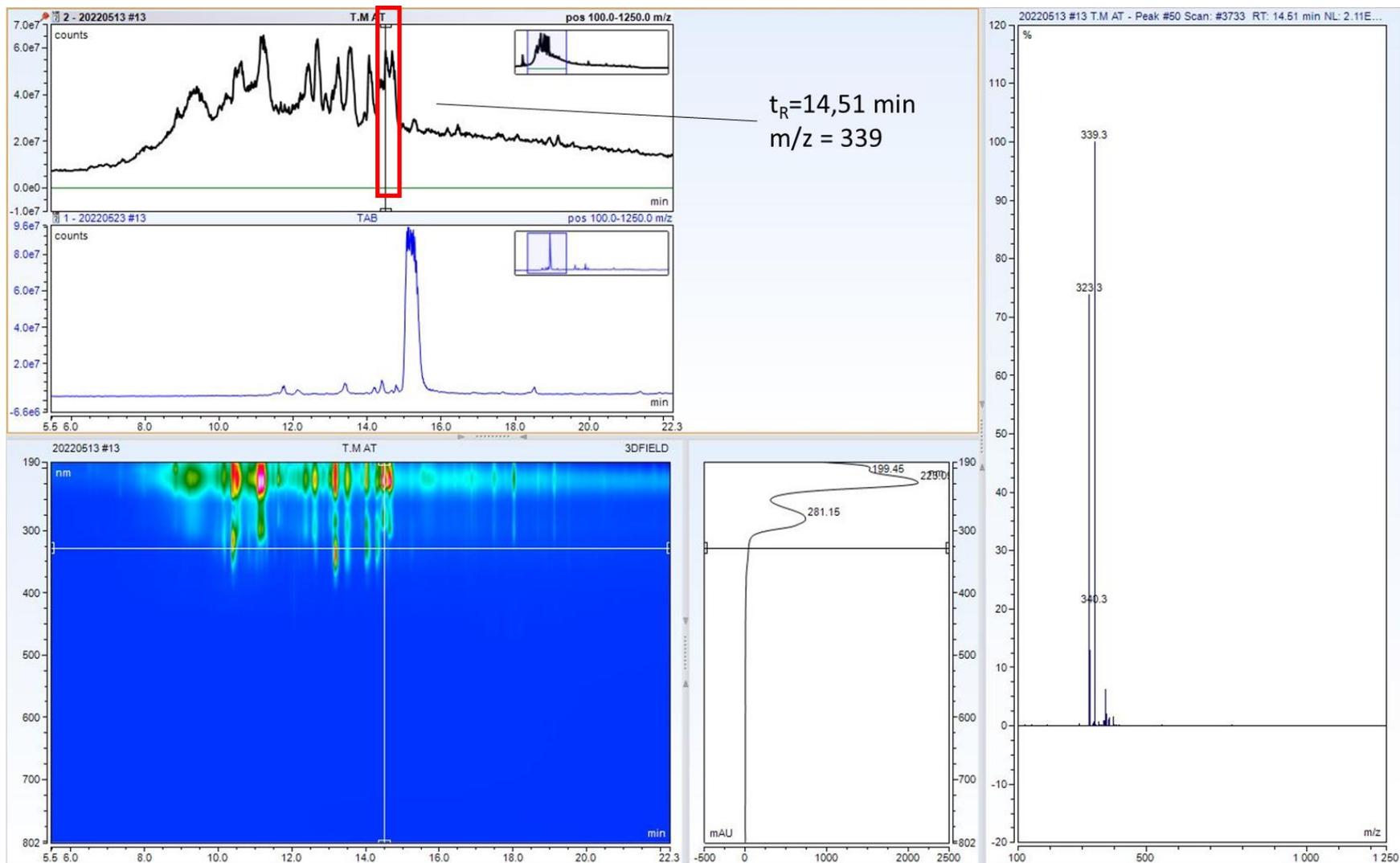


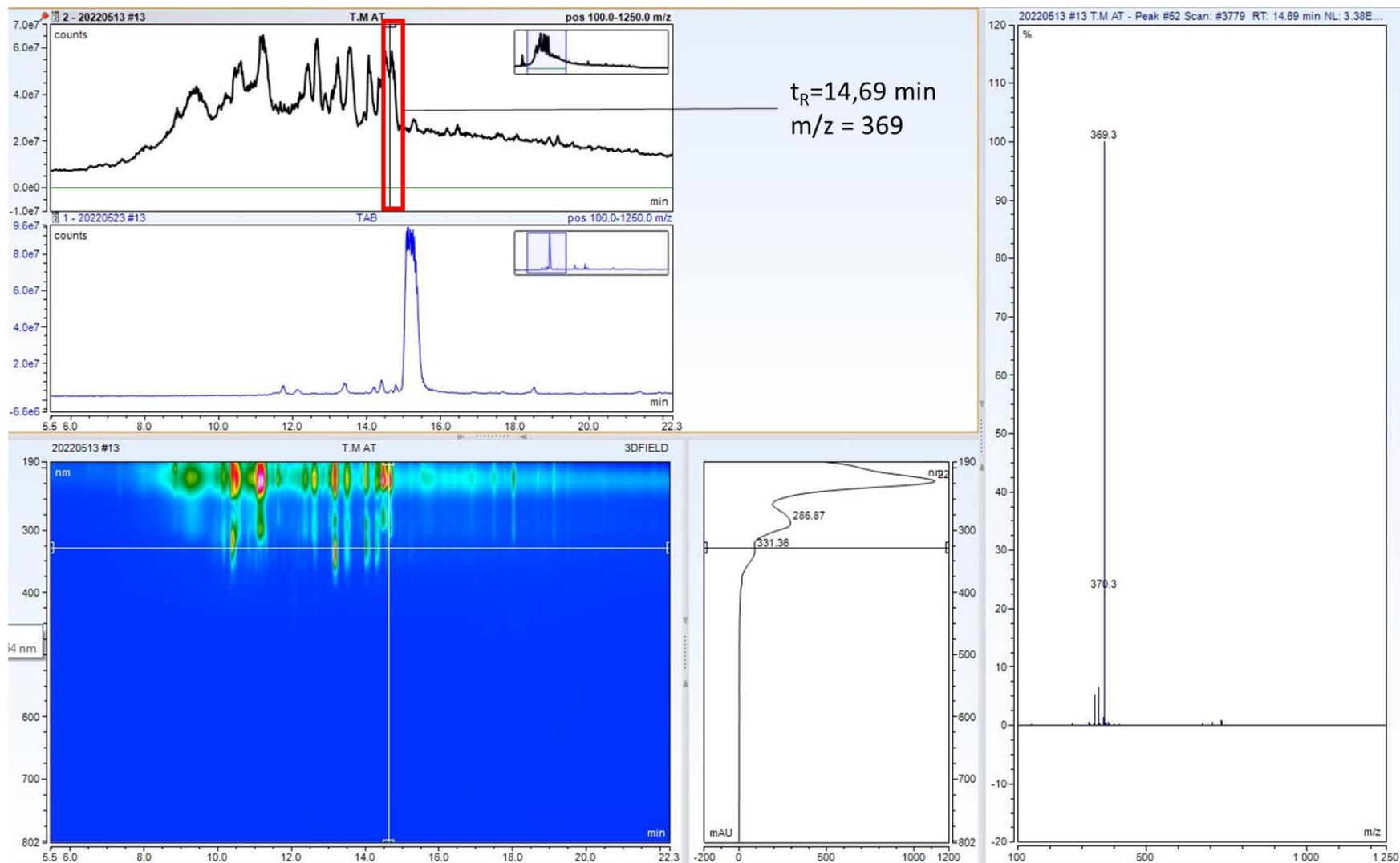


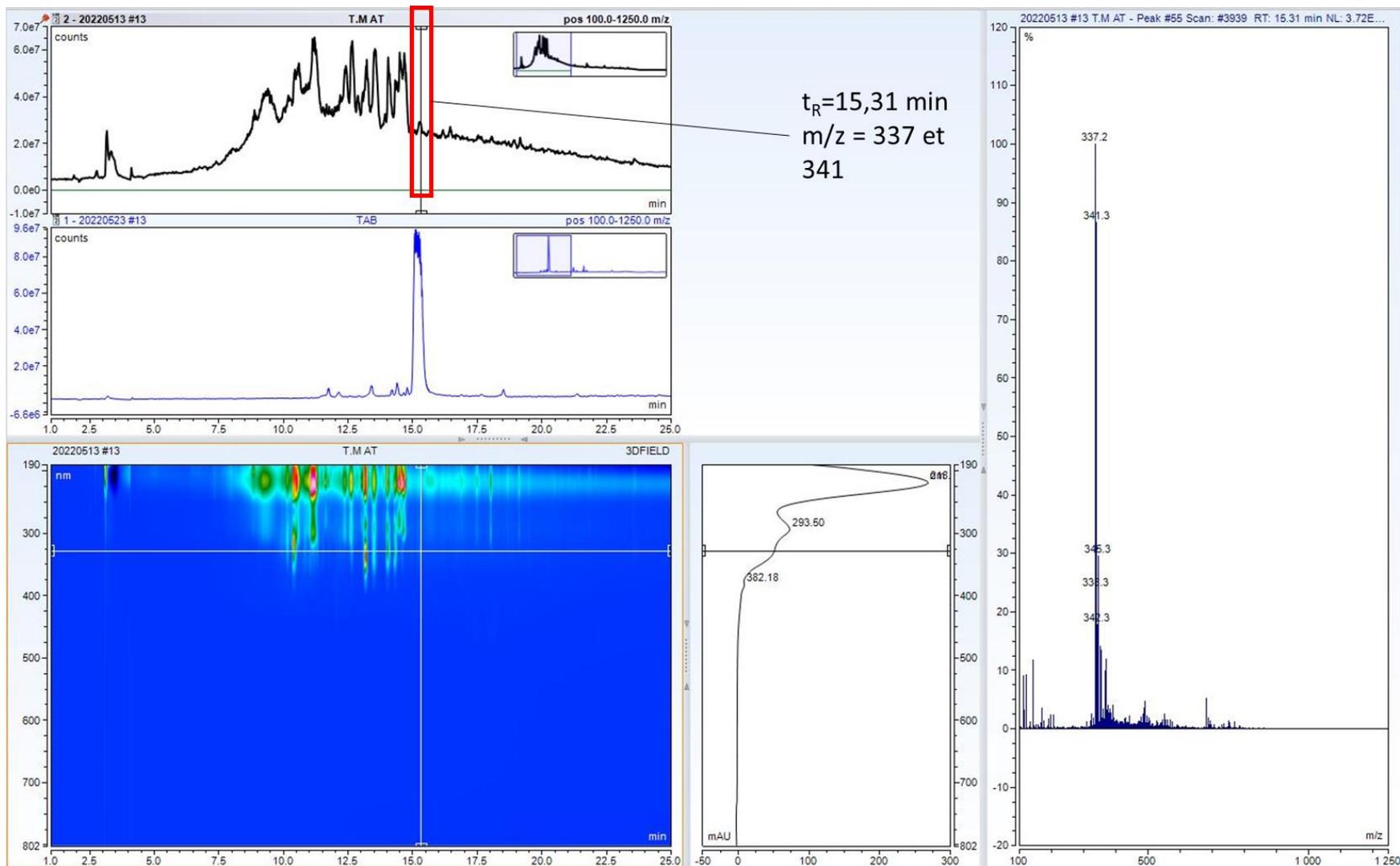












## Références

- [1] Tewari A, Tiwari S. Synthesis of medicinal agents from plants. 2018. ISBN : 978-0-08-102071-5.
- [2] Trivedi J, Tripathi A, Chattopadhyay D, Mitra D. Chapter 11 - Plant-Derived Molecules in Managing HIV Infection. In: Ahmad Khan MS, Ahmad I, Chattopadhyay D, editors. *New Look to Phytomedicine*, Academic Press; 2019, p. 273–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814619-4.00011-2>.
- [3] Cui W, Iwasa K, Tokuda H, Kashihara A, Mitani Y, Hasegawa T, et al. Potential cancer chemopreventive activity of simple isoquinolines, 1-benzylisoquinolines, and protoberberines. *Phytochemistry* 2006;67:70–9. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.10.007>.
- [4] Yun K-J, Shin J-S, Choi J-H, Back N-I, Chung H-G, Lee K-T. Quaternary alkaloid, pseudocoptisine isolated from tubers of *Corydalis turtchaninovi* inhibits LPS-induced nitric oxide, PGE(2), and pro-inflammatory cytokines production via the down-regulation of NF-kappaB in RAW 264.7 murine macrophage cells. *Int Immunopharmacol* 2009;9:1323–31. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2009.08.001>.
- [5] Li P, Lv B, Jiang X, Wang T, Ma X, Chang N, et al. Identification of NF-κB inhibitors following Shenfu injection and bioactivity-integrated UPLC/Q-TOF-MS and screening for related anti-inflammatory targets in vitro and in silico. *Journal of Ethnopharmacology* 2016;194:658–67. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.10.052>.
- [6] Kim S-H, Hong J, Lee Y-C. Chelidonine, a principal isoquinoline alkaloid of *Chelidonium majus*, attenuates eosinophilic airway inflammation by suppressing IL-4 and eotaxin-2 expression in asthmatic mice. *Pharmacological Reports* 2015;67:1168–77. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.04.013>.
- [7] Shi D, Chen M, Liu L, Wang Q, Liu S, Wang L, et al. Anti-influenza A virus mechanism of three representative compounds from *Flos Trollii* via TLRs signaling pathways. *Journal of Ethnopharmacology* 2020;253:112634. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112634>.
- [8] Cheng P, Ma Y, Yao S, Zhang Q, Wang E, Yan M, et al. Two new alkaloids and active anti-hepatitis B virus constituents from *Hypserpa nitida*. *Bioorg Med Chem Lett* 2007;17:5316–20. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.08.027>.
- [9] Xie Q, Wu G-Z, Yang N, Shen Y-H, Tang J, Zhang W-D. Delavatine A, an unusual isoquinoline alkaloid exerts anti-inflammation on LPS-induced proinflammatory cytokines production by suppressing NF-κB activation in BV-2 microglia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2018;502:202–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.144>.
- [10] Du RH, Li EG, Cao Y, Song YC, Tan RX. Fumigaclavine C inhibits tumor necrosis factor α production via suppression of toll-like receptor 4 and nuclear factor κB activation in macrophages. *Life Sciences* 2011;89:235–40. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.06.015>.
- [11] White EL, Chao W, Ross LJ, Borhani DW, Hobbs PD, Upender V, et al. Michellamine Alkaloids Inhibit Protein Kinase C. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1999;365:25–30. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1145>.
- [12] Lin GD, Li RW. *Natural Products Targeting Inflammation Processes and Multiple Mediators*. *Natural Products and Drug Discovery*, Elsevier; 2018, p. 277–308. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102081-4.00010-1>.
- [13] Varghese FS, Thaa B, Amrun SN, Simarmata D, Rausalu K, Nyman TA, et al. The Antiviral Alkaloid Berberine Reduces Chikungunya Virus-Induced Mitogen-Activated

- Protein Kinase Signaling. *J Virol* 2016;90:9743–57. <https://doi.org/10.1128/JVI.01382-16>.
- [14] Hung T-C, Jassey A, Liu C-H, Lin C-J, Lin C-C, Wong SH, et al. Berberine inhibits hepatitis C virus entry by targeting the viral E2 glycoprotein. *Phytomedicine* 2019;53:62–9. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.09.025>.
- [15] Shin H-B, Choi M-S, Yi C-M, Lee J, Kim N-J, Inn K-S. Inhibition of respiratory syncytial virus replication and virus-induced p38 kinase activity by berberine. *International Immunopharmacology* 2015;27:65–8. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.04.045>.
- [16] Lukanini A, Mercorelli B, Messa L, Palù G, Gribaudo G, Loregian A. The isoquinoline alkaloid berberine inhibits human cytomegalovirus replication by interfering with the viral Immediate Early-2 (IE2) protein transactivating activity. *Antiviral Research* 2019;164:52–60. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.02.006>.
- [17] Varghese FS, Kaukinen P, Gläsker S, Bepalov M, Hanski L, Wennerberg K, et al. Discovery of berberine, abamectin and ivermectin as antivirals against chikungunya and other alphaviruses. *Antiviral Research* 2016;126:117–24. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.12.012>.
- [18] Bodiwala HS, Sabde S, Mitra D, Bhutani KK, Singh IP. Synthesis of 9-substituted derivatives of berberine as anti-HIV agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2011;46:1045–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.01.016>.
- [19] Cecil CE, Davis JM, Cech NB, Laster SM. Inhibition of H1N1 influenza A virus growth and induction of inflammatory mediators by the isoquinoline alkaloid berberine and extracts of goldenseal (*Hydrastis canadensis*). *International Immunopharmacology* 2011;11:1706–14. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.06.002>.
- [20] Chin LW, Cheng Y-W, Lin S-S, Lai Y-Y, Lin L-Y, Chou M-Y, et al. Anti-herpes simplex virus effects of berberine from *Coptidis rhizoma*, a major component of a Chinese herbal medicine, Ching-Wei-San. *Arch Virol* 2010;155:1933–41. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0779-9>.
- [21] Hayashi K, Minoda K, Nagaoka Y, Hayashi T, Uesato S. Antiviral activity of berberine and related compounds against human cytomegalovirus. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2007;17:1562–4. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.12.085>.
- [22] Lin J-P, Yang J-S, Wu C-C, Lin S-S, Hsieh W-T, Lin M-L, et al. Berberine Induced Down-regulation of Matrix Metalloproteinase-1, -2 and -9 in Human Gastric Cancer Cells (SNU-5) In Vitro. *In Vivo* 2008;9.
- [23] Mantena SK, Sharma SD, Katiyar SK. RETRACTED: Berberine inhibits growth, induces G1arrest and apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells by regulating Cdk1–Cdk-cyclin cascade, disruption of mitochondrial membrane potential and cleavage of caspase 3 and PARP. *Carcinogenesis* 2006;27:2018–27. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl043>.
- [24] Fukuda K, Hibiya Y, Mutoh M, Koshiji M, Akao S, Fujiwara H. Inhibition by berberine of cyclooxygenase-2 transcriptional activity in human colon cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology* 1999;66:227–33. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00162-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00162-7).
- [25] Jabbarzadeh Kaboli P, Leong MP-Y, Ismail P, Ling K-H. Antitumor effects of berberine against EGFR, ERK1/2, P38 and AKT in MDA-MB231 and MCF-7 breast cancer cells using molecular modelling and in vitro study. *Pharmacological Reports* 2019;71:13–23. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2018.07.005>.
- [26] Li L, Wang X, Sharvan R, Gao J, Qu S. Berberine could inhibit thyroid carcinoma cells by inducing mitochondrial apoptosis, G0/G1 cell cycle arrest and suppressing migration via PI3K-AKT and MAPK signaling pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017;95:1225–31. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.010>.

- [27] Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK, Patil BS. The natural alkaloid berberine targets multiple pathways to induce cell death in cultured human colon cancer cells. *European Journal of Pharmacology* 2012;688:14–21. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.05.004>.
- [28] Kuo C-L, Chi C-W, Liu T-Y. The anti-inflammatory potential of berberine in vitro and in vivo. *Cancer Letters* 2004;203:127–37. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2003.09.002>.
- [29] Sujitha S, Dinesh P, Rasool M. Berberine modulates ASK1 signaling mediated through TLR4/TRAF2 via upregulation of miR-23a. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2018;359:34–46. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.09.017>.
- [30] Wang Z, Chen Z, Yang S, Wang Y, Huang Z, Gao J, et al. Berberine Ameliorates Collagen-Induced Arthritis in Rats Associated with Anti-inflammatory and Anti-angiogenic Effects. *Inflammation* 2014;37:1789–98. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9909-y>.
- [31] Hu J-P, Nishishita K, Sakai E, Yoshida H, Kato Y, Tsukuba T, et al. Berberine inhibits RANKL-induced osteoclast formation and survival through suppressing the NF- $\kappa$ B and Akt pathways. *European Journal of Pharmacology* 2008;580:70–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.11.013>.
- [32] Wang X, He X, Zhang C-F, Guo C-R, Wang C-Z, Yuan C-S. Anti-arthritic effect of berberine on adjuvant-induced rheumatoid arthritis in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017;89:887–93. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.099>.
- [33] Dinesh P, Rasool M. Berberine, an isoquinoline alkaloid suppresses TXNIP mediated NLRP3 inflammasome activation in MSU crystal stimulated RAW 264.7 macrophages through the upregulation of Nrf2 transcription factor and alleviates MSU crystal induced inflammation in rats. *International Immunopharmacology* 2017;44:26–37. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.12.031>.
- [34] Caliceti C, Rizzo P, Ferrari R, Fortini F, Aquila G, Leoncini E, et al. Novel role of the nutraceutical bioactive compound berberine in lectin-like OxLDL receptor 1-mediated endothelial dysfunction in comparison to lovastatin. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2017;27:552–63. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2017.04.002>.
- [35] Cao S-Y, Ye S-J, Wang W-W, Wang B, Zhang T, Pu Y-Q. Progress in active compounds effective on ulcerative colitis from Chinese medicines. *Chinese Journal of Natural Medicines* 2019;17:81–102. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(19\)30012-3](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(19)30012-3).
- [36] Li H, Fan C, Lu H, Feng C, He P, Yang X, et al. Protective role of berberine on ulcerative colitis through modulating enteric glial cells-intestinal epithelial cells-immune cells interactions. *Acta Pharm Sin B* 2020;10:447–61. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.08.006>.
- [37] Chueh W-H, Lin J-Y. Protective effect of isoquinoline alkaloid berberine on spontaneous inflammation in the spleen, liver and kidney of non-obese diabetic mice through downregulating gene expression ratios of pro-/anti-inflammatory and Th1/Th2 cytokines. *Food Chemistry* 2012;131:1263–71. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.116>.
- [38] Saha SK, Khuda-Bukhsh AR. Berberine alters epigenetic modifications, disrupts microtubule network, and modulates HPV-18 E6–E7 oncoproteins by targeting p53 in cervical cancer cell HeLa: A mechanistic study including molecular docking. *European Journal of Pharmacology* 2014;744:132–46. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.09.048>.
- [39] Dinesh P, Rasool M. Berberine inhibits IL-21/IL-21R mediated inflammatory proliferation of fibroblast-like synoviocytes through the attenuation of PI3K/Akt

- signaling pathway and ameliorates IL-21 mediated osteoclastogenesis. *Cytokine* 2018;106:54–66. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.03.005>.
- [40] Zhou Y, Ming J, Deng M, Li Y, Li B, Li J, et al. Berberine-mediated up-regulation of surfactant protein D facilitates cartilage repair by modulating immune responses via the inhibition of TLR4/NF- $\kappa$ B signaling. *Pharmacological Research* 2020;155:104690. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104690>.
- [41] Beba M, Djafarian K, Shab-Bidar S. Effect of Berberine on C-reactive protein: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Complementary Therapies in Medicine* 2019;46:81–6. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2019.08.002>.
- [42] Lee C-H, Chen J-C, Hsiang C-Y, Wu S-L, Wu H-C, Ho T-Y. Berberine suppresses inflammatory agents-induced interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  productions via the inhibition of IkappaB degradation in human lung cells. *Pharmacol Res* 2007;56:193–201. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.06.003>.
- [43] Kumar R, Awasthi M, Sharma A, Padwad Y, Sharma R. Berberine induces dose-dependent quiescence and apoptosis in A549 cancer cells by modulating cell cyclins and inflammation independent of mTOR pathway. *Life Sciences* 2020;244:117346. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117346>.
- [44] Ye L, Liang S, Guo C, Yu X, Zhao J, Zhang H, et al. Inhibition of M1 macrophage activation in adipose tissue by berberine improves insulin resistance. *Life Sci* 2016;166:82–91. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.09.025>.
- [45] Mahalanobish S, Saha S, Dutta S, Ghosh S, Sil PC. Chapter 3 - Anti-inflammatory efficacy of some potentially bioactive natural products against rheumatoid arthritis. In: Brahmachari G, editor. *Discovery and Development of Anti-Inflammatory Agents from Natural Products*, Elsevier; 2019, p. 61–100. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816992-6.00003-6>.
- [46] Ho Y-J, Lu J-W, Huang Y-L, Lai Z-Z. Palmatine inhibits Zika virus infection by disrupting virus binding, entry, and stability. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2019;518:732–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.08.120>.
- [47] Ng TB, Huang B, Fong WP, Yeung HW. Anti-human immunodeficiency virus (anti-HIV) natural products with special emphasis on HIV reverse transcriptase inhibitors. *Life Sci* 1997;61:933–49. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(97\)00245-2](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(97)00245-2).
- [48] Guo J, Wang S-B, Yuan T-Y, Wu Y-J, Yan Y, Li L, et al. Coptisine protects rat heart against myocardial ischemia/reperfusion injury by suppressing myocardial apoptosis and inflammation. *Atherosclerosis* 2013;231:384–91. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.10.003>.
- [49] Luo Y, Wei Z, Chou G, Wang Z, Xia Y, Dai Y. Norisoboldine induces apoptosis of fibroblast-like synoviocytes from adjuvant-induced arthritis rats. *International Immunopharmacology* 2014;20:110–6. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.02.023>.
- [50] Heidari R, Moezi L, Asadi B, Ommati MM, Azarpira N. Hepatoprotective effect of boldine in a bile duct ligated rat model of cholestasis/cirrhosis. *PharmaNutrition* 2017;5:109–17. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2017.07.001>.
- [51] Ivanovska N, Philipov S, Georgieva P. Immunopharmacological activity of aporphinoid alkaloid oxoglucine. *Pharmacological Research* 1997;35:267–72. <https://doi.org/10.1006/phrs.1996.9994>.
- [52] Wang M-X, Liu Y-L, Yang Y, Zhang D-M, Kong L-D. Nuciferine restores potassium oxonate-induced hyperuricemia and kidney inflammation in mice. *Eur J Pharmacol* 2015;747:59–70. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.11.035>.
- [53] Gu J-Q, Kinghorn AD. Bioactive Constituents of the Genus *Hernandia*. In: Atta-ur-Rahman, editor. *Studies in Natural Products Chemistry*, vol. 30, Elsevier; 2005, p. 559–602. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(05\)80042-0](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(05)80042-0).

- [54] Yi L, Lyn Y, Peng C, Zhu R, Bai S, Liu L, et al. Sinomenine inhibits fibroblast-like synoviocyte proliferation by regulating  $\alpha 7$ nAChR expression via ERK/Egr-1 pathway. *International Immunopharmacology* 2018;56:65–70. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.01.015>.
- [55] Kok TW, Yue PYK, Mak NK, Fan TPD, Liu L, Wong RNS. The Anti-Angiogenic Effect of Sinomenine. *Angiogenesis* 2005;8:3–12. <https://doi.org/10.1007/s10456-005-2892-z>.
- [56] Liu L, Buchner E, Beitze D, Schmidt-Weber CB, Kaever V, Emmrich F, et al. Amelioration of rat experimental arthritides by treatment with the alkaloid sinomenine. *International Journal of Immunopharmacology* 1996;18:529–43. [https://doi.org/10.1016/S0192-0561\(96\)00025-2](https://doi.org/10.1016/S0192-0561(96)00025-2).
- [57] Gao T, Shi T, Wiesenfeld-Hallin Z, Svensson CI, Xu X-J. Sinomenine alleviates mechanical hypersensitivity in mice with experimentally induced rheumatoid arthritis. *Scandinavian Journal of Pain* 2015;7:9–14. <https://doi.org/10.1016/j.sjpain.2014.12.003>.
- [58] Qin T, Yin S, Yang J, Zhang Q, Liu Y, Huang F, et al. Sinomenine attenuates renal fibrosis through Nrf2-mediated inhibition of oxidative stress and TGF $\beta$  signaling. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2016;304:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.05.009>.
- [59] He L, Duan H, Li X, Wang S, Zhang Y, Lei L, et al. Sinomenine down-regulates TLR4/TRAF6 expression and attenuates lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis and osteolysis. *European Journal of Pharmacology* 2016;779:66–79. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.03.014>.
- [60] Gu B, Zeng Y, Yin C, Wang H, Yang X, Wang S, et al. Sinomenine reduces iNOS expression via inhibiting the T-bet IFN- $\gamma$  pathway in experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. *J Biomed Res* 2012;26:448–55. <https://doi.org/10.7555/JBR.26.20110114>.
- [61] Li XJ, Yue PYK, Ha WY, Wong DYL, Tin MMY, Wang PX, et al. Effect of sinomenine on gene expression of the IL-1 beta-activated human synovial sarcoma. *Life Sci* 2006;79:665–73. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.02.014>.
- [62] Gao T, Hao J, Wiesenfeld-Hallin Z, Wang D-Q, Xu X-J. Analgesic effect of sinomenine in rodents after inflammation and nerve injury. *Eur J Pharmacol* 2013;721:5–11. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.09.062>.
- [63] Hu Y, Mao A, Yu Z, He K. Anti-endotoxin and anti-inflammatory effects of Chinese herbal medicinal alkaloid ingredients in vivo. *Microbial Pathogenesis* 2016;99:51–5. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.006>.
- [64] Bezerra-Santos CR, Vieira-de-Abreu A, Barbosa-Filho JM, Bandeira-Melo C, Piuvezam MR, Bozza PT. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. *International Immunopharmacology* 2006;6:1152–60. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2006.02.007>.
- [65] Vieira GC, Gadelha FAAF, Pereira RF, Ferreira LKDP, Barbosa-Filho JM, Bozza PT, et al. Warifteine, an alkaloid of *Cissampelos sympodialis*, modulates allergic profile in a chronic allergic rhinitis model. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2018;28:50–6. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.10.009>.
- [66] Souto AL, Tavares JF, da Silva MS, Diniz M de FFM, de Athayde-Filho PF, Filho JMB. Anti-Inflammatory Activity of Alkaloids: An Update from 2000 to 2010. *Molecules* 2011;16:8515–34. <https://doi.org/10.3390/molecules16108515>.
- [67] Li H, Chen W, Chen Y, Zhou Q, Xiao P, Tang R, et al. Neferine Attenuates Acute Kidney Injury by Inhibiting NF- $\kappa$ B Signaling and Upregulating Klotho Expression. *Frontiers in Pharmacology* 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01197>.
- [68] Zhang X, Liu Z, Xu B, Sun Z, Gong Y, Shao C. Neferine, an alkaloid ingredient in lotus seed embryo, inhibits proliferation of human osteosarcoma cells by promoting p38

- MAPK-mediated p21 stabilization. *European Journal of Pharmacology* 2012;677:47–54. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.12.035>.
- [69] Yoon J-S, Kim H-M, Yadunandam AK, Kim N-H, Jung H-A, Choi J-S, et al. Neferine isolated from *Nelumbo nucifera* enhances anti-cancer activities in Hep3B cells: Molecular mechanisms of cell cycle arrest, ER stress induced apoptosis and anti-angiogenic response. *Phytomedicine* 2013;20:1013–22. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.03.024>.
- [70] Baskaran R, Priya LB, Kalaiselvi P, Poornima P, Huang C-Y, Padma VV. Neferine from *Nelumbo nucifera* modulates oxidative stress and cytokines production during hypoxia in human peripheral blood mononuclear cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017;93:730–6. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.003>.
- [71] Whitehouse MW, Fairlie DP, Thong YH. Anti-inflammatory activity of the isoquinoline alkaloid, tetrandrine, against established adjuvant arthritis in rats. *Agents and Actions* 1994;42:123–7. <https://doi.org/10.1007/BF01983477>.
- [72] Bao G, Li C, Qi L, Wang N, He B. Tetrandrine protects against oxygen-glucose-serum deprivation/reoxygenation-induced injury via PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B signaling pathway in rat spinal cord astrocytes. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2016;84:925–30. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.007>.
- [73] Wu C-J, Wang Y-H, Lin C-J, Chen H-H, Chen Y-J. Tetrandrine down-regulates ERK/NF- $\kappa$ B signaling and inhibits activation of mesangial cells. *Toxicology in Vitro* 2011;25:1834–40. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.09.024>.
- [74] Wu J-M, Chen Y, Chen J-C, Lin T-Y, Tseng S-H. Tetrandrine induces apoptosis and growth suppression of colon cancer cells in mice. *Cancer Letters* 2010;287:187–95. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.06.009>.
- [75] Xu W, Wang X, Tu Y, Masaki H, Tanaka S, Onda K, et al. Tetrandrine and cepharanthine induce apoptosis through caspase cascade regulation, cell cycle arrest, MAPK activation and PI3K/Akt/mTOR signal modification in glucocorticoid resistant human leukemia Jurkat T cells. *Chemico-Biological Interactions* 2019;310:108726. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108726>.
- [76] Okamoto M, Ono M, Baba M. Suppression of cytokine production and neural cell death by the anti-inflammatory alkaloid cepharanthine: a potential agent against HIV-1 encephalopathy. *Biochemical Pharmacology* 2001;62:747–53. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(01\)00692-X](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00692-X).
- [77] Huang H, Hu G, Wang C, Xu H, Chen X, Qian A. Cepharanthine, an Alkaloid from *Stephania cepharantha* Hayata, Inhibits the Inflammatory Response in the RAW264.7 Cell and Mouse Models. *Inflammation* 2014;37:235–46. <https://doi.org/10.1007/s10753-013-9734-8>.
- [78] Azuma M, Aota K, Tamatani T, Motegi K, Yamashita T, Ashida Y, et al. Suppression of tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced matrix metalloproteinase 9 production in human salivary gland acinar cells by cepharanthine occurs via down-regulation of nuclear factor  $\kappa$ B: A possible therapeutic agent for preventing the destruction of the acinar structure in the salivary glands of Sjögren's syndrome patients. *Arthritis & Rheumatism* 2002;46:1585–94. <https://doi.org/10.1002/art.10315>.
- [79] Biswas KK, Tancharon S, Sarker KP, Kawahara K, Hashiguchi T, Maruyama I. Cepharanthine triggers apoptosis in a human hepatocellular carcinoma cell line (HuH-7) through the activation of JNK1/2 and the downregulation of Akt. *FEBS Letters* 2006;580:703–10. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.12.048>.
- [80] Wu J, Suzuki H, Akhand AA, Zhou Y-W, Hossain K, Nakashima I. Modes of activation of mitogen-activated protein kinases and their roles in cepharanthine-induced apoptosis

- in human leukemia cells. *Cellular Signalling* 2002;14:509–15. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(01\)00278-9](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(01)00278-9).
- [81] Paudel KR, Karki R, Kim D-W. Cepharanthine inhibits in vitro VSMC proliferation and migration and vascular inflammatory responses mediated by RAW264.7. *Toxicology in Vitro* 2016;34:16–25. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.03.010>.
- [82] Uto T, Nishi Y, Toyama M, Yoshinaga K, Baba M. Inhibitory effect of cepharanthine on dendritic cell activation and function. *International Immunopharmacology* 2011;11:1932–8. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.08.003>.
- [83] Bailly C. Cepharanthine: An update of its mode of action, pharmacological properties and medical applications. *Phytomedicine* 2019;62:152956. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152956>.
- [84] Zhou Y-B, Wang Y-F, Zhang Y, Zheng L-Y, Yang X-A, Wang N, et al. In vitro activity of cepharanthine hydrochloride against clinical wild-type and lamivudine-resistant hepatitis B virus isolates. *European Journal of Pharmacology* 2012;683:10–5. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.02.030>.
- [85] Lai Z-Z, Ho Y-J, Lu J-W. Cephalotaxine inhibits Zika infection by impeding viral replication and stability. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2020;522:1052–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.12.012>.
- [86] Kaur P, Thiruchelvan M, Lee RCH, Chen H, Chen KC, Ng ML, et al. Inhibition of Chikungunya Virus Replication by Harringtonine, a Novel Antiviral That Suppresses Viral Protein Expression. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013;57:155–67. <https://doi.org/10.1128/AAC.01467-12>.
- [87] Baguley BC, Holdaway KM, Thomsen LL, Zhuang L, Jonathan Zwi L. Inhibition of growth of colon 38 adenocarcinoma by vinblastine and colchicine: Evidence for a vascular mechanism. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* 1991;27:482–7. [https://doi.org/10.1016/0277-5379\(91\)90391-P](https://doi.org/10.1016/0277-5379(91)90391-P).
- [88] Barbosa-Filho JM, Piuvezam MR, Moura MD, Silva MS, Lima KVB, da-Cunha EVL, et al. Anti-inflammatory activity of alkaloids: a twenty-century review. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2006;16:109–39. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000100020>.
- [89] Slobodnick A, Shah B, Krasnokutsky S, Pillinger MH. Update on colchicine, 2017. *Rheumatology (Oxford)* 2018;57:i4–11. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex453>.
- [90] Peduto A, Filosa R, de Caprariis P, De Feo V, Li S, Wang P, et al. Chapter 4 - 1-Methoxy-Canthin-6-One and Related  $\beta$ -Carbolines: From Natural Compound to Synthesis and Biological Activities. In: Atta-ur-Rahman, editor. *Studies in Natural Products Chemistry*, vol. 38, Elsevier; 2012, p. 81–104. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59530-0.00004-6>.
- [91] Wang X-F, Li H, Jiang K, Wang Q-Q, Zheng Y-H, Tang W, et al. Anti-inflammatory constituents from *Perilla frutescens* on lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *Fitoterapia* 2018;130:61–5. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.08.006>.
- [92] Park Y-K, Lee T-Y, Choi J-S, Hong VS, Lee J, Park J-W, et al. Inhibition of adipogenesis and leptin production in 3T3-L1 adipocytes by a derivative of meridianin C. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2014;452:1078–83. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.09.050>.
- [93] Ramu A, Kathiresan S, Ramadoss H, Nallu A, Kaliyan R, Azamuthu T. Gramine attenuates EGFR-mediated inflammation and cell proliferation in oral carcinogenesis via regulation of NF- $\kappa$ B and STAT3 signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2018;98:523–30. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.049>.

- [94] Renard-Nozaki J, Kim T, Imakura Y, Kihara M, Kobayashi S. Effect of alkaloids isolated from Amaryllidaceae on herpes simplex virus. *Research in Virology* 1989;140:115–28. [https://doi.org/10.1016/S0923-2516\(89\)80089-5](https://doi.org/10.1016/S0923-2516(89)80089-5).
- [95] Dewapriya P, Li Y-X, Himaya SWA, Pangestuti R, Kim S-K. Neoechinulin A suppresses amyloid- $\beta$  oligomer-induced microglia activation and thereby protects PC-12 cells from inflammation-mediated toxicity. *NeuroToxicology* 2013;35:30–40. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.12.004>.
- [96] Zhang D, Li X, Hu Y, Jiang H, Wu Y, Ding Y, et al. Tabersonine attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via suppressing TRAF6 ubiquitination. *Biochemical Pharmacology* 2018;154:183–92. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.05.004>.
- [97] Kelly DC, Avery RJ, Dimmock NJ. Camptothecin: an Inhibitor of Influenza Virus Replication. *Journal of General Virology* 1974;25:427–32. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-25-3-427>.
- [98] Priel E, Showalter SD, Blair DG. Inhibition of Human Immunodeficiency Virus (HTV-1) Replication In Vitro by Noncytotoxic Doses of Camptothecin, a Topoisomerase I Inhibitor. *AIDS Research and Human Retroviruses* 1991;7:65–72. <https://doi.org/10.1089/aid.1991.7.65>.
- [99] Priel E, Aflalo E, Chechelnitzky G, Benharroch D, Aboud M, Segal S. Inhibition of retrovirus-induced disease in mice by camptothecin. *J Virol* 1993;67:3624–9.
- [100] Nukuzuma S, Nukuzuma C, Kameoka M, Sugiura S, Nakamichi K, Tasaki T, et al. CPT11 prevents virus replication in JCI cells persistently infected with JC polyomavirus. *Microbiology and Immunology* 2017;61:232–8. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12486>.
- [101] Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. Natural Products (Secondary Metabolites). *Natural Products* 2003:69.
- [102] Thawabteh A, Juma S, Bader M, Karaman D, Scrano L, Bufo SA, et al. The Biological Activity of Natural Alkaloids against Herbivores, Cancerous Cells and Pathogens. *Toxins* 2019;11:656. <https://doi.org/10.3390/toxins11110656>.
- [103] Kainsa S, Kumar P, Rani P. Medicinal Plants of Asian Origin Having Anticancer Potential: Short Review. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 2012;2:7.
- [104] Rojas-Duran R, González-Aspajo G, Ruiz-Martel C, Bourdy G, Doroteo-Ortega VH, Alban-Castillo J, et al. Anti-inflammatory activity of Mitraphylline isolated from *Uncaria tomentosa* bark. *Journal of Ethnopharmacology* 2012;143:801–4. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.015>.
- [105] Currais A, Chiruta C, Goujon-Svrzic M, Costa G, Santos T, Batista MT, et al. Screening and identification of neuroprotective compounds relevant to Alzheimer's disease from medicinal plants of S. Tomé e Príncipe. *J Ethnopharmacol* 2014;155:830–40. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.06.046>.
- [106] Chen Q, Liu J, Zhuang Y, Bai L, Yuan Q, Zheng S, et al. Identification of an IKK $\beta$  inhibitor for inhibition of inflammation in vivo and in vitro. *Pharmacological Research* 2019;149:104440. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104440>.
- [107] Kim JY, Lee SG, Chung J-Y, Kim Y-J, Park J-E, Koh H, et al. Ellipticine induces apoptosis in human endometrial cancer cells: The potential involvement of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinases. *Toxicology* 2011;289:91–102. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.07.014>.
- [108] Zhu M, Liu H, Sun K, Liu J, Mou Y, Qi D, et al. Vinpocetine inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis and attenuates ovariectomy-induced bone loss. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2020;123:109769. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109769>.

- [109] Agrawal SS, Saraswati S, Mathur R, Pandey M. Brucine, a plant derived alkaloid inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. *Biomedicine & Preventive Nutrition* 2011;1:180–5. <https://doi.org/10.1016/j.bionut.2011.06.014>.
- [110] Yin W, Wang T-S, Yin F-Z, Cai B-C. Analgesic and anti-inflammatory properties of brucine and brucine N-oxide extracted from seeds of *Strychnos nux-vomica*. *Journal of Ethnopharmacology* 2003;88:205–14. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00224-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00224-1).
- [111] Zhang L, Zhang C-J, Zhang D-B, Wen J, Zhao X-W, Li Y, et al. An unusual indole alkaloid with anti-adenovirus and anti-HSV activities from *Alstonia scholaris*. *Tetrahedron Letters* 2014;55:1815–7. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.01.122>.
- [112] Cui Y, Jiang L, Yu R, Shao Y, Mei L, Tao Y.  $\beta$ -carboline alkaloids attenuate bleomycin induced pulmonary fibrosis in mice through inhibiting NF- $\kappa$ B phosphorylation and epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Ethnopharmacology* 2019;243:112096. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112096>.
- [113] Chen D, Tian X, Zou X, Xu S, Wang H, Zheng N, et al. Harmine, a small molecule derived from natural sources, inhibits enterovirus 71 replication by targeting NF- $\kappa$ B pathway. *International Immunopharmacology* 2018;60:111–20. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.04.050>.
- [114] Bag P, Ojha D, Mukherjee H, Halder U, Mondal S, Biswas A, et al. A Dihydro-pyrido-indole potently inhibits HSV-1 infection by interfering the viral immediate early transcriptional events. *Antiviral Research* 2014;105. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.02.007>.
- [115] Yeh H-T, Tsai Y-S, Chen M-S, Li Y-Z, Lin W-C, Lee Y-R, et al. Flavopereirine induces cell cycle arrest and apoptosis via the AKT/p38 MAPK/ERK1/2 signaling pathway in human breast cancer cells. *European Journal of Pharmacology* 2019;863:172658. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172658>.
- [116] Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY, Han JW, et al. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two  $\beta$ -carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *European Journal of Pharmacology* 2000;406:301–9. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(00\)00680-4](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(00)00680-4).
- [117] Yang D, Li L, Qian S, Liu L. Evodiamine ameliorates liver fibrosis in rats via TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway. *J Nat Med* 2018;72:145–54. <https://doi.org/10.1007/s11418-017-1122-5>.
- [118] Chen Y, Cao N, Lv H, Zeng K, Yuan J, Guo X, et al. Anti-inflammatory and cytotoxic carbazole alkaloids from *Murraya kwangsiensis*. *Phytochemistry* 2020;170:112186. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112186>.
- [119] Chae H-J, Kang J-S, Byun J-O, Han K-S, Kim D-U, Oh S-M, et al. Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts. *Pharmacological Research* 2000;42:373–81. <https://doi.org/10.1006/phrs.2000.0700>.
- [120] Peet GW, Li J. IkappaB kinases alpha and beta show a random sequential kinetic mechanism and are inhibited by staurosporine and quercetin. *J Biol Chem* 1999;274:32655–61. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.46.32655>.
- [121] Ding P-L, Liao Z-X, Huang H, Zhou P, Chen D-F. (+)-12 $\alpha$ -Hydroxysophocarpine, a new quinolizidine alkaloid and related anti-HBV alkaloids from *Sophora flavescens*. *Bioorg Med Chem Lett* 2006;16:1231–5. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.11.073>.
- [122] Li W, Li Y, Zhao Y, Ren L. The protective effects of aloperine against ox-LDL-induced endothelial dysfunction and inflammation in HUVECs. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 2020;48:107–15. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1699816>.
- [123] Chen S, Jin Z, Dai L, Wu H, Wang J, Wang L, et al. Aloperine induces apoptosis and inhibits invasion in MG-63 and U2OS human osteosarcoma cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2018;97:45–52. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.066>.

- [124] Dang Z, Zhu L, Lai W, Bogerd H, Lee K-H, Huang L, et al. Aloperine and Its Derivatives as a New Class of HIV-1 Entry Inhibitors. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 2016;7:240–4. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.5b00339>.
- [125] Guo S, Gao C, Xiao W, Zhang J, Qu Y, Li J, et al. Matrine Protects Cardiomyocytes From Ischemia/Reperfusion Injury by Regulating HSP70 Expression Via Activation of the JAK2/STAT3 Pathway: SHOCK 2018;50:664–70. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001108>.
- [126] Zhao P, Zhou R, Zhu X-Y, Hao Y-J, Li N, Wang J, et al. Matrine attenuates focal cerebral ischemic injury by improving antioxidant activity and inhibiting apoptosis in mice. *Int J Mol Med* 2015;36:633–44. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2260>.
- [127] Zhang Y, Cui L, Guan G, Wang J, Qiu C, Yang T, et al. Matrine suppresses cardiac fibrosis by inhibiting the TGF- $\beta$ /Smad pathway in experimental diabetic cardiomyopathy. *Mol Med Rep* 2018;17:1775–81. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8054>.
- [128] Kan Q-C, Lv P, Zhang X-J, Xu Y-M, Zhang G-X, Zhu L. Matrine protects neuro-axon from CNS inflammation-induced injury. *Experimental and Molecular Pathology* 2015;98:124–30. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.01.001>.
- [129] Chen XS, Wang GJ, Cai X, Yu HY, Hu YP. Inhibition of hepatitis B virus by oxymatrine in vivo. *World J Gastroenterol* 2001;7:49–52. <https://doi.org/10.3748/wjg.v7.i1.49>.
- [130] Sang X, Wang R, Han Y, Zhang C, Shen H, Yang Z, et al. T cell-associated immunoregulation and antiviral effect of oxymatrine in hydrodynamic injection HBV mouse model. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2017;7:311–8. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.02.005>.
- [131] Lu L-G, Zeng M-D, Mao Y-M, Li J-Q, Wan M-B, Li C-Z, et al. Oxymatrine therapy for chronic hepatitis B: A randomized double-blind and placebo-controlled multi-center trial. *World J Gastroenterol* 2003;9:2480–3. <https://doi.org/10.3748/wjg.v9.i11.2480>.
- [132] Dai J-P, Wang Q-W, Su Y, Gu L-M, Deng H-X, Chen X-X, et al. Oxymatrine Inhibits Influenza A Virus Replication and Inflammation via TLR4, p38 MAPK and NF- $\kappa$ B Pathways. *International Journal of Molecular Sciences* 2018;19:965. <https://doi.org/10.3390/ijms19040965>.
- [133] Li W, Yu X, Tan S, Liu W, Zhou L, Liu H. Oxymatrine inhibits non-small cell lung cancer via suppression of EGFR signaling pathway. *Cancer Medicine* 2018;7:208–18. <https://doi.org/10.1002/cam4.1269>.
- [134] Benrui Lin BL, Dinuo Li DL, Lan Zhang LZ. Oxymatrine mediates Bax and Bcl-2 expression in human breast cancer MCF-7 cells. *Pharmazie* 2016;154–7. <https://doi.org/10.1691/ph.2016.5765>.
- [135] Zhang Y, Liu H, Jin J, Zhu X, Lu L, Jiang H. The role of endogenous reactive oxygen species in oxymatrine-induced caspase-3-dependent apoptosis in human melanoma A375 cells: *Anti-Cancer Drugs* 2010;21:494–501. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e328336e927>.
- [136] Wang Y, Zhang S, Liu J, Fang B, Yao J, Cheng B. Matrine inhibits the invasive and migratory properties of human hepatocellular carcinoma by regulating epithelial-mesenchymal transition. *Molecular Medicine Reports* 2018;18:911–9. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9023>.
- [137] Liang J, Chang B, Huang M, Huang W, Ma W, Liu Y, et al. Oxymatrine prevents synovial inflammation and migration via blocking NF- $\kappa$ B activation in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *International Immunopharmacology* 2018;55:105–11. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.12.006>.
- [138] Ma A, Yang Y, Wang Q, Wang Y, Wen J, Zhang Y. Anti-inflammatory effects of oxymatrine on rheumatoid arthritis in rats via regulating the imbalance between Treg and

- Th17 cells. *Molecular Medicine Reports* 2017;15:3615–22. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6484>.
- [139] Ge X-H, Shao L, Zhu G-J. Oxymatrine attenuates brain hypoxic-ischemic injury from apoptosis and oxidative stress: role of p-Akt/GSK3 $\beta$ /HO-1/Nrf-2 signaling pathway. *Metab Brain Dis* 2018;33:1869–75. <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0293-4>.
- [140] Zhao P, Zhou R, Li H-N, Yao W-X, Qiao H-Q, Wang S-J, et al. Oxymatrine attenuated hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats via improving antioxidant enzyme activities and inhibiting cell death. *Neurochemistry International* 2015;89:17–27. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.06.008>.
- [141] Zhang S, Wu J, Wang H, Wang T, Jin L, Shu D, et al. Liposomal Oxymatrine in Hepatic Fibrosis Treatment: Formulation, In Vitro and In Vivo Assessment. *AAPS PharmSciTech* 2014;15:620–9. <https://doi.org/10.1208/s12249-014-0086-y>.
- [142] Wu X-L, Zeng W-Z, Jiang M-D, Qin J-P, Xu H. Effect of Oxymatrine on the TGF $\beta$ -Smad signaling pathway in rats with CCl<sub>4</sub>-induced hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2008;14:2100–5. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.2100>.
- [143] Wu J, Pan L, Jin X, Li W, Li H, Chen J, et al. The role of oxymatrine in regulating TGF- $\beta$ 1 in rats with hepatic fibrosis. *Acta Cirurgica Brasileira* 2018;33:207–15. <https://doi.org/10.1590/s0102-865020180030000002>.
- [144] Xu Y, Xiao H, Luo H, Chen Y, Zhang Y, Tao L, et al. Inhibitory effects of oxymatrine on TGF- $\beta$ 1-induced proliferation and abnormal differentiation in rat cardiac fibroblasts via the p38MAPK and ERK1/2 signaling pathways. *Mol Med Rep* 2017;16:5354–62. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7277>.
- [145] Xu GL, Yao L, Rao SY, Gong ZN, Zhang SQ, Yu SQ. Attenuation of acute lung injury in mice by oxymatrine is associated with inhibition of phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase. *Journal of Ethnopharmacology* 2005;98:177–83. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.026>.
- [146] Yang Z, Yin R, Cong Y, Yang Z, Zhou E, Wei Z, et al. Oxymatrine Lightened the Inflammatory Response of LPS-Induced Mastitis in Mice Through Affecting NF- $\kappa$ B and MAPKs Signaling Pathways. *Inflammation* 2014;37:2047–55. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9937-7>.
- [147] Chen Q, Duan X, Fan H, Xu M, Tang Q, Zhang L, et al. Oxymatrine protects against DSS-induced colitis via inhibiting the PI3K/AKT signaling pathway. *Int Immunopharmacol* 2017;53:149–57. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.10.025>.
- [148] Gao Y, Jiang W, Dong C, Li C, Fu X, Min L, et al. Anti-inflammatory effects of sophocarpine in LPS-induced RAW 264.7 cells via NF- $\kappa$ B and MAPKs signaling pathways. *Toxicology in Vitro* 2012;26:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.09.019>.
- [149] Lu Y, Xu D, Liu J, Gu L. Protective effect of sophocarpine on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *International Immunopharmacology* 2019;70:180–6. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.02.020>.
- [150] Li C, Gao Y, Tian J, Shen J, Xing Y, Liu Z. Sophocarpine administration preserves myocardial function from ischemia-reperfusion in rats via NF- $\kappa$ B inactivation. *Journal of Ethnopharmacology* 2011;135:620–5. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.03.052>.
- [151] Chen J-X, Shen H-H, Niu M, Guo Y-M, Liu X-Q, Han Y-Z, et al. Anti-hepatitis B virus effect of matrine-type alkaloid and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and tumor necrosis factor receptor-associated factor 6. *Virus Research* 2016;215:104–13. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.12.005>.
- [152] Ren G, Ding G, Zhang H, Wang H, Jin Z, Yang G, et al. Antiviral activity of sophoridine against enterovirus 71 in vitro. *Journal of Ethnopharmacology* 2019;236:124–8. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.02.045>.

- [153] Cao M-M, Zhang J-H, Zhang Y, Peng Z-G, Jiang J-D, Hao X-J. New findings of cyclohexane-fused octahydroquinolizine alkaloids from *Myriophyllum faberi*. *Tetrahedron Letters* 2016;57:5632–5. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.11.001>.
- [154] Wu Y, Nie Y, Huang J, Qiu Y, Wan B, Liu G, et al. Protostemonine alleviates heat-killed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced acute lung injury through MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *International Immunopharmacology* 2019;77:105964. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105964>.
- [155] Song Y, Wu Y, Li X, Shen Y, Ding Y, Zhu H, et al. Protostemonine attenuates alternatively activated macrophage and DRA-induced asthmatic inflammation. *Biochemical Pharmacology* 2018;155:198–206. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.07.003>.
- [156] Fan X, Yang L, Liu Z, Lin L, Li C, Guo S, et al. Diterpenoid alkaloids from the whole plant of *Aconitum tanguticum* (Maxim.) Stapf. *Phytochemistry* 2019;160:71–7. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.11.008>.
- [157] Li J, Ren W, Huang X-J, Zou D-J, Hu X. Bullatine A, a diterpenoid alkaloid of the genus *Aconitum*, could attenuate ATP-induced BV-2 microglia death/apoptosis via P2X receptor pathways. *Brain Research Bulletin* 2013;97:81–5. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2013.05.015>.
- [158] Dumlu FA, Aydin T, Odabasoglu F, Berktaş OA, Kutlu Z, Erol HS, et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of jervine, a steroidal alkaloid from rhizomes of *Veratrum album*. *Phytomedicine* 2019;55:191–9. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.06.035>.
- [159] Liu S, Yang T, Ming TW, Gaun TKW, Zhou T, Wang S, et al. Isosteroid alkaloids with different chemical structures from *Fritillariae cirrhosae* bulbosae alleviate LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells by MAPK signaling pathway. *International Immunopharmacology* 2020;78:106047. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.106047>.
- [160] Pandurangan A, Khosa RL, Hemalatha S. Anti-inflammatory activity of an alkaloid from *Solanum trilobatum* on acute and chronic inflammation models. *Natural Product Research* 2011;25:1132–41. <https://doi.org/10.1080/14786410903370783>.
- [161] Li Q, Zhao Y-L, Long C-B, Zhu P-F, Liu Y-P, Luo X-D. Seven new veratramine-type alkaloids with potent analgesic effect from *Veratrum taliense*. *Journal of Ethnopharmacology* 2019;244:112137. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112137>.
- [162] Zhang HY, Zheng CY, Yan H, Wang ZF, Tang LL, Gao X, et al. Potential therapeutic targets of huperzine A for Alzheimer's disease and vascular dementia. *Chemico-Biological Interactions* 2008;175:396–402. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.04.049>.
- [163] Lindsay BS, Christiansen HC, Copp BR. Structural Studies of Cytotoxic Marine Alkaloids: Synthesis of Novel Ring-E Analogues of Ascidiemin and their in vitro and in vivo Biological Evaluation. *Tetrahedron* 2000;56:497–505. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(99\)01038-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(99)01038-8).
- [164] Yamamoto N, Furukawa H, Ito Y, Yoshida S, Maeno K, Nishiyama Y. Anti-herpesvirus activity of citrussinine-I, a new acridone alkaloid, and related compounds. *Antiviral Res* 1989;12:21–36. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(89\)90065-x](https://doi.org/10.1016/0166-3542(89)90065-x).
- [165] He S, Zhou Q, Luo B, Chen B, Li L, Yan F. Chloroquine and 3-Methyladenine Attenuates Periodontal Inflammation and Bone Loss in Experimental Periodontitis. *Inflammation* 2019. <https://doi.org/10.1007/s10753-019-01111-0>.
- [166] Oh S, Shin JH, Jang EJ, Won HY, Kim HK, Jeong M-G, et al. Anti-inflammatory activity of chloroquine and amodiaquine through p21-mediated suppression of T cell proliferation and Th1 cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;474:345–50. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.04.105>.

- [167] Olajide OA, Bhatia HS, de Oliveira ACP, Wright CW, Fiebich BL. Anti-neuroinflammatory properties of synthetic cryptolepine in human neuroblastoma cells: Possible involvement of NF- $\kappa$ B and p38 MAPK inhibition. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2013;63:333–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.02.004>.
- [168] Lu X, Pu Y, Kong W, Tang X, Zhou J, Gou H, et al. Antidesmone, a unique tetrahydroquinoline alkaloid, prevents acute lung injury via regulating MAPK and NF- $\kappa$ B activities. *International Immunopharmacology* 2017;45:34–42. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.01.026>.
- [169] Cao M-M, Zhang Y, Huang S-D, Peng Z-G, Jiang J-D, Hao X-J. Three new alkaloids from *Myrioneuron faberi*. *Tetrahedron Letters* 2016;57:4021–3. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.07.039>.
- [170] Ahmed N, Brahmhatt KG, Sabde S, Mitra D, Singh IP, Bhutani KK. Synthesis and anti-HIV activity of alkylated quinoline 2,4-diols. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2010;18:2872–9. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.03.015>.
- [171] Wang JY, Wang Z, Li MY, Zhang Z, Mi C, Zuo HX, et al. Dictamnine promotes apoptosis and inhibits epithelial-mesenchymal transition, migration, invasion and proliferation by downregulating the HIF-1 $\alpha$  and Slug signaling pathways. *Chemico-Biological Interactions* 2018;296:134–44. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.09.014>.
- [172] Chen Y, Ruan J, Sun F, Wang H, Yang S, Zhang Y, et al. Anti-inflammatory Limonoids From Cortex Dictamni. *Front Chem* 2020;8:73. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00073>.
- [173] Pan X, Han H, Wang L, Yang L, Li R, Li Z, et al. Nitidine Chloride inhibits breast cancer cells migration and invasion by suppressing c-Src/FAK associated signaling pathway. *Cancer Letters* 2011;313:181–91. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.09.001>.
- [174] Wang Z, Jiang W, Zhang Z, Qian M, Du B. Nitidine chloride inhibits LPS-induced inflammatory cytokines production via MAPK and NF-kappaB pathway in RAW 264.7 cells. *Journal of Ethnopharmacology* 2012;144:145–50. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.08.041>.
- [175] Jang B-C, Park J-G, Song D-K, Baek W-K, Yoo SK, Jung K-H, et al. Sanguinarine induces apoptosis in A549 human lung cancer cells primarily via cellular glutathione depletion. *Toxicology in Vitro* 2009;23:281–7. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.12.013>.
- [176] De Stefano I, Raspaglio G, Zannoni GF, Travaglia D, Prisco MG, Mosca M, et al. Antiproliferative and antiangiogenic effects of the benzophenanthridine alkaloid sanguinarine in melanoma. *Biochemical Pharmacology* 2009;78:1374–81. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.07.011>.
- [177] Xu J-Y, Meng Q-H, Chong Y, Jiao Y, Zhao L, Rosen EM, et al. Sanguinarine is a novel VEGF inhibitor involved in the suppression of angiogenesis and cell migration. *Mol Clin Oncol* 2013;1:331–6. <https://doi.org/10.3892/mco.2012.41>.
- [178] Pěňčíková K, Kollár P, Müller Závalová V, Táborská E, Urbanová J, Hošek J. Investigation of sanguinarine and chelerythrine effects on LPS-induced inflammatory gene expression in THP-1 cell line. *Phytomedicine* 2012;19:890–5. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.04.001>.
- [179] Dvořák Z, Vrzal R, Maurel P, Ulrichová J. Differential effects of selected natural compounds with anti-inflammatory activity on the glucocorticoid receptor and NF- $\kappa$ B in HeLa cells. *Chemico-Biological Interactions* 2006;159:117–28. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.10.105>.
- [180] Li W, Qing S, Zhi W, Yao H, Fu C, Niu X. The pharmacokinetics and anti-inflammatory effects of chelerythrine solid dispersions in vivo. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2017;40:51–8. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.05.023>.

- [181] Niu X-F, Zhou P, Li W-F, Xu H-B. Effects of chelerythrine, a specific inhibitor of cyclooxygenase-2, on acute inflammation in mice. *Fitoterapia* 2011;82:620–5. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.020>.
- [182] Jiang Z-Y, Liu W-F, Zhang X-M, Luo J, Ma Y-B, Chen J-J. Anti-HBV active constituents from *Piper longum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2013;23:2123–7. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.01.118>.
- [183] Hirsch J, Svennerholm B, Vahlne A. Inhibition of herpes simplex virus replication by tobacco extracts. *Cancer Research* 1984.
- [184] Ho Y-C, Yang S-F, Lee S-S, Chang Y-C. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in human buccal mucosal fibroblasts stimulated with arecoline. *Journal of the Formosan Medical Association* 2017;116:484–7. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2017.02.019>.
- [185] Chowdhury AA, Gawali NB, Munshi R, Juvekar AR. Trigonelline insulates against oxidative stress, proinflammatory cytokines and restores BDNF levels in lipopolysaccharide induced cognitive impairment in adult mice. *Metab Brain Dis* 2018;33:681–91. <https://doi.org/10.1007/s11011-017-0147-5>.
- [186] Jardim ACG, Igloi Z, Shimizu JF, Santos VAFFM, Felipe LG, Mazzeu BF, et al. Natural compounds isolated from Brazilian plants are potent inhibitors of hepatitis C virus replication in vitro. *Antiviral Res* 2015;115:39–47. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.12.018>.
- [187] FAUP - Lessons from the sea: Distribution, SAR and molecular mechanisms of anti-inflammatory drugs from marine organisms [[https://sigarra.up.pt/faup/en/pub\\_geral.pub\\_view?pi\\_pub\\_base\\_id=103834](https://sigarra.up.pt/faup/en/pub_geral.pub_view?pi_pub_base_id=103834)].
- [188] Zhang J, Zhu X, Li H, Li B, Sun L, Xie T, et al. Piperine inhibits proliferation of human osteosarcoma cells via G2/M phase arrest and metastasis by suppressing MMP-2/-9 expression. *International Immunopharmacology* 2015;24:50–8. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.11.012>.
- [189] El-Ghazaly MA, Fadel NA, Abdel-Naby DH, Abd El-Rehim HA, Zaki HF, Kenawy SA. Potential anti-inflammatory action of resveratrol and piperine in adjuvant-induced arthritis: Effect on pro-inflammatory cytokines and oxidative stress biomarkers. *The Egyptian Rheumatologist* 2020;42:71–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejr.2019.08.003>.
- [190] Wang C, Cai Z, Wang W, Wei M, Si X, Shang Y, et al. Piperine regulates glycogen synthase kinase-3 $\beta$ -related signaling and attenuates cognitive decline in D-galactose-induced aging mouse model. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2020;75:108261. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.108261>.
- [191] Rodgers G, Doucette CD, Soutar DA, Liwski RS, Hoskin DW. Piperine impairs the migration and T cell-activating function of dendritic cells. *Toxicology Letters* 2016;242:23–33. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.11.025>.
- [192] Zhang G, Tian L, Li Y, Liao Y, Li J, Bing F. Protective effect of homonojirimycin from *Commelina communis* (dayflower) on influenza virus infection in mice. *Phytomedicine* 2013;20:964–8. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.04.009>.
- [193] Da Silva KABS, Manjavachi MN, Paszcuk AF, Pivatto M, Viegas C, Bolzani VS, et al. Plant derived alkaloid (–)-cassine induces anti-inflammatory and anti-hyperalgesic effects in both acute and chronic inflammatory and neuropathic pain models. *Neuropharmacology* 2012;62:967–77. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.10.002>.
- [194] Li N, Wang Z, Wang R, Zhang Z-R, Zhang Y-N, Deng C-L, et al. In Vitro Inhibition of Alphaviruses by Lycorine. *Virol Sin* 2021;36:1465–74. <https://doi.org/10.1007/s12250-021-00438-z>.

- [195] Meng Y, Ying Z, Xiang Z, Hao D, Zhang W, Zheng Y, et al. The anti-inflammation and pharmacokinetics of a novel alkaloid from *Portulaca oleracea* L. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2016;68:397–405. <https://doi.org/10.1111/jphp.12526>.
- [196] Quintana VM, Selisko B, Brunetti JE, Eydoux C, Guillemot JC, Canard B, et al. Antiviral activity of the natural alkaloid anisomycin against dengue and Zika viruses. *Antiviral Research* 2020;176:104749. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104749>.
- [197] Fan G, Li Z, Shen S, Zeng Y, Yang Y, Xu M, et al. Baculiferins A–O, O-sulfated pyrrole alkaloids with anti-HIV-1 activity, from the Chinese marine sponge *Iotrochota baculifera*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2010;18:5466–74. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.06.052>.
- [198] Zhang B-M, Wang Z-B, Xin P, Wang Q-H, Bu H, Kuang H-X. Phytochemistry and pharmacology of genus *Ephedra*. *Chinese Journal of Natural Medicines* 2018;16:811–28. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(18\)30123-7](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(18)30123-7).
- [199] Nicolau LAD, Carvalho NS, Pacífico DM, Lucetti LT, Aragão KS, Vêras LMC, et al. Epiisopiloturine hydrochloride, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus* leaves, protects against naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017;87:188–95. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.101>.
- [200] Abdelgadir HA, Van Staden J. Ethnobotany, ethnopharmacology and toxicity of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae): A review. *South African Journal of Botany* 2013;88:204–18. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.07.021>.
- [201] Hwang J-H, Kim K-J, Ryu S-J, Lee B-Y. Caffeine prevents LPS-induced inflammatory responses in RAW264.7 cells and zebrafish. *Chemico-Biological Interactions* 2016;248:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.01.020>.
- [202] Wang Y, Yang X, Zheng X, Li J, Ye C, Song X. Theacrine, a purine alkaloid with anti-inflammatory and analgesic activities. *Fitoterapia* 2010;81:627–31. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.03.008>.
- [203] Wang G-E, Li Y-F, Zhai Y-J, Gong L, Tian J-Y, Hong M, et al. Theacrine protects against nonalcoholic fatty liver disease by regulating acylcarnitine metabolism. *Metabolism* 2018;85:227–39. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.04.011>.
- [204] Li W, Zhou W, Lee D-S, Shim SH, Kim Y-C, Kim YH. Hericirine, a novel anti-inflammatory alkaloid from *Hericium erinaceum*. *Tetrahedron Letters* 2014;55:4086–90. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.05.117>.
- [205] Li Y, Liu D, Cen S, Proksch P, Lin W. Isoindolinone-type alkaloids from the sponge-derived fungus *Stachybotrys chartarum*. *Tetrahedron* 2014;70:7010–5. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2014.07.047>.
- [206] Deng G, Wu C, Rong X, Li S, Ju Z, Wang Y, et al. Ameliorative effect of deoxyvasicine on scopolamine-induced cognitive dysfunction by restoration of cholinergic function in mice. *Phytomedicine* 2019;63:153007. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.153007>.
- [207] Singh A, Chibber P, Kolimi P, Malik TA, Kapoor N, Kumar A, et al. Rohitukine inhibits NF- $\kappa$ B activation induced by LPS and other inflammatory agents. *Int Immunopharmacol* 2019;69:34–49. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.01.015>.
- [208] Ping X, Weiyang Y, Jianwei C, Xiang L. Antiviral activities against influenza virus (FM1) of bioactive fractions and representative compounds extracted from Banlangen (*Radix Isatidis*). *Journal of Traditional Chinese Medicine* 2016;36:369–76. [https://doi.org/10.1016/S0254-6272\(16\)30051-6](https://doi.org/10.1016/S0254-6272(16)30051-6).