

# REPUBLIQUE DE CÔTE D'IVOIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



## MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de

### MASTER

DE BIOLOGIE SANTE

Option :

PHYTOTHERAPIE ET PHARMACOLOGIE DES SUBSTANCES  
NATURELLES D'INTERET

Par

KOUADJO Samuel Wilfried

Année Académique

2021-2022

Numéro d'ordre:

128 - 2022

### THEME :

**Evaluation de l'activité antivirale des extraits  
aqueux et hydroéthanolique de *Ocimum  
gratissimum L.* sur des souches de *Poliovirus  
1 Sabin* isolées en Côte d'Ivoire**

Date de soutenance : 03 – 10 - 2022

#### Jury :

M. KOUASSI Kouassi Clément	Maître de Conférences	UJLoG	Président
M. ACKAH Jacques Alfred A.B.	Maître de Conférences	UJLoG	Directeur Scientifique
M.AKRE Djako Sosthène T.	Maître- Assistant	UJLoG	Encadreur
M. OBOUAYEBA Abba P.	Maître- Assistant	UJLoG	Examineur



## **DEDICACE**

Je dédie ce travail :

### **A l'Éternel Dieu le TOUT PUISSANT et à son Fils JESUS-CHRIST**

Seigneur, merci de m'avoir soutenu depuis mes premiers pas à l'école jusqu'à cet instant. Tu m'as plusieurs fois sauvé, alors que des embûches de tout bord se dressaient contre moi. Je ne serais sûrement pas arrivé là si je ne connaissais pas. Sois aussi toujours à mes côtés tout le reste de mon parcours professionnel et de ma vie.

### **A ma mère Kouadio Adèle**

Maman, merci pour tous les sacrifices que tu as consentis pour ma réussite. Tu m'as envoyé à l'école et tu n'as ménagé aucun effort pour la réussite de mes études. Malgré l'absence de mon père, tu as toujours su m'éduquer et m'encourager. Ce travail est le fruit de tes efforts. Puisse le Seigneur te garder longtemps parmi nous. Que l'avenir soit pour toi soulagement et satisfaction.

### **A Papa Koffi Edmond et à Maman Koffi Elodie**

Je vous serai toujours reconnaissant pour toute l'aide et le soutien que vous m'avez apporté. Pendant 10 ans vous m'avez accueilli et adopté, je n'ai manqué de rien à vos côtés. Les moments difficiles, vous m'avez toujours soutenu et supporté. Merci infiniment.

## REMERCIEMENTS

**A Madame TIDOU Abiba Sanogo épouse Koné**, Professeur Titulaire d'Eco-toxicologie, Présidente de l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa, qui a assuré un cadre d'étude agréable pendant notre formation ;

**Au Professeur DOSSO Mireille** ; Professeur Titulaire de Biochimie Bactériologie-Virologie et Directrice de l'Institut Pasteur de Cote d'Ivoire : Merci Madame de nous avoir permis d'effectuer nos travaux de recherche dans votre Institution ;

**A Monsieur KONE Tidiane**, Professeur Titulaire d'Hydrobiologie et Vice-Président de l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa chargé de la Pédagogie, de la Vie Universitaire, de la Recherche et de l'Innovation Technologique pour tout le travail abattu au sein de l'Institution ;

**A Monsieur AKAFFOU Doffou Sélastique**, Professeur Titulaire de Génétique et Vice-Président de l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa chargé de la Planification, de la Programmation et des Relations Extérieures pour ses conseils ;

**A Madame TONESSIA Dolou Charlotte**, Maître de Conférences de Physiopathologie, Directrice de l'Unité de Formation et de Recherche (UFR) Agroforesterie. Merci pour avoir accepté mon inscription à l'UFR ;

**Au Docteur ADJOGOUA Edgard Valery**, Chef du Département des Virus Epidémiques de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Merci de m'avoir accueillie dans votre Laboratoire, ce travail vous doit beaucoup et je vous en suis reconnaissant ;

**A Mme TRAORE Fanta**, Superviseur Technique au Laboratoire de surveillance Polio du Département des Virus Epidémiques de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Merci d'être à l'origine de ce travail et de m'avoir prodigué de précieux conseils pour sa réalisation.

**Au Docteur YENON Aurélie**, attaché de recherche au Laboratoire de surveillance Polio du Département des Virus Epidémiques de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Merci Madame de m'avoir prodigué de précieux conseils pour la réalisation de ce travail.

**A M. KRA Eric**, Technicien supérieur au Laboratoire de surveillance Polio du Département des Virus Epidémiques de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Merci Monsieur pour votre ouverture d'esprit, votre gentillesse et merci d'avoir répondu présent chaque fois que je vous ai sollicités ;

**A M. KOFFI Fabrice et M. APPIA** Technicien au Laboratoire de surveillance Polio du Département des Virus Epidémiques de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Merci à vous chers formateurs pour le soutien moral, financier et pour vos connaissances mis à ma disposition ;

**A Mme GUIDY Françoise et Mlle KOUADJO Prisca**, Techniciennes au Laboratoire de culture cellulaire Département des Virus Epidémiques de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Merci pour votre disponibilité, vos conseils et votre soutien ;

**A Maman KASSIEU**

Je remercie le Seigneur de t'avoir mis sur mon chemin au moment où j'en avais le plus besoin. Dieu est passé par ton ministère pour me faire énormément de bien, tu es comme une mère pour moi. Que Dieu te bénisse et te rende encore plus efficace ;

**Au Pasteur GAULITHY Camille et à Mme GAULITHY Mariam**

Je ne vous remercierai jamais assez pour le soutien et les conseils que vous m'avez apporté. Vous m'avez accueilli chez vous pour mon stage alors que je ne s'avait où aller. Je me souviendrai toujours de ces moments où vous vous êtes dépouillés pour m'apporter de l'aide. Que Dieu vous bénisse abondamment ;

**Au Pasteur YAO Manzan Dieudonné**

Merci pour ton soutien, pour tes conseils, pour tes prières et pour tes encouragements. Merci d'avoir toujours été une oreille attentive pour moi ;

**A M. KOUAKOU Lucien, M. Singo Joël et M. ZAMA Serge**

Merci de m'avoir toujours poussé et encouragé à finir mes études malgré toute contrainte et de n'avoir laissé aucune occasion de me soutenir ;

**A mon oncle KOUASSI Laurent et à ma tante KOUADIO Juliette**

Merci pour toutes ces années de soutien et d'encouragement ;

**A M. ANOMAN Joel, M. TAKORA Rady et M. GNAWOUA Roland**

Merci à vous chers frères et amis pour votre soutien sans faille à mes côtés dans les moments difficiles. Merci pour vos prières en ma faveur. Je remercie Dieu de vous avoir mis sur mon chemin ;

**A Mme KOHON Eliane**

Merci à toi aussi pour ton soutien à tous les niveaux, pour tes conseils alors que j'étais déboussolé. Que Dieu te le rende au centuple.

## A NOS MAITRES,

Au Docteur KOUASSI Kouassi Clément, Maître de Conférences de Microbiologie-Sécurité alimentaire et Vice-Doyen de l'UFR Agroforesterie à l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa, Président du jury. Cher Docteur, nous avons été très impressionnés par la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de présider ce jury de Master malgré votre programme très chargé. Votre esprit d'ouverture, votre simplicité, vos qualités humaines et scientifiques font de vous un enseignant de référence ;

Au Docteur ACKAH Jacques Auguste Alfred Bognan, Maître de Conférences de Biochimie-Pharmacologie, Responsable de la filière Biologie-Santé à l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa, et Directeur Scientifique de ce Master. Merci cher professeur pour tous les efforts fournis pour l'excellence dans notre formation ;

Au Docteur AKRE Djako Sosthène Thierry, Maître-Assistant de Biochimie-Microbiologie à l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa et Encadreur pédagogique de ce travail. Je souhaite vous remercier Monsieur de m'avoir accueillie, encadré et conduit mes premiers pas dans la virologie. Je vous suis également reconnaissant pour le temps conséquent que vous m'avez accordé, vos qualités pédagogiques et scientifiques, votre franchise, votre patience et votre sympathie. J'ai beaucoup appris à vos côtés et je vous adresse ma gratitude pour tout cela ;

Au Docteur OBOUAYEBA Abba Pacôme, Maître-Assistant de Biochimie-Pharmacologie, Vice-Responsable du parcours Biologie-Santé à l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa et Examineur de ce travail : Merci cher professeur d'avoir accepté d'améliorer ce travail.

TABLE DES MATIERES	Pages
DEDICACE.....	i
LISTE DES TABLEAUX.....	x
INTRODUCTION.....	1
<b>PREMIERE PARTIE: GENERALITES</b>	
1. Généralités.....	3
1.1. Les virus .....	3
1.1.1. Définitions et classification des virus.....	3
1.1.2. Entérovirus .....	4
1.1.2.1. Historique des Entérovirus .....	4
1.1.2.2. Caractères généraux des <i>Entérovirus</i> .....	5
1.1.2.3. Classification des Entérovirus .....	6
1.1.3. Poliovirus .....	6
1.1.3.1. Propriétés générales du <i>Poliovirus</i> .....	7
1.1.3.2. Structure du <i>Poliovirus</i> .....	7
1.1.3.2.1. Structure de la capside.....	7
1.1.3.2.2. Structure du génome.....	8
1.1.3.3. Etape de la réplication du <i>Poliovirus</i> .....	9
1.1.3.3.1. Adsorption, pénétration et décapsidation .....	9
1.1.3.3.2. Traduction et réplication du génome viral .....	10
1.1.3.3.3. Assemblage des virions et libération des particules virales .....	10
1.1.3.4. Réservoir et mode de transmission du <i>Poliovirus</i> .....	11
1.1.3.5. Effets de la multiplication virale sur la cellule hôte .....	13
1.1.3.6.1. Physiopathologie du <i>Poliovirus</i> .....	14
1.1.4. Diagnostic biologique d'une infection poliomyélitique.....	17
1.1.5. Traitement et prophylaxie des infections poliomyélitiques .....	18
1.2. <i>Ocimum gratissimum</i> .....	19
1.2.1. Histoire de <i>Ocimum gratissimum</i> .....	19
1.2.2. Noms de <i>Ocimum gratissimum</i> .....	19
1.2.3. Classification systématique de <i>Ocimum gratissimum</i> .....	20
1.2.4. Localisation et répartition géographique de <i>Ocimum gratissimum</i> .....	20
1.2.5. Morphologie de <i>Ocimum gratissimum</i> .....	20



1.2.6. Composition chimique de <i>Ocimum gratissimum</i> .....	21
1.2.7. Tri phytochimique de <i>Ocimum gratissimum</i> .....	21
1.2.8. Usages de <i>Ocimum gratissimum</i> .....	22
1.3. Mécanismes d'action des antiviraux sur les virus à ARN.....	23
1.4. Mise en évidence et mesure de l'activité antivirale .....	23
<b>DEUXIEME PARTIE: MATERIEL ET METHODES</b>	
2.1.1. Cadre d'études.....	24
2.1.2. Matériel Biologique.....	24
2.1.2.1 Matériel végétal.....	24
2.1.2.3. Lignée cellulaire .....	25
2.1.3. Matériel technique.....	26
2.1.3.1. Appareillage et équipements .....	26
2.1.3.2. Réactifs.....	26
2.2. Méthodes .....	27
2.2.1. Préparation des extraits aqueux et hydroéthanolique .....	27
2.2.2. Préparation des dilutions des extraits aqueux et hydroéthanolique.....	28
2.2.3. Amplification et dilution des souches virales ( <i>Poliovirus 1</i> ).....	29
2.2.4. Test de cytotoxicité en présence de l'extrait aqueux et hydroéthanolique.....	29
2.2.5. Evaluation de l'activité antivirale des extraits aqueux et hydroéthanolique sur le <i>Poliovirus 1</i> Sabin (PVSL1).....	30
2.2.6. Analyses des données.....	31
<b>TROISIEME PARTIE: RESULTATS ET DISCUSSION</b>	
3.1. Résultats .....	32
3.1.1. Rendement d'extraction .....	32
3.1.2. Cytotoxicités des extraits aqueux et hydroéthanolique sur les cellules L20B .....	32
3.1.3. Activité antivirale des extraits aqueux et hydroéthanolique sur le <i>Poliovirus 1</i> Sabin (en 30 minutes d'incubation) .....	34
3.1.4. Activité antivirale des extraits aqueux et hydroéthanolique sur le PV1SL en 1 heure d'incubation.....	35
3.2. Discussion .....	37
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	41
REFERENCES.....	42

ANNEXES .....xiv  
RESUME.....i

## LISTE DES FIGURES

Pages

Figure 1: Photographie d'une stèle égyptienne représentant un prêtre, s'aidant d'un bâton pour marcher (GPEI, 2022). .....	4
Figure 2: Classification des Entérovirus (Tan, 2016). .....	6
Figure 3: Structure de la capsid du Poliovirus (Hogle, 1985). .....	8
Figure 4: Schéma de l'organisation génomique du <i>Poliovirus</i> et des clivages.....	9
Figure 5: Cycle de multiplication du Poliovirus (Blondel <i>et al.</i> , 2006). .....	11
Figure 6: Mode de transmission du <i>Poliovirus</i> (Tachi, 2019).....	12
Figure 7: Aspects microscopiques des cellules L20B avec présence d'ECP. De la gauche vers la droite : Saine (A), Toxicité (B), ECP 3+ (C), ECP 4+ (D) (Tachi, 2019).....	13
Figure 8: Pathogenèse de la poliomyélite .....	15
Figure 9: Enfant atteint d'une paralysie des membres inférieurs (Tan, 2016).....	16
Figure 10: Feuilles de <i>Ocimum gratissimum</i> .....	19
Figure 11: Feuilles (a) et poudre (b) sèches de <i>Ocimum gratissimum</i> .....	24
Figure 12: Souche de Poliovirus 1 .....	25
Figure 13: Tube de suspension cellulaire saine de cellules L20B.....	25
Figure 14: Préparations des différentes dilutions des extraits aqueux (a) et hydroéthanolique (b). .....	28
Figure 15: Plan de plaque du test de cytotoxicité des extraits aqueux et hydroéthanolique sur les cellules L20B .....	30
Figure 16: Plan de plaque des tests antiviraux des extraits aqueux et hydroéthanolique sur le Poliovirus 1 en 30 et 60 minutes d'incubation.....	31
Figure 17: Extrait aqueux de feuilles de <i>Ocimum gratissimum</i> .....	32
Figure 18: Extrait hydroéthanolique de feuilles de <i>Ocimum gratissimum</i> .....	32
Figure 19: Résultat du test de cytotoxicité en présence de l'extrait aqueux. ....	33
Figure 20: Résultat du test de cytotoxicité en présence de l'extrait hydroéthanolique.....	34
Figure 21: Tests antiviraux des extraits aqueux et hydroéthanolique sur le PV1SL en 30 minutes d'incubation. ....	35
Figure 22 : Tests antiviraux des extraits aqueux et hydroéthanolique sur le PV1SL en 1 heure d'incubation.....	36
Figure 23: Evolution du pourcentage d'inhibition de la réplication de PV1SL par différentes concentrations des extraits de <i>Ocimum gratissimum</i> (T=30 min ; T=1 h). .....	37

LISTE DES TABLEAUX

Pages

Tableau I: Tri phytochimique de *Ocimum gratissimum* (Kpètèhoto *et al.*, 2017). ..... 22

Tableau II: Rendement d'extraction des feuilles de *Ocimum gratissimum* ..... 32

LISTE DES ANNEXES

Pages

Annexes 1 : Schéma de plaque des tests antiviraux des extraits aqueux et hydroéthanolique sur le <i>Poliovirus 1</i> en 30 minutes d'incubation.....	xiv
Annexe 2 : Plaque des tests antiviraux des extraits aqueux et hydroéthanolique sur le <i>Poliovirus 1</i> Sabin Like en 1 heure d'incubation.....	xiv
Annexe 3 : Schéma d'une plaque de test de cytotoxicité.....	xv

## LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ADN	: Acide Désoxyribonucléique
ARN	: Acide Ribonucléique
ARNm	: ARN Messenger
<i>Echovirus</i>	: <i>Enteric Cytopathic Human Orphan virus</i>
ECP	: Effet cytopathique
ENP	: <i>Entérovirus</i> non poliomyélitique
HEV-C	: <i>Entérovirus</i> humains du groupe C
L20B	: Cellules de souris génétiquement modifiées
OMS	: Organisation mondiale de la santé
PCR	: Polymerase chain reaction
PEV	: Programme élargie de vaccination
PFA	: Paralysie flasque aigue
PV1	: <i>Poliovirus 1</i>
PVDV	: <i>Poliovirus</i> dérivé d'un vaccin
RD	: Cellules dérivant de Rabdomyosarcome humain
SNC	Systeme nerveux central
VPg	: Virion Protein Genom

## INTRODUCTION

Les connaissances actuelles situent le début de l'humanité à sept millions d'années environ (Lalière, 2009). Depuis ce temps, de très nombreuses maladies infectieuses, qu'elles soient d'origine virale, bactérienne ou parasitaire, ont toujours accompagné l'espèce humaine. La part des infections liées à un virus ou virose est majeure car elles représentent plus des deux tiers des infections découvertes durant ces quarante dernières années. Malgré que la recherche scientifique sur les agents antiviraux ait plus de cinquante ans, les maladies virales demeurent un grand problème mondial. Cela est dû en grande partie à la toxicité développée par de nombreux médicaments (Ernst & Franey, 1998) mais aussi par l'apparition rapide de souches résistantes aux médicaments (Gilbert *et al.*, 2001).

L'Afrique et particulièrement la Côte d'Ivoire ne sont pas épargnées, puisqu'une étude révèle qu'en Côte d'Ivoire, la prévalence des *Entérovirus* tant dans les eaux usées brutes que lagunaires est très élevée. Il existe en effet une forte contamination virale du milieu lagunaire en provenance des eaux usées brutes urbaines. Les infections à *Entérovirus* constituent donc une source importante de morbidité dans la capitale ivoirienne (Momou *et al.*, 2012).

Face aux failles de la médecine conventionnelle et dans le but de découvrir de nouvelles molécules antivirales, plusieurs alternatives de recherche peuvent être exploitées telles que les plantes médicinales utilisées comme remèdes dans les pays en voies de développement (Békro *et al.*, 2007). En effet, les composés isolés de ces plantes médicinales comme les flavonoïdes, les tanins, les protéines, les polysaccharides et les alcaloïdes sont réputés pour leurs propriétés antivirales (Jassim *et al.*, 2003). Une étude montre par exemple que la flavone (flavonoïde naturelle), isolée de *Agastache folium* possède une bonne activité antivirale contre la plupart des *Picornavirus* sans provoquer de toxicité cellulaire.

Virus très répandus, les *Entérovirus* sont responsables d'une très grande variété de maladies épidémiques et endémiques touchant enfants et adultes. Leurs domaines pathologiques sont très étendus car ils sont capables de provoquer des maladies respiratoires, des myocardites, des encéphalites (Mueller *et al.*, 2005). Les *Entérovirus* en général constituent un excellent modèle d'étude virologique parce qu'ils sont faciles à manipuler. Selon le comité international de taxonomie virale, les *Entérovirus* sont issus de la famille des *Picornavirus* (Volle, 2015) et se subdivisent en plusieurs espèces : *Poliovirus*, *Coxsackievirus-A*, *Coxsackievirus-B* et *Echovirus* (Pöyry *et al.*, 1996). Le *Poliovirus* en particulier est un *Entérovirus* à ARN responsable de la poliomyélite, une maladie éradiquée dans plusieurs pays

mais qui d'après l'OMS demeure une menace pour l'ensemble du monde. En fait, une réémergence de la maladie est à remarquer dans certains pays. Selon un rapport de l'OMS, en 2020, les 1039 cas de poliomyélites notifiés par l'OMS dont 499 en Afrique montrent que la poliomyélite n'est toujours pas en voie d'éradication. De plus, en dehors des vaccins prescrits dès la naissance, aucun médicament antiviral n'est disponible contre la poliomyélite.

Le but de cette étude est donc de contribuer à la valorisation des plantes médicinales utilisées dans la pharmacopée ivoirienne en les présentant comme modèle d'antiviraux. *Ocimum gratissimum* est justement une plante médicinale utilisée dans la médecine traditionnelle contre les infections virales comme la pneumonie, la toux, la diarrhée, la dysenterie etc. (Bever *et al.*, 1960).

L'objectif général de la présente étude est d'évaluer les propriétés antivirales des extraits aqueux et hydroéthanolique de *Ocimum gratissimum* sur des souches d'*Entérovirus* comme le *Poliovirus 1* Sabin. Pour atteindre cet objectif, deux objectifs spécifiques ont été fixés. A savoir :

- Evaluer la cytotoxicité des extraits aqueux et hydroéthanolique sur les cellules L20B
- Evaluer l'activité antivirale des extraits aqueux et hydroéthanolique sur le *Poliovirus 1* Sabin en déterminant les  $CI_{50}$  (Concentration inhibitrice 50 %) et les CMV (Concentration minimale virucide) de ces extraits.



# 1. Généralités

## 1.1. Les virus

### 1.1.1. Définitions et classification des virus

Le mot virus est issu du latin virus qui signifie « poison ». Les virus (microorganisme acaryote) sont de petites particules infectieuses visibles au microscope électronique et mesurant entre 20 et 300 nm de diamètre. La caractéristique principale de ceux-ci, est leur capacité à traverser des filtres imperméables aux bactéries. Alors que les plus gros virus infectant l'homme, les *Poxviridae*, ont une taille entre 250 et 300 nm, les plus petits, *Parvoviridae*, n'ont que 20 nm.

Les virus sont séparés en fonction de leur composition en acide nucléique et se reproduisent uniquement par réplication de leur matériel génétique, chez un hôte cellulaire parce qu'ils ne possèdent ni enzyme, ni ribosome pour assurer leur propre synthèse. Ces cellules hôtes peuvent être de différents types : bactéries, algues, plantes, animaux. Durant le cycle de réplication des virus, plusieurs unités d'acides nucléiques et de protéines virales sont produites. Leurs protéines de structures se rassemblent pour former la capsid. Celle-ci enveloppe et stabilise l'acide nucléique contre les milieux extracellulaires et favorise l'attachement et la pénétration après adhésion aux nouvelles cellules hôtes (Herbein, 2004). La structure de la capsid donne la forme du virus, ce qui permet de distinguer deux groupes principaux de virus : les virus à symétrie cubique ou icosaédrique (virus de la poliomyélite) et les virus à symétrie hélicoïdale (virus de la mosaïque du tabac) (Belarbi, 2019). On distingue aussi les virus nus, ne possédant pas d'enveloppe ou peplos (exemple le virus de la poliomyélite) et les virus enveloppés (le virus de la grippe, le virus du SIDA) (Belarbi, 2019). Selon le Comité International de Taxonomie Virale, les virus sont répartis en 71 familles et 164 genres dont la famille des *Picornaviridae*. La famille des *Picornaviridae* (pico : petit ; rna : acide ribonucléique) quand elle est actuellement classée en 17 genres distincts et 37 espèces : *Aphovirus*, *Avihepatovirus*, *Cardiovirus*, *Erbovirus*, *Entérovirus*, *Hepatovirus*, *Kobuvirus*, *Parechovirus*, *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Teschovirus*, *Casovirus*, *Dicipivirus*, *Salivirus*, *Megrivirus* et *Tremovirus* (Adams *et al.*, 2013)

## 1.1.2. Entérovirus

### 1.1.2.1. Historique des Entérovirus

L'histoire des *Entérovirus* commence avec celle de la poliomyélite. Cette maladie est connue en Egypte depuis environ 4000 ans (Figure 1). Des sujets présentant une amyotrophie des membres inférieurs sont représentés sur des stèles ou des bas-reliefs. Les premiers signes cliniques de la poliomyélite ont été décrits en 1800, chez des patients souffrants de paralysie avec fièvre. En 1840, d'autres études ont montré que les douleurs spécifiques de la maladie étaient dues à une atteinte des neurones moteurs de la corne antérieure de la moelle épinière. En 1908, Landsteiner démontrait la nature virale de la poliomyélite et reproduisaient la maladie chez le singe par inoculation d'extrait de moelle épinière d'un enfant décédé de poliomyélite (Pallansch & Roos, 2007). En 1909, Landsteiner et Popper découvraient que l'agent étiologique de la poliomyélite paralytique aiguë était le *Poliovirus* (Kristensson, 1999).



Figure 1: Photographie d'une stèle égyptienne représentant un prêtre, s'aidant d'un bâton pour marcher (GPEI, 2022).

Dès 1910, des virologues essayèrent de répliquer le *Poliovirus* dans des cultures de tissus et même dans des milieux acellulaires (Flexner & Noguchi, 1913). En 1936, Sabin et Olitsky parvinrent à cultiver le *Poliovirus* sur des tissus embryonnaires humains d'origine nerveuse (Lashkevich, 2008). Treize ans plus tard, l'équipe d'Enders montrait que le *Poliovirus* est capable de se multiplier sur des cellules non nerveuses d'origine humaine et que ce virus

entraîne l'apparition d'un effet cytopathique spécifique (Enders, 1972). Cette découverte révolutionnaire a valu le Prix Nobel de Médecine à ses auteurs en 1954. Elle allait permettre le développement des deux vaccins antipoliomyélitiques de Jonas Salk (Salk, 1956 ; Salk, 1959) et d'Albert Sabin (Sabin, 1959 ; Sabin, 1985).

En 1950, le pic d'incidence de la poliomyélite aux États-Unis se déplace de la petite enfance vers les enfants âgés de 5 à 9 ans ; environ un tiers des cas surviennent chez les plus de 15 ans (Melnick, 1996). Les taux de paralysie et de mortalité due à l'infection par le *Poliovirus* augmentent également durant cette période. L'épidémie de 1952 aux États-Unis a été la plus importante dans l'histoire de cette nation et a permis de faire prendre conscience à l'opinion publique de la nécessité d'un vaccin. Sur les 57 628 cas enregistrés cette année-là, 3 145 furent mortels et 21 269 furent à l'origine de séquelles paralytiques plus au moins invalidantes (Melnick, 1996). Des nombreux *Entérovirus* ont été découverts dans les années 1960 à partir de patients, de porteurs asymptomatiques ou dans l'environnement : *Coxsackievirus (CV) A et B*, *Echovirus*, *Enterovirus-68* (bronchiolites), *Enterovirus-70* (conjonctivite), *Enterovirus-A71* (paralysies).

En 1988, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a mis en place un programme d'éradication de la poliomyélite reposant sur des campagnes de vaccination massive. Après 19 ans de vaccination intensive, l'incidence de la poliomyélite a diminué de 99 % dans le monde (WHO, 1988).

#### **1.1.2.2. Caractères généraux des *Entérovirus***

Les *Entérovirus* se distinguent des autres *Picornavirus* grâce à leurs propriétés physico-chimiques (Rueckert, 1971 ; Andreoletti *et al.*, 2003). L'absence d'enveloppe chez les *Entérovirus* les rend relativement résistants à l'action des agents physicochimiques comme : l'éthanol 70 %, l'isopropanol et les ammoniums quaternaires. Ils sont cependant détruits par les oxydants (hypochlorite de soude), le formol 0,3 %, la betapropionalactone et les ultraviolets (Pallansch & Roos, 2007). Leur transmission se fait principalement selon le mode fécal-oral, mais des contaminations respiratoires, cutanéomuqueuse ou manuportées sont également possibles (Pallansch & Roos, 2007). Ces virus non enveloppés possèdent une capsidie icosaédrique, renfermant un génome constitué d'une molécule d'ARN monocaténaire de polarité positive.

### 1.1.2.3. Classification des Entérovirus

En 2012, le Comité International de Nomenclature des Virus a défini 12 espèces composant le genre *Entérovirus* où l'on distingue des espèces pathogènes pour l'homme (*Entérovirus* humain) HEV : 4 espèces d'*Entérovirus* noté de A à D et 3 *Rhinovirus* noté de A à C. Mais aussi des espèces pathogènes pour les animaux : *Entérovirus* bovin (BEV), *Entérovirus* porcine (PEV), *Entérovirus* Simien (SEV) (Figure 2). Le genre *Entérovirus* regroupe plus de 100 sérotypes. Cependant les recombinaisons potentielles intra et inter-espèces pendant l'évolution et la découverte de nouveaux virus font que la classification des *Entérovirus* est régulièrement reconsidérée (Lauber & Gorbalenya, 2012 ; Adams *et al.*, 2013). Les *Entérovirus* humain C comprennent plusieurs *Coxsackievirus A* et ségrégent, selon le degré de similitude de leurs séquences nucléotidiques, dans un même groupe phylogénétique que le *Poliovirus* (Figure 2).

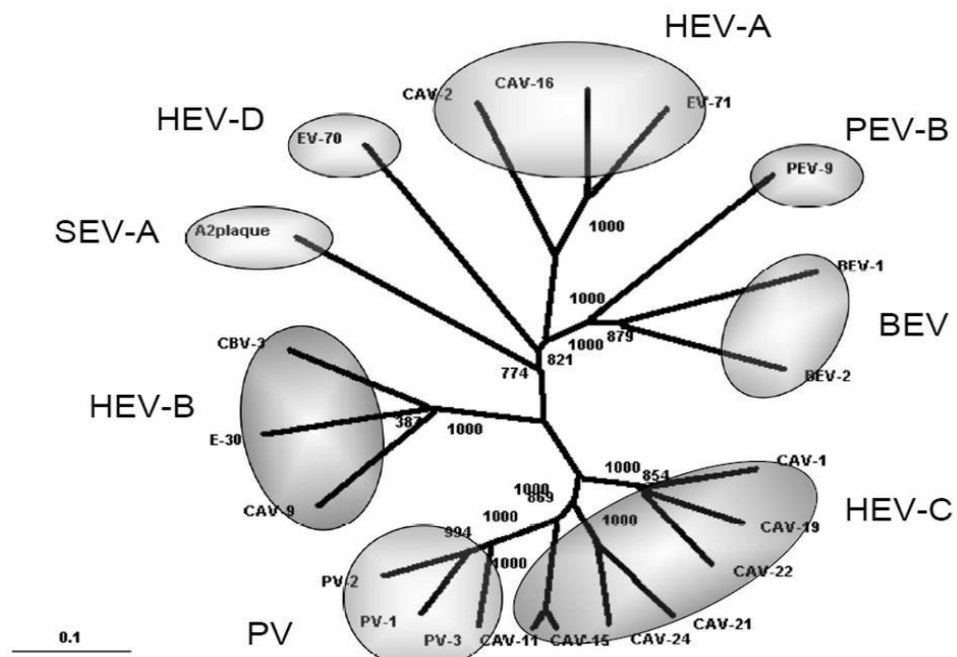


Figure 2: Classification des Entérovirus (Tan, 2016).

### 1.1.3. Poliovirus

Le *Poliovirus* est un petit virus non enveloppé, d'environ 22 à 30 nm de diamètre (Ryan, 2004). Il appartient au genre *Entérovirus* de la famille des *Picornaviridae* (Pallansch, 2001). Le *Poliovirus* est l'agent pathogène de la poliomyélite. La poliomyélite, des grecs « polios »

signifie gris, « myélos » signifie moelle osseuse ou épinière et ite signifie inflammation, est une maladie qui serait ignorée des traités de la médecine jusqu'au XVIIIème siècle, alors qu'elle affecte l'humanité depuis bien longtemps. On distingue deux catégories de *Poliovirus* : le virus sauvage et le virus dérivé d'un vaccin. Le *Poliovirus* sauvages est une souche isolée sur le terrain et une souche de référence. Il existe plusieurs sérotypes de *Poliovirus* sauvages : le *Poliovirus* sauvage de type 1 (*PVS1*), le *Poliovirus* sauvage de type 2 (*PVS2*) et le *Poliovirus* sauvage de type 3 (*PVS3*). Le *PVS2*, dont le dernier signalement remonte à 1999, en Inde, a été éliminé. Persistent donc actuellement dans la nature le type 1, prédominant, et le type 3 (Tan, 2016).

A côté de du virus sauvage, le *Poliovirus* issu de mutation génétique est également recensé. Il dérive du virus contenu dans le vaccin vivant atténué à administration orale. Ce *Poliovirus* dérivé d'un vaccin (*PVDV*) était impliqué dans moins de 4 % des cas de poliomyélite signalés entre 2000 et 2011 (Tan, 2016). Il existe aussi plusieurs sérotypes de *Poliovirus* dérivé d'un vaccin : le type 1 (*PVDV1*), le type 2 (*PVDV2*) et le type 3 (*PVDV3*).

#### **1.1.3.1. Propriétés générales du *Poliovirus***

Le *Poliovirus* a un quadruple tropisme (OMS, 1993) : Il est neurotrope (destruction des neurones moteurs), entérotrope (qui explique l'implantation intestinale constante), myotrope (entraînant myosite et myocardite) et méningotrope (entraînant une méningite). Le *Poliovirus* est stable à pH acide. Il peut survivre plusieurs semaines à température ambiante, plusieurs mois entre 0 et 8 °C et plusieurs années à – 20 °C. Comme les autres *Entérovirus*, il résiste à l'éther, à l'alcool à 70 % et à d'autres désinfectants de laboratoire mais il est détruit par les oxydants (hypochlorite de soude), le formol 0,3 %, la betapropionalactone et les ultraviolets (Pallansch & Roos, 2007).

#### **1.1.3.2. Structure du *Poliovirus***

##### **1.1.3.2.1. Structure de la capsid**

Le *Poliovirus* possède une capsid de nature protéique (Blondel *et al.*, 2000) qui donne sa forme icosaédrique au virus. La capsid se compose de 60 sous-unités identiques d'une association des protéines VP1, VP2, VP3 et VP4 (Blondel *et al.*, 2000). A la surface du virus, une dépression appelée « canyon » contient le site d'attachement au récepteur des cellules

humaines (CD155) (Blondel *et al.*, 2000) (Figure 3). CD155 est une glycoprotéine appartenant à la superfamille des immunoglobulines qui est présente uniquement à la surface des cellules de primates. Des épitopes sont présents à la surface des protéines VP1, VP2 et VP3 (Figure 7). C'est donc la capsid qui porte les déterminants antigéniques permettant de différencier chaque sérotype de virus ; elle est responsable de la production d'anticorps spécifiques contre chaque sérotype de *Poliovirus* (Ryan, 2004).

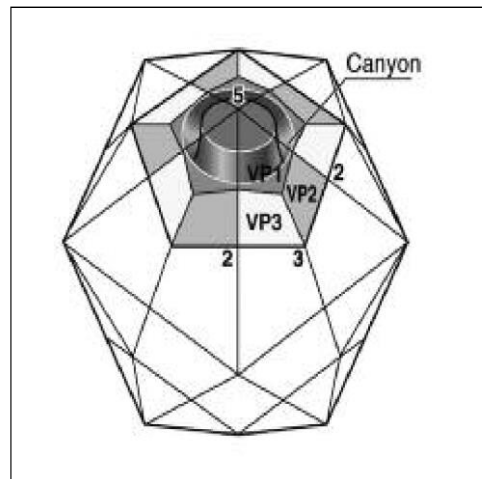


Figure 3: Structure de la capsid du Poliovirus  
(Hogle, 1985).

#### 1.1.3.2.2. Structure du génome

Le premier génome de Picornavirus qui a été cloné et séquencé a été celui du *Poliovirus 1* (Kitamura *et al.*, 1981). Ce génome est une molécule d'ARN monocaténaire de polarité positive de 7500 nucléotides environ. Une protéine virale, appelée VPg (Virion Protein Genome), est présente à l'extrémité 5'. C'est également dans cette zone que se trouve le site IRES (Internal Ribosome Entry Site) au niveau duquel se fixe le ribosome pour la traduction. L'extrémité 3' comporte un groupement polyadénylé (Blondel *et al.*, 2000). Cette molécule d'ARN est constituée d'une unique phase de lecture ouverte, encadrée par deux régions non codantes en 5' et en 3' (5'NC et 3'NC). Ces régions sont impliquées dans la régulation de la traduction et de la réplication du génome. L'ARN est dit de polarité positive et donc infectieux parce qu'il peut être directement traduit en protéines virales nécessaires à la réplication dès sa libération dans la cellule (Wafa, 2014). La traduction du cadre de lecture

aboutit à une seule polyprotéine qui subit une série de clivages par protéolyse en trois précurseurs : P1, P2 et P3 (Figure 4). P1 est le précurseur des quatre protéines structurales (viral protein en anglais (VP)). Les protéines VP4, VP2, VP3 et VP1 forment la capside virale. Les polypeptides P2 et P3 sont les précurseurs des protéines non structurales 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C et 3D qui sont pour la plupart des enzymes sauf 3B qui correspond à la protéine VPg associée au génome viral (Wafa, 2014).

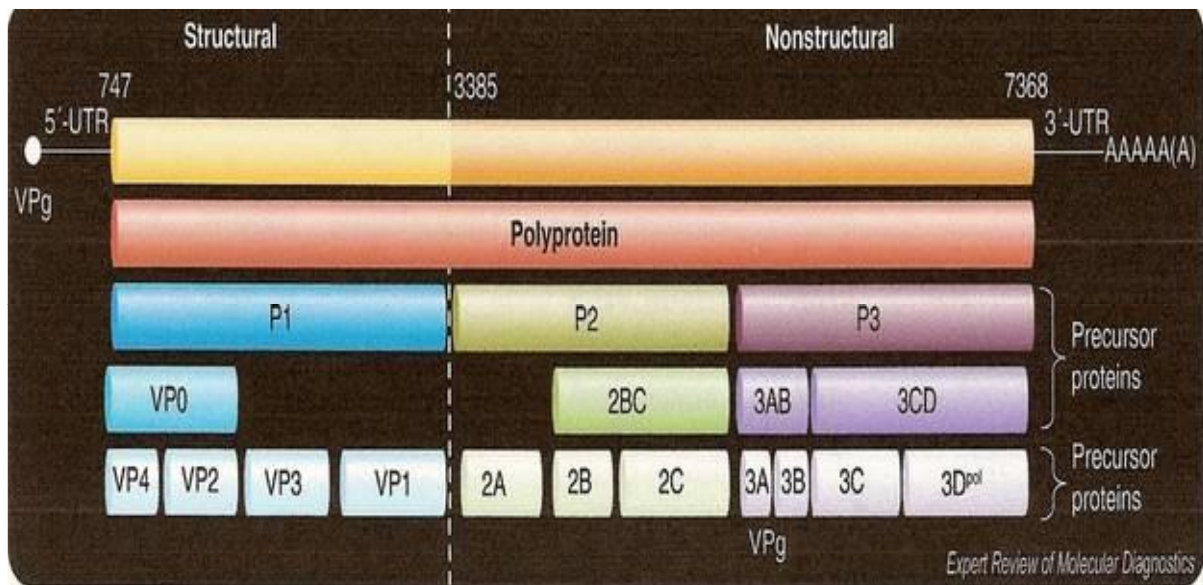


Figure 4: Schéma de l'organisation génomique du *Poliovirus* et des clivages successifs de la polyprotéine (Nasri *et al.*, 2007).

### 1.1.3.3. Etape de la réplication du *Poliovirus*

Le cycle complet de multiplication du *Poliovirus* se déroule exclusivement dans le cytoplasme des cellules infectées (Racaniello & Howley, 2007). C'est l'un des cycles viraux les plus courts il dure environ 8 heures à 37 °C (Figure 5).

#### 1.1.3.3.1. Adsorption, pénétration et décapsidation

La première étape est l'adsorption du virus à la surface de la membrane cellulaire (Figure 5). Les particules virales s'attachent à un récepteur membranaire spécifique, le récepteur humain aux *Poliovirus* (hPVR) ou CD155 (Blondel *et al.*, 2000). C'est au niveau d'un domaine de ce récepteur que se fixe le virus. Cela entraîne des changements de conformation, avec des modifications des protéines VP1 et VP4 permettant ainsi la décapsidation à l'intérieur de la

cellule infectée. Le virus est internalisé dans la cellule par endocytose (Blondel *et al.*, 2000). L'ARN viral est ensuite libéré dans le cytoplasme de la cellule hôte.

#### **1.1.3.3.2. Traduction et réplication du génome viral**

La traduction est l'étape qui va aboutir à la synthèse des peptides viraux. Pour cela, le simple brin d'ARN libéré, de polarité positive, peut directement être traduit en une polyprotéine, comme un ARN messager par les ribosomes humains. La polyprotéine formée donnera, sous l'action de plusieurs protéases, les protéines VP0 (qui sera clivée en VP2 et VP4), VP1 et VP3, ainsi que des protéines non structurales telles que des protéases intervenant dans la réplication et la formation des virions mais aussi l'ARN polymérase ARN dépendante, dite « 3D polymérase », ou « 3D pol » ainsi que la protéine VPg (Figure 5).

Une autre phase importante du cycle est la réplication de l'ARN. La cinétique de réplication connaît une phase exponentielle dans les 3 premières heures suivant l'infection de la cellule hôte, puis une phase linéaire suivie d'une décroissance (Rueckert, 1996). Le processus fait intervenir une protéine virale issue de la traduction de l'ARN : l'ARN polymérase-ARN dépendante. A partir du brin d'ARN à polarité positive, cette enzyme synthétise un brin complémentaire (dit « à polarité négative ») qui servira de matrice à la synthèse des nouveaux ARN des futurs virus (Johnson, 1995).

#### **1.1.3.3.3. Assemblage des virions et libération des particules virales**

Cette étape conduit à la création de nouveaux virions (Figure 5). Une procapside est formée, par l'association de VP0 avec VP1 et VP3 (Blondel *et al.*, 2000). Puis cette procapside va s'assembler avec un brin d'ARN viral. Le clivage de VP0 en VP2 et VP4 permet enfin d'aboutir à une particule stable qui va être libérée lors de l'éclatement de vacuoles à la surface cellulaire, entraînant la lyse de la cellule hôte (Blondel *et al.*, 2000)



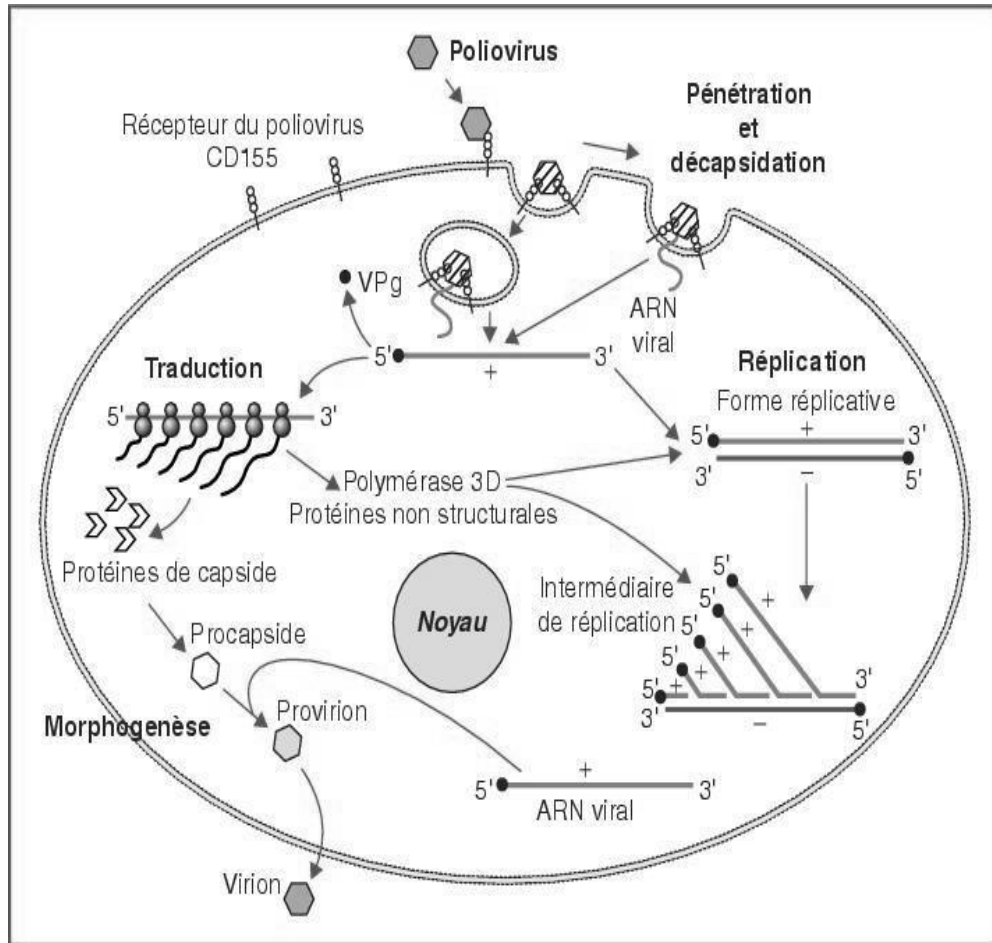


Figure 5: Cycle de multiplication du Poliovirus (Blondel *et al.*, 2006).

#### 1.1.3.4. Réservoir et mode de transmission du *Poliovirus*

La poliomyélite est une maladie infectieuse dont la contamination est interhumaine. En effet, l'homme est le seul hôte naturel du *Poliovirus* (Figure 6). La contagiosité est maximale dans un délai de dix jours avant et après le début des symptômes. Deux modes de transmission du *Poliovirus* sont recensés.

- **Transmission fécale-orale**

La transmission par la voie fécale-orale est le principal mode de propagation de la poliomyélite. Le *Poliovirus* est excrété dans les selles de l'individu infecté pendant six semaines, souvent plus. Ainsi, toute consommation d'aliments ou de boissons souillés par des selles entraîne la contamination d'une autre personne par le *Poliovirus*. Un acteur intermédiaire intervient parfois pour véhiculer le *Poliovirus* : dans certains cas, ce sont les

mouches ou les cafards qui transfèrent l'agent pathogène des selles vers la nourriture (Ryan, 2004).

- **Transmission orale-orale**

Il existe également une transmission orale-orale, mode de contamination prédominant dans les pays où l'assainissement est plus strict (OMS, 2014). Le virus est alors retrouvé dans les aérosols et les crachats émis lors de toux ou d'éternuements et sa transmission est favorisée par une grande proximité des personnes d'une même famille ou d'un même logement. Le risque associé à la transmission orale-orale de la poliomyélite est moins important car le virus ne persiste dans l'oropharynx que pendant environ une semaine après la contamination.

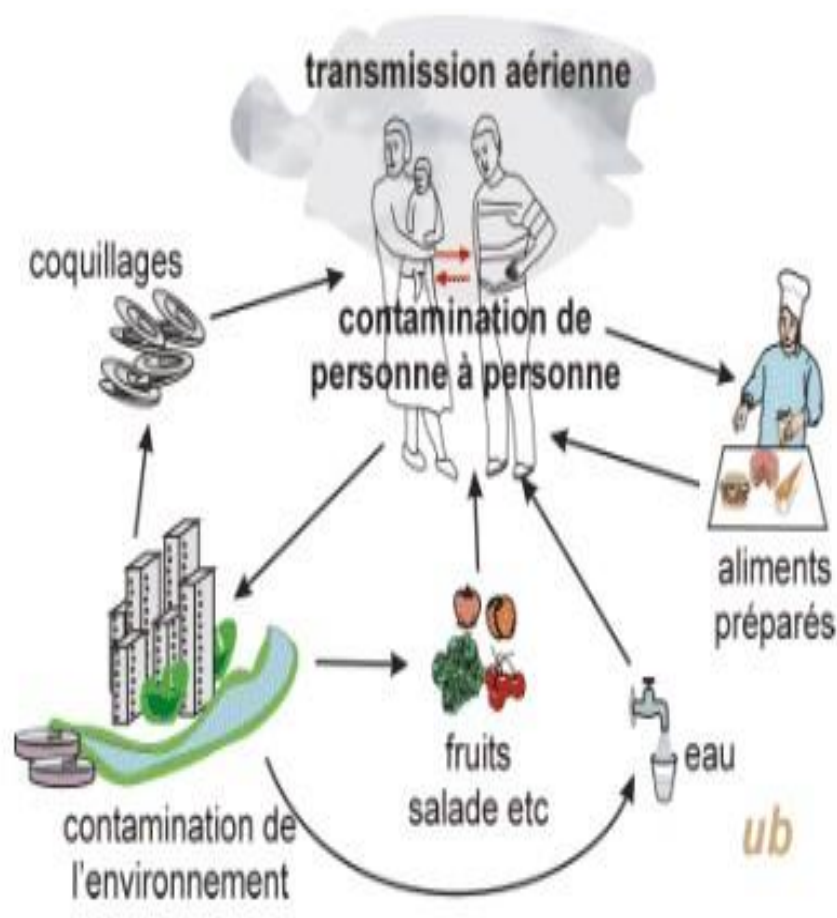


Figure 6: Mode de transmission du *Poliovirus* (Tachi, 2019).

### 1.1.3.5. Effets de la multiplication virale sur la cellule hôte

- **Effet cytopathique**

Lors de la réplication virale, la cellule hôte devient le siège de nombreux changements répertoriés sous le terme de « effets cytopathiques » (ECP) (Blondel *et al.*, 2006). Ces changements sont de type morphologique, avec une condensation du noyau, un arrondissement des cellules infectées, la formation de nombreuses vésicules membranaires et des réarrangements du cytosquelette, mais aussi des modifications biochimiques, avec une inhibition des ARN polymérase par une protéase virale. En microscopie optique, les changements morphologiques les plus notables au niveau des cellules L20B et RD sont l'arrondissement, le détachement et le regroupement des cellules (Figures 7). Ces modifications pourraient favoriser la lyse cellulaire et faciliter la propagation virale (Doedens *et al.*, 1994).

- **Apoptose**

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire en réponse à de nombreux stimuli, incluant les infections virales (Ren, 1990). Ce processus implique un nombre distinct de modifications biochimiques et morphologiques. Bien que certaines manifestations de ce processus telles que la condensation de la chromatine et la déformation du noyau soient similaires à celles de l'ECP, l'induction de ces deux phénomènes implique deux voies différentes. Par des études *in vitro*, il a été montré que le *Poliovirus* (Ammendolia *et al.*, 1999) est capable d'induire l'apoptose sur des lignées de cellules intestinales (Caco-2) et des cellules humaines (HeLa). (Girard *et al.*, 1999).

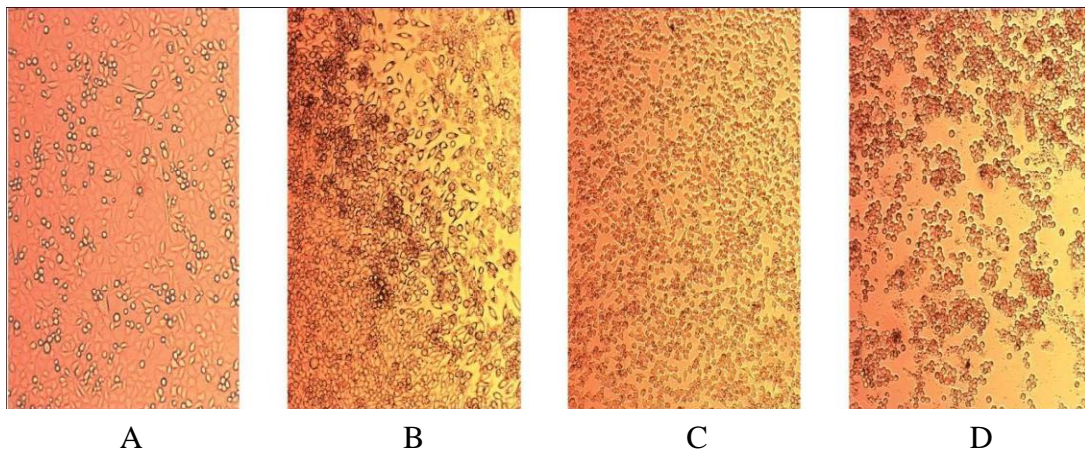


Figure 7: Aspects microscopiques des cellules L20B avec présence d'ECP. De la gauche vers la droite : Saine (A), Toxicité (B), ECP 3+ (C), ECP 4+ (D) (Tachi, 2019).

### **1.1.3.6. Pouvoir pathogène du *Poliovirus***

#### **1.1.3.6.1. Physiopathologie du *Poliovirus***

Le *Poliovirus* se multiplie principalement dans l'intestin grêle, après avoir franchi la barrière stomacale grâce à sa résistance au pH acide, mais aussi dans l'oropharynx. Il se multiplie en particulier dans les tissus lymphoïdes (amygdales et plaques de Peyer) (Iwasaki *et al.*, 2002). Il pourrait franchir la barrière de l'épithélium intestinal par transcytose à travers les cellules M (microfold) qui recouvrent les plaques de Peyer et qui sont spécialisées dans l'échantillonnage des macromolécules (Ouzilou *et al.*, 2002). A cette étape, le virus est excrété dans les selles pendant plusieurs semaines. A partir des sites primaires de multiplication, le *Poliovirus* migre vers les ganglions lymphatiques régionaux (cervicaux et mésentériques) puis rejoint la circulation sanguine. Dans une minorité de cas, le *Poliovirus* présent dans le sang infecte des tissus extra-neuraux (probablement des tissus graisseux bruns, réticuloendothéliaux et/ou musculaires), amplifiant ainsi la virémie (Figure 8). Les cellules cibles privilégiées du *Poliovirus* dans le système nerveux central sont les neurones moteurs localisés dans les cornes ventrales des régions cervicales et lombaires de la moelle épinière. Le *Poliovirus* peut également infecter les neurones du cortex moteur et de la formation réticulaire, ainsi que certains noyaux moteurs du tronc cérébral. La destruction des neurones moteurs infectés est responsable des paralysies flasques des membres, et conduit à l'atrophie des muscles concernés (Figure 9). La poliomyélite est mortelle quand les neurones moteurs innervant les muscles respiratoires sont atteints (10 % des cas de PPA).

#### **1.1.3.6.2. Manifestation clinique de la poliomyélite**

Suite à une infection par un *Poliovirus*, les différents signes cliniques sont regroupés sous le terme de poliomyélite antérieure aiguë. Environ 90 % des infections sont asymptomatiques ou si peu symptomatiques qu'elles passent inaperçues (Global polio éradication initiative, 2015). Les enfants sont principalement touchés.

##### **Signes généraux non spécifiques**

Les premiers signes d'une infection par le *Poliovirus* sont peu spécifiques, mais caractéristiques d'une infection virale. Le patient présente une asthénie, de la fièvre, des céphalées ainsi que des vomissements (Guerin *et al.*, 2007). L'infection peut se limiter à cette symptomatologie : c'est la poliomyélite abortive. Celle-ci n'est pas forcément détectée.

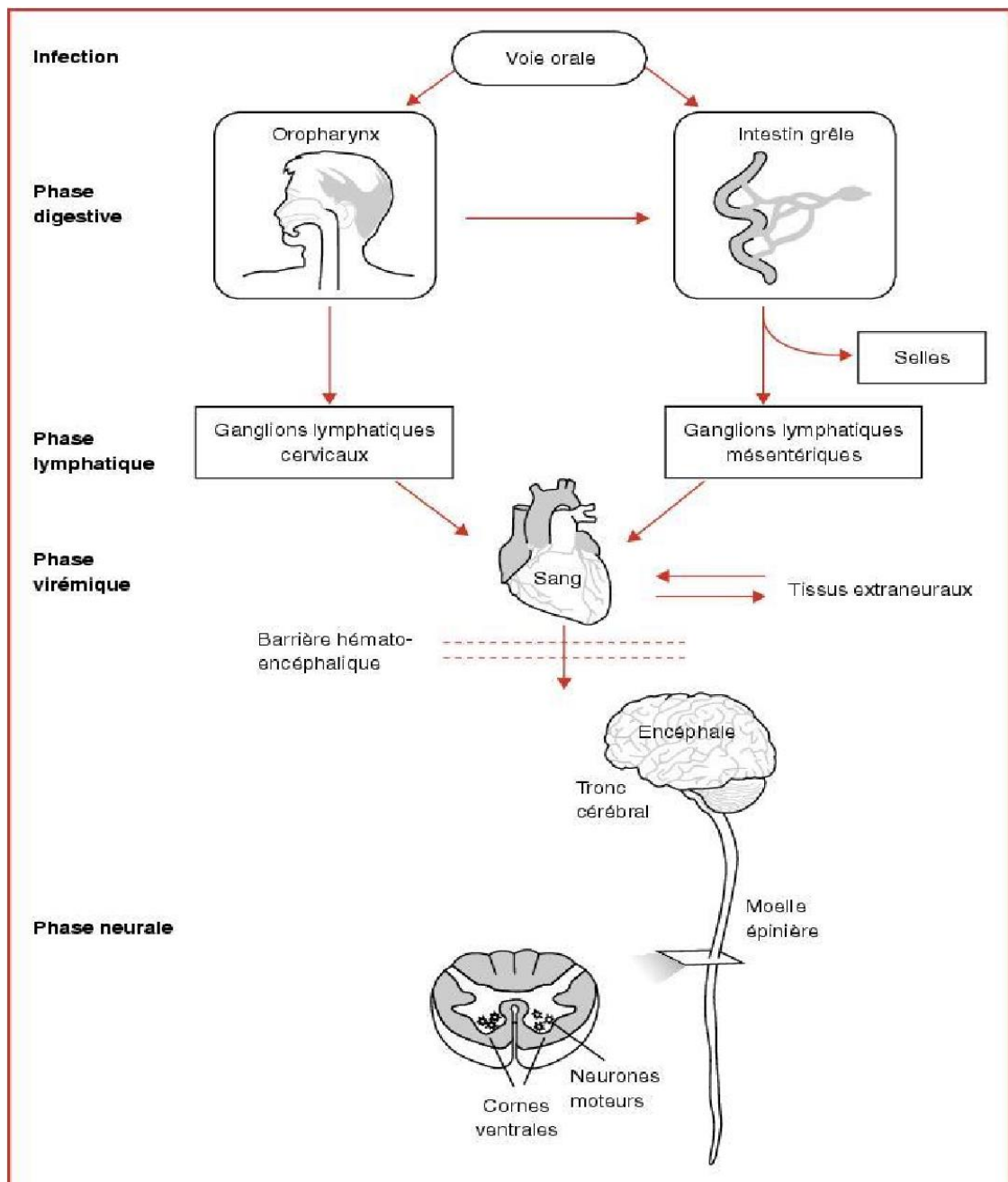


Figure 8: Pathogenèse de la poliomyélite  
(Blondel *et al.*, 2006).

### La Paralysie Flasque Aiguë (PFA)

Bien que rare, la PFA concerne une infection sur deux cents. Elle est précédée de signes généraux avec un tableau de méningite. Elle s'installe rapidement, est souvent asymétrique et concerne très fréquemment les membres inférieurs (Guerin *et al.*, 2007) (Figure 9). La PFA

signe l'atteinte neuronale du *Poliovirus*. La multiplication du virus est responsable de la mort cellulaire de neurones moteurs, ce qui entraîne une incapacité fonctionnelle des muscles qui alors s'atrophient. C'est le *Poliovirus* de type 1 qui cause le plus de paralysies. Les muscles touchés sont les quadriceps, les triceps et les jambiers (Dizien *et al*, 1993). Les signes de paralysie s'accompagnent de myalgies. Les muscles sont flasques et les réflexes ostéo-tendineux sont diminués, voire abolis (Guerin *et al*, 2007). En revanche, il n'y a aucun trouble sensitif.



Figure 9: Enfant atteint d'une paralysie des membres inférieurs  
(Tan, 2016).

### **Poliomyélite bulbaire**

La poliomyélite bulbaire est la forme neurologique la plus sévère de paralysie. Elle survient dans 10 % des cas de formes paralysantes et se caractérise par une paralysie des muscles respiratoires (Huraux *et al*, 2003). C'est en fait le virus qui atteint la région bulbaire du tronc cérébral et altère les capacités respiratoires mais aussi la parole et la déglutition (Guerin *et al*, 2007). Des signes cardiovasculaires sont également observés, tels qu'une tachycardie et/ou une hypertension artérielle. Un contexte de myocardite peut aggraver la clinique. Le pronostic vital est alors engagé. La situation peut évoluer vers des troubles de la conscience, puis le coma. La paralysie étant irréversible, le patient décède d'arrêt respiratoire dans 5 à 10 % des cas (Dizien *et al.*, 1993).

## **Syndrome Post-Poliomyélique (SPP)**

Bien que l'organisme développe une immunité vis-à-vis du *Poliovirus* responsable de l'infection, environ 40 % des patients qui ont développé une PFA présentent, par la suite, un syndrome post-poliomyélique. Celui-ci se traduit par une nouvelle atteinte des membres avec une fatigue, des douleurs puis une atrophie handicapante, à progression lente. Il peut s'agir des membres endommagés lors de l'infection initiale mais aussi de membres sains jusque-là. Une aggravation de la gêne respiratoire préexistante peut également apparaître (Boyer *et al.*, 2010). Le syndrome post-poliomyélique peut survenir dans les quinze à quarante ans suivant les premières paralysies.

### **1.1.4. Diagnostic biologique d'une infection poliomyélique**

#### **1.1.4.1. Mise en évidence du *Poliovirus* par culture cellulaire**

Pour cela, il faut effectuer deux coprocultures dans les deux semaines suivant l'apparition des symptômes. Un premier prélèvement est réalisé, puis un second, à un à deux jours d'intervalle (Guerin *et al.*, 2007). Les deux échantillons doivent être conservés entre 4 et 8°C lors de l'acheminement vers le laboratoire d'analyses. Une suspension, réalisée avec chaque échantillon préalablement traité pour éliminer les bactéries et les spores sera inoculée à des cultures cellulaires, pour observation d'un effet cytopathique (Figure 7). Les lignées cellulaires de choix pour inoculer le virus sont les cellules RD (rhabdomyosarcome) humaines (spécifiques des *Entérovirus*) et les cellules L20B murines (spécifiques des *Poliovirus* par la présence de récepteurs de poliovirus) (Wood &Hull, 1999 ; Guérin *et al.*, 2007).

#### **1.1.4.2. Identification par amplification génomique (PCR).**

On peut mettre en évidence la présence de l'ARN viral dans des échantillons de liquides ou de tissus organiques et identifier les PVDV. La RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction) permet, à partir de l'ARN du *Poliovirus*, de synthétiser le brin d'ADN complémentaire à l'aide de la reverse transcriptase ou transcriptase inverse. Puis le brin d'ADNc obtenu est amplifié à l'aide d'une polymérase. C'est l'ADN amplifié qui permet l'identification du génotype et de l'origine du virus impliqué par la méthode de séquençage (Guérin *et al.*, 2007).

#### **1.1.4.3. Sérologie anti-Poliovirus**

Différentes immunoglobulines (Ig) sont recherchées : les IgM, produites initialement en grande quantité, persistant dans le sérum pendant 3 mois et les IgG, dont le taux augmente régulièrement mais à durée de vie illimitée. Des IgA peuvent également être détectées. Le taux résiduel d'IgA sériques est relativement faible comparé au taux d'IgG, ce qui les rendent moins intéressantes.

Pour cela, deux prélèvements sont effectués à environ quinze jours d'intervalle. Pour quantifier les Ig, plusieurs méthodes peuvent être choisies. La technique ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) est la méthode de choix mais la séroneutralisation sur cultures cellulaires et l'immunofluorescence sont parfois utilisées (Guerin *et al*, 2007).

### **1.1.5. Traitement et prophylaxie des infections poliomyélitiques**

Le traitement curatif de la poliomyélite est encore uniquement symptomatique, à défaut de pouvoir disposer de traitements antiviraux efficaces et sans danger. La prophylaxie de la poliomyélite est réalisée par l'emploi en parallèle de deux types de vaccins trivalents protégeant contre les trois sérotypes de *Poliovirus* : le vaccin polio inactivé (VPI) et le vaccin polio oral VPO. L'emploi de ces vaccins a permis de réduire massivement l'incidence de la poliomyélite. Le VPI, mis au point par Jonas Salk, a été introduit en 1955 (Salk, 1955). Il est préparé à partir de souches sauvages des trois sérotypes de *Poliovirus* dont le pouvoir infectieux est inactivé au formol. Il est administré par voie parentérale. Il a une parfaite innocuité, y compris pour les personnes immunodéprimées et induit une immunité générale protectrice contre la poliomyélite paralytique. Cependant, le VPI nécessite des injections de rappel et ne bloque pas la transmission du virus sauvage parce qu'il n'induit qu'une faible immunité intestinale. Toutefois, ce vaccin s'est montré capable d'éliminer la poliomyélite dans les pays industrialisés qui l'ont utilisé exclusivement (Pays-Bas, Suède et Finlande). Le VPO, développé par Albert Sabin, a été introduit en 1956 (Sabin, 1973). Il est constitué de souches vivantes atténuées des trois sérotypes de *Poliovirus*. Ces souches ont été obtenues après de multiples passages *in vitro* sur des cultures de cellules de testicule et de rein de singe et *in vivo* sur de la peau de singe après inoculation intradermique. Elles peuvent reproduire le processus infectieux naturel du *Poliovirus* dans le tractus digestif et conférer ainsi une bonne immunité générale et locale sans provoquer de maladie neurologique. Ainsi, le VPO empêche l'infection intestinale ultérieure par le virus sauvage et bloque sa propagation. De plus, l'immunité induite est rapide et durable et ne nécessite pas de nombreux rappels. Les



propriétés de ce vaccin ainsi que son mode d'administration aisé et son prix de revient peu élevé en ont fait un candidat de choix pour les campagnes de vaccination massive notamment dans les pays en voie de développement. L'inconvénient principal du VPO réside dans le fait que les souches atténuées, qui sont thermosensibles, peuvent recouvrer un phénotype neurovirulent lors de leur multiplication dans l'intestin à 37 °C, et être à l'origine de rares cas de poliomyélite paralytique associée à la vaccination (PPAV). (Kew *et al*, 2005).

## **1.2. *Ocimum gratissimum***

### **1.2.1. Histoire de *Ocimum gratissimum***

*Ocimum gratissimum* est originaire d'Amérique, d'Afrique, d'Inde et d'Asie du Sud-Est (Kpokame, 2019). *Ocimum gratissimum* également appelé Tulsi est un symbole important dans les traditions de la religion hindou. Il est considéré comme une plante sacrée qui identifie l'épouse de Vishnu, Lakshmi, symbole de l'harmonie, la beauté et déesse de la fertilité. Il est donc également cultivé dans les jardins familiaux et des pots (Figure 10).



Figure 10: Feuilles de *Ocimum gratissimum*

### **1.2.2. Noms de *Ocimum gratissimum***

- Noms vernaculaires : en Français (basilic arbustif, gros basilic et basilic à grande feuille), en Anglais (east indian basil et wild basil), en Baoulé (awlomagnin), en Beninois (Tchiayo, Bonurogu), en Congolais (Baumier)
- Nom scientifique : *Ocimum gratissimum* L.

### **1.2.3. Classification systématique de *Ocimum gratissimum***

*Ocimum gratissimum* est une plante reconnue au niveau mondial dont la classification systématique est la suivante (Manampisoa, 2021) :

Règne : Végétal

Embranchement : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Asteridae

Ordres : Lamiales

Famille : Lamiaceae/Labiatae

Sous-famille : Nepetpideae

Genre : *Ocimum*

Espèce : *Ocimum gratissimum*

### **1.2.4. Localisation et répartition géographique de *Ocimum gratissimum***

*Ocimum gratissimum* est originaire de l'Inde, elle a été introduite en Afrique et se développe surtout dans les champs abandonnés et autour des villages. C'est une espèce pantropicale, à présent répandue dans toutes les régions intertropicales, du fait de sa facilité d'adaptation (Lebrun & Stork, 1991). Elle pousse aux alentours des villages, de la Gambie au Cameroun et est cultivée dans toute la Côte d'Ivoire (Aké-Assi, 2012).

### **1.2.5. Morphologie de *Ocimum gratissimum***

*Ocimum gratissimum* est une herbacée, arbuste ou arbrisseau pérenne et aromatique. Généralement haut de 0,4 à 1,5 m mais quelque fois elle peut atteindre jusqu'à 2 m de haut en fonction des conditions environnementales. La plante possède une tige dressée, arrondie-quadrangulaire, très ramifiée et ligneuse. Elle présente un épiderme s'exfoliant en bande à la base plus ou moins glabre. Elle devient pubescente aux nœuds et sur les axes des inflorescences. Les axes des inflorescences sont tomenteux à poils blancs et souvent aussi à glandes sessiles. Ses feuilles sont étalées à défléchies de forme elliptique ou ovées à largement ovées et pétiolées. Sa taille varie de 1,5 à 12 cm de longueur et 1 à 5 cm de largeur, serrées, souvent aiguées acuminées ou obtuses au sommet, glabre à pubescente. Sa face inférieure est parfois tomenteuse, souvent plus noire à celui de la face supérieure, avec un

pétiole de 5 à 30 mm de long. Son inflorescence se présente sous une forme verticillée ou en grappe de 10 à 15 cm, quelques fois ramifiée à la base, dense, bractée sessile, ovée, lancéolée, colorée et rapidement caduque. Sa période de floraison se situe entre novembre à mai, la plante porte des petites fleurs blanches, blanc rose ou rouge carmin disposées en longue grappe (Manampisoa, 2021).

#### **1.2.6. Composition chimique de *Ocimum gratissimum***

L'huile essentielle de *Ocimum gratissimum* est composée de : thymol (43,45 %), para-cymène (12,26 %) et  $\gamma$ -terpinène (12,11 %) qui sont majoritaires (Kpodekon *et al.*, 2013). Une étude conduite par Oussou *et al.* (2010) a permis d'obtenir dans l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum*, le thymol (34,6 %), le p-cimène (25,2 %),  $\alpha$ -sélinène (6,8 %), le myrcène (5,4 %), le (E)-b-caryophyllène (4,9 %) et  $\alpha$ -thujène (4,5 %). Les variations observées sont liées à l'écologie, à la période au cours de laquelle les plantes ont été récoltées dans l'année et surtout à la structure pédologique sur laquelle les plantes ont poussé.

#### **1.2.7. Tri phytochimique de *Ocimum gratissimum***

Le criblage phytochimique montre qu'en dehors de la présence des trois (03) groupes de composés (phénoliques, azotés, stéroïdes et terpénoïdes), nous avons les dérivés cyanogéniques, les mucilages, et les composés réducteurs. Les composés phénoliques sont présents à travers les tanins (catéchiques, galliques), les flavonoïdes (flavones), les leucoanthocyanes et les anthracéniques (libres) en proportions variables (Tableau I).

Tableau I: Tri phytochimique de *Ocimum gratissimum* (Kpètèhoto *et al.*, 2017).

Groupes chimiques / Composés chimiques		Observations	Résultat		
Composés phénoliques	Tanins	Tanins catéchiques	Précipité Rose	+	
		Tanins galliques	Teinte Bleu	++	
	Flavonoïdes	Flavones	Coloration orangée	+++	
		Leucoanthocyanes	Col rouge cerise	++	
		Anthocyanes	Abs col rouge ou bleue	-	
		Libres	Coloration rouge	+++	
		O-Hétéroside	Abs col rouge intense	-	
	Dérivés anthracéniques	Combinés	C-Hétéroside	Abs col rouge intense	-
			Comp réducteur	Précipité rouge vif	++
		Coumarines	Pas de fluorescence	-	
Composés azotés	Alcaloïdes	Précipité Louche	++		
Stéroïdes et terpénoïdes	Stéroïdes	Faible col rouge pourpre	+		
	Saponosides	Mousse de 1 à 2 cm	+++		
	Triterpènes	Abs de col violette	-		
	Cardenolides	Abs de col bleue	-		
	Mucilages	Précipité floconneux	+++		
	Dérivés cyanogéniques	Présence col marron	++		

Significations des symboles : « + » : Faible présence ; « ++ » : Présence modérée ; « +++ » : Forte présence ; « - » : Absence.

### 1.2.8. Usages de *Ocimum gratissimum*

*Ocimum gratissimum* est utilisée pour traiter de nombreux maux tels que l'otite et l'angine, les céphalées, les douleurs après l'accouchement, les règles trop abondantes et les saignements de nez, la coqueluche et la pneumonie, certaines diarrhées et même l'épilepsie. L'huile essentielle de cette plante, encore assez peu connue en aromathérapie, est cependant répertoriée comme bactéricide (staphylocoques, streptocoques, pneumocoques) et parasiticide. Elle régule le système nerveux, stimule la digestion et soulage l'arthrose (Akinmoladun, 2007). La plante est utilisée de façon infusée, décoctée ou macérée. *Ocimum*

*gratissimum* étant connu pour ces propriétés antimicrobiennes, antiparasitaires, antibactériennes, notre travail consiste à mettre l'accent sur ces propriétés antivirales.

### **1.3. Mécanismes d'action des antiviraux sur les virus à ARN**

Il est intéressant de classer ces composés en fonction de leurs points d'impact dans le cycle de réplication virale (Baudot, 1997) :

- Action au niveau de la fixation du virus : empêche le virus de se fixer à la paroi cellulaire (composés polyanioniques)
- Action au niveau de la pénétration du virus : empêche la pénétration du virus en se fixant sur des chaînes glycosidiques de l'enveloppe virales (lectines)
- Action au niveau de la décapsidation du virus (Amantadine, Chalcone)
- Action au niveau de la rétrotranscription : se fixe sur le site actif de la transcriptase inverse et empêche la fixation du substrat naturel (Zidovudine)
- Action au niveau de l'intégration : inhibe l'action de l'intégrase (curcumine)
- Action au niveau de la transcription (néomycine B)
- Action au niveau de la maturation des protéines virales : inhibe l'action de la protéase (saquinavir)
- Action au niveau du processus de bourgeonnement : bloque l'expression d'un ou de plusieurs gènes viraux (Interférons).

### **1.4. Mise en évidence et mesure de l'activité antivirale**

Les techniques de mise en évidence et de mesure de l'activité antivirale utilisées en virologie ont beaucoup évolué cette dernière décennie. On distingue : Les systèmes cellulaires, détection ou quantification de l'ADN viral par les méthodes d'hybridation ADN-ADN, détection ou quantification des transcrits et antigènes viraux par immunofluorescence, évaluation de l'activité transformante du virus par immunofluorescence, évaluation de l'activité enzymatique des protéines virales. Dans cette dernière méthode, l'enzyme virale est extraite et purifiée à partir de cellules surinfectées puis son activité est testée en présence ou en absence de drogue. Les cellules sont traitées par les antiviraux, puis l'activité de l'enzyme extraite et purifiée, est analysée ((Ballout, 2005).

## 2.1. Matériels

### 2.1.1. Cadre d'études

Cette étude a été réalisée au Laboratoire d'Agrovalorisation de l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa et à l'Unité des Virus du Système Nerveux au Département des Virus Epidémique de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire qui est le Centre National de Référence pour la Poliomyélites et les virus épidémiques. Ce centre travaille en collaboration avec le Programme Elargi de Vaccination (PEV) du Ministère de la Santé, dans le cadre de la surveillance de la circulation des entérovirus et la confirmation des cas suspects de paralysie flasque aigüe (PFA).

### 2.1.2. Matériel Biologique

#### 2.1.2.1 Matériel végétal

Le matériel végétal se constitue de feuilles de *Ocimum gratissimum*. Les feuilles de *Ocimum gratissimum* ont été récoltées en décembre 2021 à Daloa dans la région du Haut-Sassandra située au centre-ouest de la Côte d'Ivoire. Ces feuilles ont ensuite été passées sous un filet d'eau pour éliminer la poussière puis sécher sur un linge propre, dans un endroit sec, ventilé et à l'abri de la lumière. Après cinq jours, elles ont été réduites en poudre et tamiser à l'aide d'un broyeur avec système de tamisage incorporé (Figure 11).



2.1 Figure 11: Feuilles (a) et poudre (b) sèches de *Ocimum gratissimum*

Les souches virales utilisées sont des souches de *Poliovirus 1* (Sabin Like). Elles sont issues des selles provenant de la Côte d'Ivoire, du Mali et du Burkina Faso dans le cadre de la surveillance nationale des cas de PFA. Ces selles ont été reçues quotidiennement au Laboratoire de poliomyélite pour la recherche de *Poliovirus* sauvages. Après traitement, isolement virale et identification par RT-PCR (pour les cas de suspect Polio), les souches virales sont conservées à -20 °C pour d'éventuelles recherches (Figure 12).

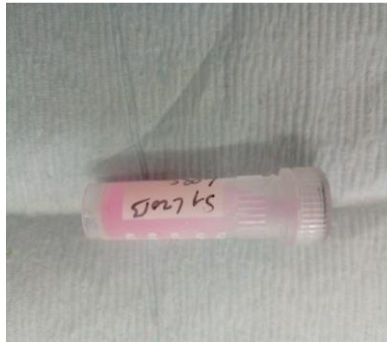


Figure 12: Souche de Poliovirus 1

### 2.1.2.3. Lignée cellulaire

La lignée cellulaire L20B (cellules de souris génétiquement modifiées) qui a été utilisée pour les tests de cytotoxicité et les tests antiviraux sur le *Poliovirus 1*, a été fournie par l'Unité de Culture Cellulaire de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

Les lignées cellulaires ont été utilisées sous forme de suspensions cellulaires L20B. Les suspensions de cellules ont été préparées à la concentration de  $2 \times 10^5$  Cellules/mL après l'action de la trypsine suivie d'un dénombrement sur hématimètre de *Neubauer*. Ces lignées cellulaires sont conditionnées dans des tubes stériles de 50mL et conservées à +4 °C (Figure 13). Avant l'emploi les tubes être homogénéisés à température ambiante. Toutes les suspensions de cellules ont été distribuées à raison de 100 µL de cellules dans chaque cupule d'épreuve.



Figure 13: Tube de suspension cellulaire saine de cellules L20B

### **2.1.3. Matériel technique**

#### **2.1.3.1. Appareillage et équipements**

Les appareils et équipements utilisés au cours de cette étude ont été fournis par le laboratoire d'Agrovalorisation de l'Université Jean Lorougnon Guedé de Daloa et l'Unité des virus du Système Nerveux du Département des Virus Epidémique de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Une broyeuse mécanique (Retsch®) pour rendre en poudre les feuilles sèches d'*O. gratissimum*. Une étuve de type (Mettler®) pour le séchage et l'évaporation des extraits. Une balance électronique de précision (Sartorius®) pour la pesée des poudres des feuilles séchées et des extraits. Les manipulations ont été effectuées sous un poste de sécurité microbiologique de type 2 (PSM 2) (Esco®). Une aide pipette (Accu jet® pro) a été utilisée pour effectuer les différentes dilutions. Un vortex (Vortex Genie2®) et un shaker (Neuaton®) ont été utilisés pour homogénéiser les dilutions et les solutions mères (aqueuse et hydroéthanolique) avant utilisation. Une balance de précision (Sartorius®) a permis de peser le matériel végétal. Un incubateur (Mettler®) a permis d'incuber les microplaques. Un microscope inversé (Motic) a servi à observer les ECP (effets cytopathiques). Le broyeur (Retsch®) a permis de réduire les feuilles en poudre ; un mixeur (blender®) a permis de mélanger la poudre de feuilles et les solvants ; une étuve (Mettler®) a permis de sécher les filtrats ; une centrifugeuse (Eppendorf®) a été utilisée pour centrifuger les solutions mères.

#### **2.1.3.2. Réactifs**

Les réactifs utilisés étaient :

-le Minimum Essential Medium (MEM) à 2 % de sérum de veau foetal (milieu de croissance et de survie des cellules) a servi de diluant lors de la préparation des dilutions d'extraits et des différents tests (antiviraux et cytotoxicité) ;

- l'eau distillée et l'éthanol 90 °C ont été utilisés respectivement pour l'extraction aqueuse et l'extraction hydroéthanolique.

#### **2.1.3.3. Consommables**

Les tubes à fond conique type Falcon® de 15 mL, les tubes Eppendorf® de 4,5 mL, les pipettes stériles (1 mL et 10 mL) ont été utilisés pour la préparation des solutions mères, les



dilutions décimales et les dilutions au demi. Les microplaques de 96 puits (12/8) (Cell-B6-P), les fermetures de plaques, les cônes et embouts stériles de 100 µL ont été utilisés pour les tests de cytotoxicité et les tests antiviraux. Les gants de tailles moyennes ont permis de se protéger. Un lot de coton hydrophile a permis de filtrer pendant l'extraction des principes actifs. Une boîte de culture cellulaire T25 de 25 cm<sup>2</sup> (Nunc®) a permis d'amplifier la souche virale.

## **2.2. Méthodes**

### **2.2.1. Préparation des extraits aqueux et hydroéthanolique**

La préparation de l'extrait aqueux a été effectuée selon la méthode de Zihiri *et al.* (2003). Ainsi, 100 g de poudre de la plante ont été dissout dans 1 litre d'eau distillée. Le mélange a été homogénéisé dans un mixeur 10 fois pendant 2 minutes avec des arrêts de 2 minutes après chaque tour. L'homogénat a été versé dans un tissu blanc propre puis presser afin de recueillir le filtrat dans un récipient propre. Ce premier filtrat a été encore filtré 4 fois successivement avec du coton hydrophile disposé au bout des entonnoirs. Le filtrat obtenu a été évaporé à l'étuve à 55 °C pendant 4 jours. La poudre obtenue qui représente l'extrait aqueux totale a été recueilli dans un bocal stérile et conserver à +4 °C. Le rendement d'extraction estimé par le rapport :

$$R = (\text{masse de l'extrait sec} / \text{masse de la plante utilisée}) \times 100.$$

La préparation de l'extrait hydroéthanolique a été aussi effectuée selon la méthode de Zihiri *et al.* (2003). Seulement l'eau distillée est remplacée par l'alcool 70 °C (700 mL d'alcool dissout dans 300 mL d'eau distillée). Ainsi, 100 g de poudre de la plante ont été dissout dans l'alcool 70 °C. Le mélange a été homogénéisé dans un mixeur 10 fois pendant 2 minutes avec des arrêts de 2 minutes après chaque tour. L'homogénat a été versé dans un tissu blanc propre puis presser afin de recueillir le filtrat dans un récipient propre. Ce premier filtrat a été filtré 4 fois successivement avec du coton hydrophile disposé au bout de 4 entonnoirs. Puis une seconde fois avec du coton hydrophile disposé au bout de 4 autres entonnoirs. Le filtrat obtenu a été évaporé avec une étuve (Memmert®) à 55 °C pendant 4 jours. Le filtrat obtenu a été évaporé avec une étuve (marque) à 55 °C pendant 4 jours. La poudre obtenue qui

représente l'extrait hydroéthanolique totale a été recueilli dans un bocal stérile et conserver à +4 °C. Le rendement d'extraction estimé par la formule :

$$R = (\text{masse de l'extrait sec} / \text{masse de la plante utilisée}) \times 100.$$

### 2.2.2. Préparation des dilutions des extraits aqueux et hydroéthanolique

La solution mère a été préparée à partir de 10 mg de l'extrait aqueux pesé à l'aide d'une balance de précision électronique puis dissout dans 10 mL de MEM 2 % pour une concentration initiale ( $c = 1 \text{ mg/mL}$ ). Le mélange a été homogénéisé à l'agitateur à 2500 tours/min pendant 20 minutes puis centrifuger à 4000 tours/min pendant 20 minutes, avant utilisation. Deux types de dilution ont ensuite été préparées Les faibles dilutions ou (double dilution de facteur 1/2) et les fortes dilutions (ou dilutions décimales de facteur 1/10). La Figure 14 montre les tubes contenant les extraits dilués aqueux et hydroéthanoliques) de *Ocimum gratissimum*. Pour les faibles dilutions, distribuer 1mL de diluant (MEM 2 %) dans 9 tubes Eppendorf® de 4,5 mL. Ajouter 1mL de l'extrait pur aqueux dans le premier tube pour obtenir la dilution 1/2. Puis transférer 1 mL de la dilution 1/2 dans le deuxième tube pour obtenir la dilution 1/4. Effectuer ainsi les dilutions en cascade afin d'obtenir au final les dilutions 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 avec des concentrations allant de  $c = 0,5 \text{ mg/mL}$  à  $c = 2 \text{ }\mu\text{g/mL}$ . Pour les fortes dilutions (dilution au dixième), distribuer 9 mL de diluant (MEM 2 %) dans 9 tubes coniques de 15 mL. Ajouter 1 mL de l'extrait pur aqueux dans le premier tube pour obtenir la dilution  $10^{-1}$ . Transférer 1mL de la dilution  $10^{-1}$ , dans le deuxième tube pour obtenir la dilution  $10^{-2}$ . Effectuer ainsi des dilutions décimales successives pour avoir au final les dilutions  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  avec des concentrations allant de  $c = 0,1 \text{ mg/mL}$  à  $c = 0,000001 \text{ }\mu\text{g/mL}$ .

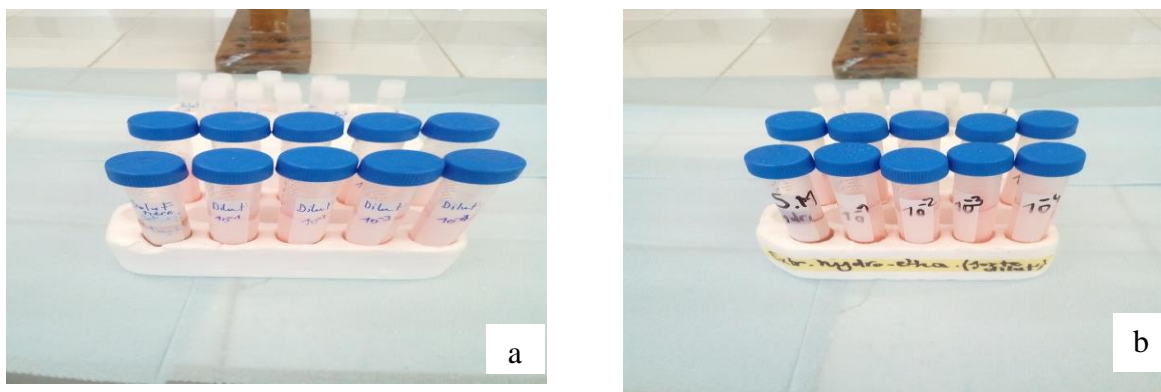


Figure 14: Préparations des différentes dilutions des extraits aqueux (a) et hydroéthanolique (b).

### 2.2.3. Amplification et dilution des souches virales (*Poliovirus 1*)

Un volume de 0,5 mL de la souche virale de (*Poliovirus 1* Sabin Like) conservée à -20 °C a été prélevé puis inoculé dans une boîte T25 contenant 5 mL de cellules L20B. Après ECP total (24 heures), 100 µL de la suspension est prélevé et dissout dans 900 µL de MEM 2 % pour obtenir la dilution de virus  $10^{-1}$ . Ensuite, 1 mL de la dilution de virus  $10^{-1}$  est prélevé et dissout dans 9 mL de MEM 2 % pour aboutir à une dilution virale de  $10^{-2}$ . Cette opération est répétée jusqu'à la dilution  $10^{-4}$ . Cette opération permet d'avoir une concentration virale à  $c = 100$  CC DI<sub>50</sub> /100 mL pour un titre viral de  $c$  compris entre  $10^6$  et  $10^7$  CC DI<sub>50</sub> /100 mL, pour un ECP total à J1.

### 2.2.4. Test de cytotoxicité en présence de l'extrait aqueux et hydroéthanolique

Les tests de cytotoxicité ont été effectués selon la méthode décrite par **Ojo et al. (2009)**. Sur une microplaque de 96 puits, distribuer 100 µL de l'extrait aqueux pur dans les 4 premiers puits de la 1<sup>e</sup> colonne à l'aide d'une pipette de 100 µL et distribuer 100 µL de chaque faible dilution dans les 4 premiers puits des autres colonnes jusqu'à la 10<sup>e</sup> colonne, en raison d'une dilution par colonne. Sur la même microplaque, distribuer 100 µL des fortes dilutions dans les 4 derniers puits à partir de la 2<sup>e</sup> jusqu'à la 10<sup>e</sup> colonne en raison d'une dilution par colonne comme l'indique la figure 15. Distribuer 100 µL de cellules L20B dans tous les puits ayant reçu les extraits et 200 µL de cellules L20B dans les 4 premiers puits de la 12<sup>e</sup> colonne pour servir de témoin cellulaire. Fermer la plaque à l'aide d'une fermeture de plaque puis l'incuber pendant 3 jours à 37 °C. Observer la morphologie des cellules (arrondissement, rétrécissement, détachement) au microscope inversé après 24, 48 et 72 heures d'incubation.

Pour l'extrait hydroéthanolique, le test de cytotoxicité a été effectué selon même méthode décrite par **Ojo et al. (2009)** comme précédemment, sur une autre plaque de 96 puits. Ainsi, l'ordre de répartition et de distribution des quantités de suspensions reste la même. Ici, l'extrait hydroéthanolique remplace l'extrait aqueux. A la fin de la distribution, fermer la plaque à l'aide d'une fermeture de plaque puis l'incuber à 37 °C pendant 3 jours. Observer la morphologie des cellules (arrondissement, rétrécissement, détachement) au microscope inversé après 24, 48 et 72 heures d'incubation.

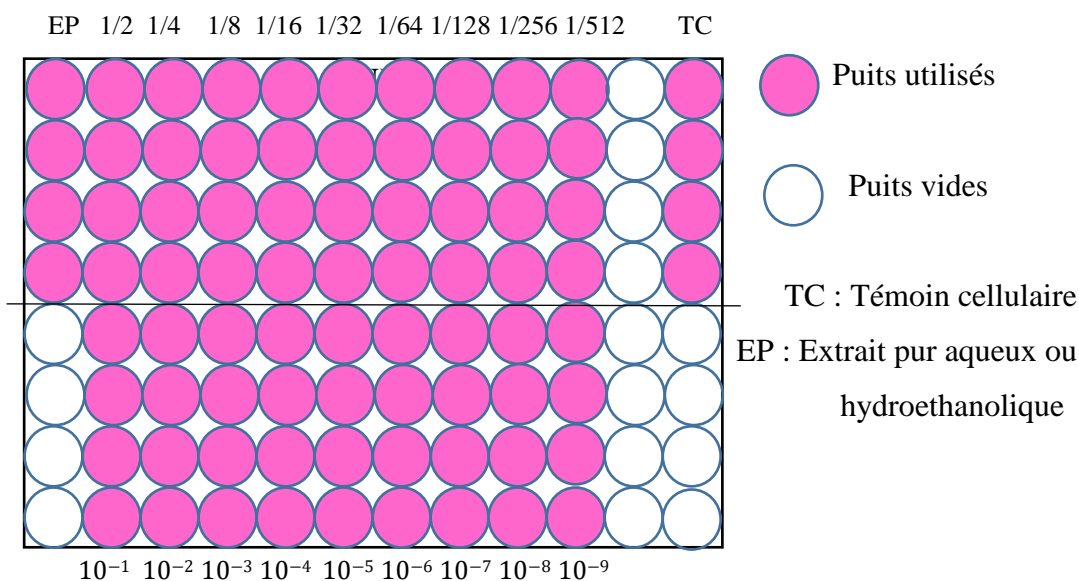


Figure 15: Plan de plaque du test de cytotoxicité des extraits aqueux et hydroéthanolique sur les cellules L20B

### 2.2.5. Evaluation de l'activité antivirale des extraits aqueux et hydroéthanolique sur le *Poliovirus 1 Sabin (PVSL1)*.

L'évaluation de l'activité antivirale est basée sur la méthode de séroneutralisation entre un antigène (la suspension virale) et l'extrait de plante (possédant des molécules ou des particules antivirales) avec des modifications.

Sur une microplaque de 96 puits, distribuer 50  $\mu$ L de virus (dilution virale  $10^{-4}$ ) dans tous les puits de la 1<sup>ère</sup> à la 10<sup>e</sup> colonne. Après avoir déterminé les dilutions utiles (non toxiques) aqueuse et hydroéthanolique, distribuer 50  $\mu$ L de chaque dilution utile aqueuse dans les 4 premiers puits de chaque colonne jusqu'à la 10<sup>e</sup> colonne en raison d'une dilution par colonne. Distribuer ensuite 50  $\mu$ L de chaque dilution utile hydroéthanolique, dans les 4 derniers puits de chaque colonne jusqu'à la 10<sup>e</sup> colonne en raison d'une dilution par colonne (Figure 16). Incuber la microplaque à 37 °C pendant 30 minutes.

Sur une autre microplaque de 96 puits, reprendre le protocole précédent mais incuber la microplaque à 37 °C pendant 1 heure. Au bout de chaque temps d'incubation (30 minutes et 1 heure), retirer les microplaques de l'incubateur. Puis distribuer 50  $\mu$ L de suspension cellulaire dans chaque puits contenant les mélanges de virus + extraits. Par la suite, répartir 150  $\mu$ L de suspension cellulaire dans les 4 premiers puits de la 12<sup>e</sup> colonne pour le témoin cellulaire (témoin négatif). Distribuer ensuite 50  $\mu$ L de suspension cellulaire et 50  $\mu$ L de virus dans les

4 premiers puits de la 11<sup>e</sup> colonne pour servir de témoin viral (témoin positif). Sceller les plaques et incuber à nouveau les microplaques à 37 °C. Observer la morphologie des cellules après 24, 48 et 72 heures au microscope inversé.

Ensuite, on détermine la CMI qui est la concentration minimale inhibitrice c'est-à-dire la plus petite concentration qui inhibe l'activité du virus au bout de 24 heures. Lorsqu'au bout de 48h, 72 heures, cette concentration inhibe toujours l'activité du virus (par absence d'ECP), elle est dite virucide. Mais lorsqu'avant les 72 heures le virus infecte le tapis cellulaire (présence d'ECP), la concentration est dite virostatique.

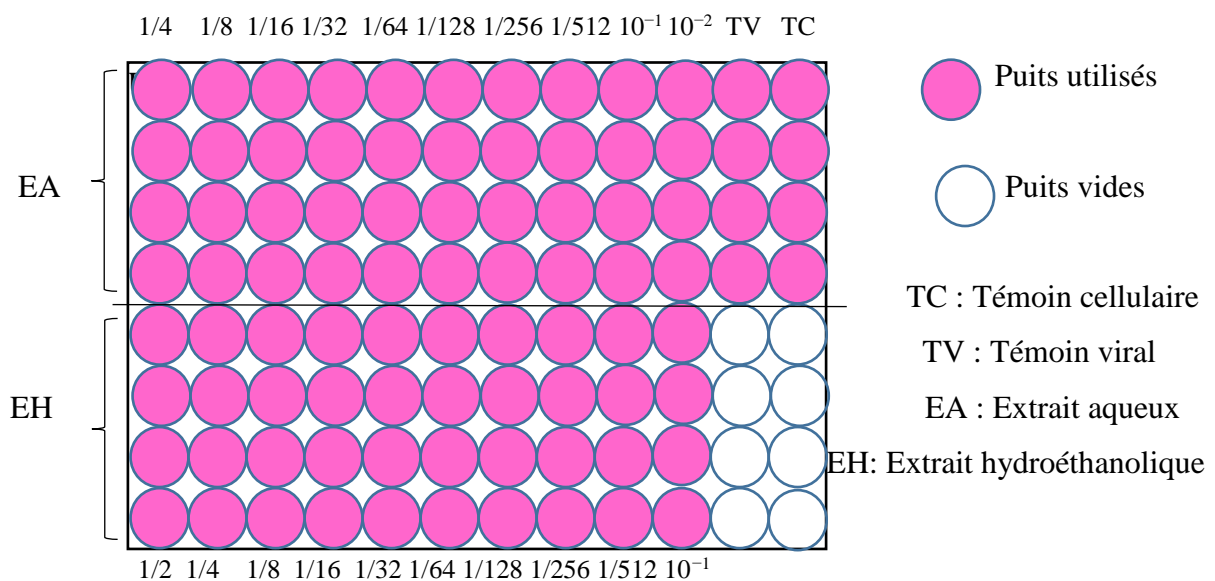


Figure 16: Plan de plaque des tests antiviraux des extraits aqueux et hydroéthanolique sur le Poliovirus 1 en 30 et 60 minutes d'incubation

### 2.2.6. Analyses des données

Les calculs des rendements d'extraction ont été effectués à partir des rapports des masses. Une lecture interprétative des ECP a été réalisée au microscope optique inversé. Les résultats obtenus ont été compilés dans des tableaux de valeurs et analysés avec l'application Office Microsoft Excel 2016, qui a permis de générer un graphe.

### 3.1. Résultats

#### 3.1.1. Rendement d'extraction

Le tableau II présente les résultats des extractions des feuilles de *Ocimum gratissimum*. Les extraits obtenus sont de couleur noir et d'aspect pâteux (Figures 17 et 18). Les rendements d'extractions sont de 15,15 % pour l'extrait aqueux et de 10,71 % pour l'extrait hydroéthanolique (Tableau II).



Figure 17: Extrait aqueux de feuilles de *Ocimum gratissimum*



Figure 18: Extrait hydroéthanolique de feuilles de *Ocimum gratissimum*

Tableau II: Rendement d'extraction des feuilles de *Ocimum gratissimum*

Extraits des feuilles de <i>Ocimum gratissimum</i>	Masse d'origine	Masse d'extrait sec	Rendement d'extraction	Couleur	Aspect de l'extrait
Aqueux	100 g	15,15 g	15,15 %	Noir	Pâteux
Hydroéthanolique	100 g	10,71 g	10,71 %	Noir	Pâteux

#### 3.1.2. Cytotoxicités des extraits aqueux et hydroéthanolique sur les cellules L20B

Les tests de toxicité des extraits aqueux et hydroéthanolique sur les cellules L20B ont donné les résultats suivants.

Concernant les faibles dilutions aqueuses, le tapis cellulaire reste intact depuis la dilution 1/512 (ou  $c = 2 \mu\text{g/mL}$ ) jusqu'à la dilution 1/16 (ou  $c = 62,5 \mu\text{g/mL}$ ) après 72 heures de contact entre les cellules L20B et ces différentes concentrations. Mais les dilutions 1/8 (ou  $c = 125 \mu\text{g/mL}$ ) jusqu'à l'extrait pur (ou  $c = 1000 \mu\text{g/mL}$ ) détruisent le tapis cellulaire. S'agissant des fortes dilutions aqueuses, le tapis cellulaire reste intact depuis la dilution  $10^{-9}$  (ou  $c = 0,000001 \mu\text{g/mL}$ ) jusqu'à la dilution  $10^{-2}$  (ou  $c = 10 \mu\text{g/mL}$ ) après 72 heures de contact entre les cellules L20B et ces différentes concentrations. Mais la dilution  $10^{-1}$  ( $c = 100 \mu\text{g/mL}$ ) détruit le tapis cellulaire (Figure 19).

A partir des faibles dilutions hydroéthanoliques 1/512 (ou  $c = 2 \mu\text{g/mL}$ ) jusqu'à 1/8 (ou  $c = 125 \mu\text{g/mL}$ ), le tapis cellulaire est intact après 72 heures de contact entre les cellules L20B et ces différentes concentrations. Mais les dilutions  $d = 1/4$  (ou  $c = 250 \mu\text{g/mL}$ ) jusqu'à l'extrait pur ( $c = 1000 \mu\text{g/mL}$ ) détruisent le tapis cellulaire. A partir des fortes dilutions hydroéthanoliques,  $10^{-9}$  ( $c = 0,000001 \mu\text{g/mL}$ ) jusqu'à  $10^{-1}$  ( $c = 100 \mu\text{g/mL}$ ) le tapis cellulaire reste intact après 72 heures de contact entre les cellules L20B et ces différentes concentrations (Figure 20).

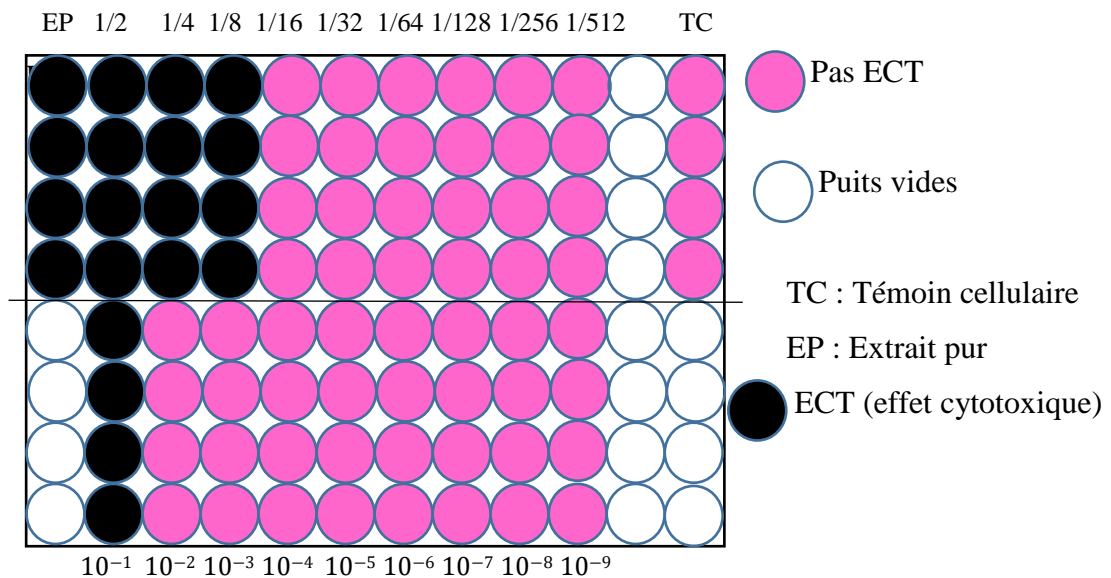


Figure 19: Résultat du test de cytotoxicité en présence de l'extrait aqueux.

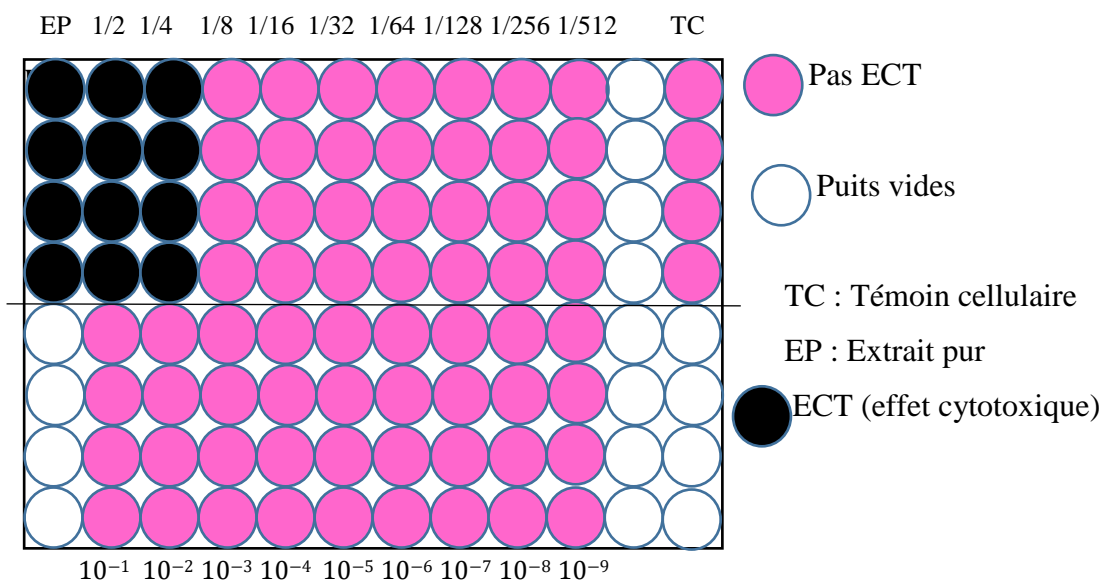


Figure 20: Résultat du test de cytototoxicité en présence de l'extrait hydroéthanolique.

### 3.1.3. Activité antivirale des extraits aqueux et hydroéthanolique sur le *Poliovirus 1* Sabin (en 30 minutes d'incubation)

L'activité antivirale des extraits aqueux et hydroéthanolique sur le *Poliovirus 1* a été évaluée par rapport au pourcentage d'inhibition d'ECP. Les différentes dilutions aqueuses utilisées pour les tests antiviraux sont : 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512,  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$  avec des concentrations allant de 2 à 250  $\mu\text{g/mL}$ , les différentes dilutions hydroéthanoliques utilisées pour les tests antiviraux sont 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512,  $10^{-1}$  avec des concentrations allant de 2 à 500  $\mu\text{g/mL}$ .

Lorsque le temps de contact entre le virus et les extraits (aqueux et hydroéthanolique) est de 30 minutes, on observe 100 % d'ECP soit 0 % d'inhibition d'ECP (4 cupules infectées sur 4) dans toutes les dilutions aqueuses et hydroéthanolique après 24, 48 et 72 heures (Figure 21).



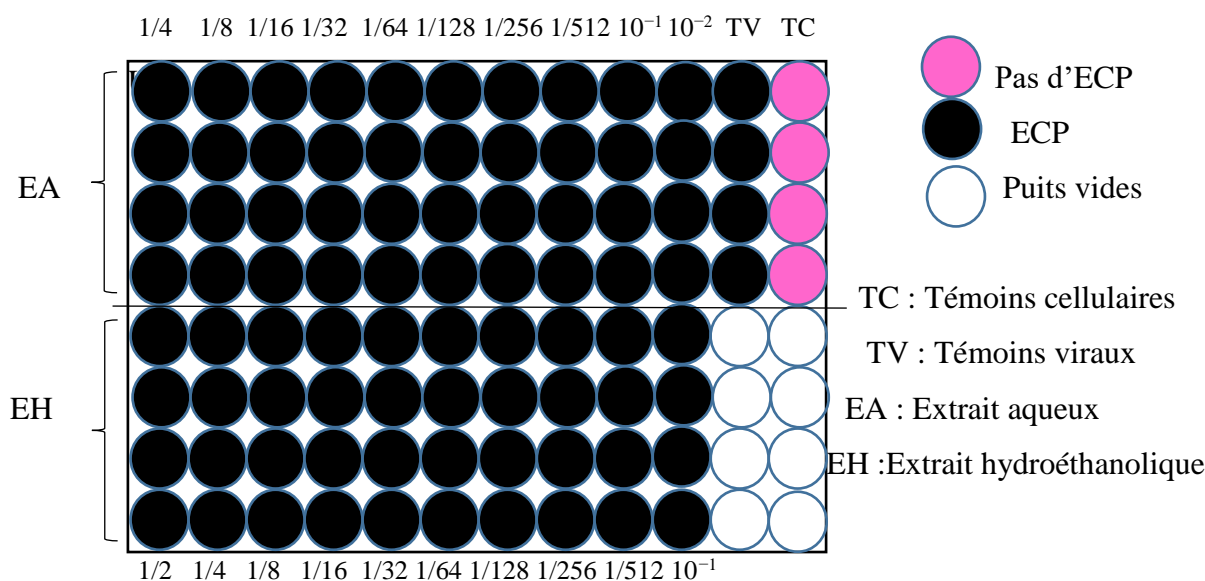


Figure 21: Tests antiviraux des extraits aqueux et hydroéthanolique sur le PV1SL en 30 minutes d'incubation.

### 3.1.4. Activité antivirale des extraits aqueux et hydroéthanolique sur le PV1SL en 1 heure d'incubation

Lorsque le temps de contact entre les extraits (aqueux et hydroéthanolique) et le *Poliovirus 1* est de 1 heure, les résultats suivant sont obtenus :

Au niveau de l'extrait aqueux, on observe après 24 heures : 100 % d'ECP (4 cupules infectées sur 4) soit 0 % d'inhibition d'ECP aux dilutions 1/4 (ou  $c = 250 \mu\text{g/mL}$ ) et 1/8 (ou  $c = 125 \mu\text{g/mL}$ ) ; 75 % d'ECP (3 cupules infectées sur 4) soit 25 % d'inhibition à la dilution 10<sup>-1</sup> (ou  $c = 100 \mu\text{g/mL}$ ), 50 % d'ECP (2 cupules infectées sur 4) soit 50 % d'inhibition aux dilutions 1/16 (ou  $c = 62,5 \mu\text{g/mL}$ ), 1/32 (ou  $c = 31,25 \mu\text{g/mL}$ ), 1/64 (ou  $c = 15,63 \mu\text{g/mL}$ ), 1/128 (ou  $c = 7,81 \mu\text{g/mL}$ ) et 1/256 (ou  $c = 3,91 \mu\text{g/mL}$ ) ; 25 % d'ECP (une cupule infectée sur 4) soit 75 % d'inhibition aux dilutions 10<sup>-2</sup> (ou  $c = 10 \mu\text{g/mL}$ ) et 1/512 (ou  $c = 2 \mu\text{g/mL}$ ). Les effets observés à J1 ont été conservés à J2 et à J3. Mais la dilution 10<sup>-1</sup> (ou  $c = 100 \mu\text{g/mL}$ ) est passé à 100 % d'ECP à partir de J2 (Figure 22).

Concernant l'extrait hydroethanolique, on observe à J1 : 100 % d'ECP ou 0 % d'inhibition aux dilutions 1/2 (ou  $c = 500 \mu\text{g/mL}$ ) et 1/4 (ou  $c = 250 \mu\text{g/mL}$ ) ; 50 % d'ECP ou 50 % d'inhibition aux dilutions 1/8 (ou  $c = 125 \mu\text{g/mL}$ ), 1/16 (ou  $c = 62,5 \mu\text{g/mL}$ ), 1/32 (ou  $c = 31,25 \mu\text{g/mL}$ ), 1/64 (ou  $c = 15,63 \mu\text{g/mL}$ ), 1/128 (ou  $c = 7,81 \mu\text{g/mL}$ ) et 1/256 (ou  $c = 3,91$

$\mu\text{g/mL}$ ) ; 25 % d'ECP ou 75 % d'inhibition aux dilutions  $10^{-1}$  (ou  $c = 100 \mu\text{g/mL}$ ) et  $1/512$  (ou  $c = 2 \mu\text{g/mL}$ ) comme le montre la figure 22. Ces pourcentages observés à J1 ont été conservés à J2 et à J3.

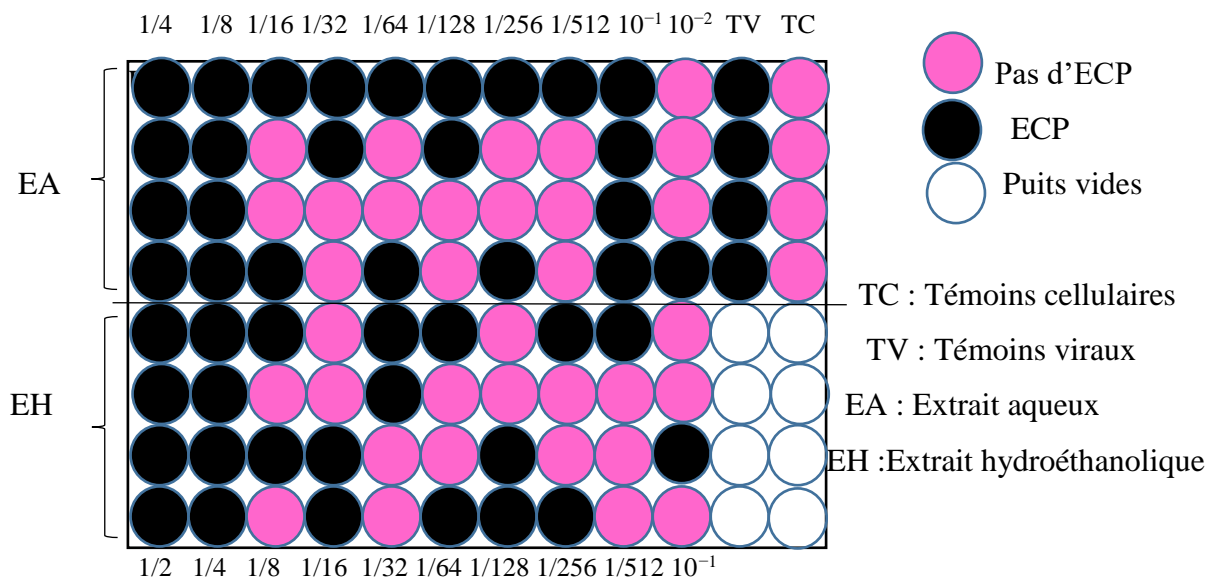


Figure 22 : Tests antiviraux des extraits aqueux et hydroéthanolique sur le PV1SL en 1 heure d'incubation.

La figure 23 présente l'évolution du pourcentage d'inhibition de la réplication du PV1SL par différentes concentrations des extraits aqueux et hydroéthanolique de *Ocimum gratissimum*. Les graphes représentant l'évolution du pourcentage d'inhibition après 30 minutes d'incubation des extraits aqueux et hydroéthanolique de *Ocimum gratissimum* sur le PV1SL restent stationnaires et confondues à l'axe des abscisses, depuis la concentration ( $c = 2 \mu\text{g/mL}$ ) jusqu'à la plus forte ( $c = 500 \mu\text{g/mL}$ ) (confère **graphe noir**, Figure 23). Cependant, lorsque le temps d'incubation est de 1 heure, la courbe représentant l'évolution du pourcentage d'inhibition de l'extrait aqueux sur le PV1SL, a une allure générale décroissante depuis la concentration la plus basse ( $c = 2 \mu\text{g/mL}$ ) jusqu'à s'annuler à la concentration la plus élevée ( $c = 250 \mu\text{g/mL}$ ). Des pics (avec % inhibition=75%) sont observés notamment aux concentrations  $c = 2 \mu\text{g/mL}$  et  $c = 10 \mu\text{g/mL}$  (confère **graphe bleu**, Figure 23)

De même, quand le temps d'incubation est de 1 heure, la courbe représentant l'évolution du pourcentage d'inhibition de l'extrait hydroéthanolique sur le PV1SL, décroît depuis la plus faible concentration ( $c = 2 \mu\text{g/mL}$ ) jusqu'à s'annuler à la plus forte concentration ( $c = 500$

$\mu\text{g/mL}$ ). Des pics sont aussi observés notamment aux concentrations  $c = 2 \mu\text{g/mL}$  et  $c = 100 \mu\text{g/mL}$  (confère *graphe rouge*, Figure 23).

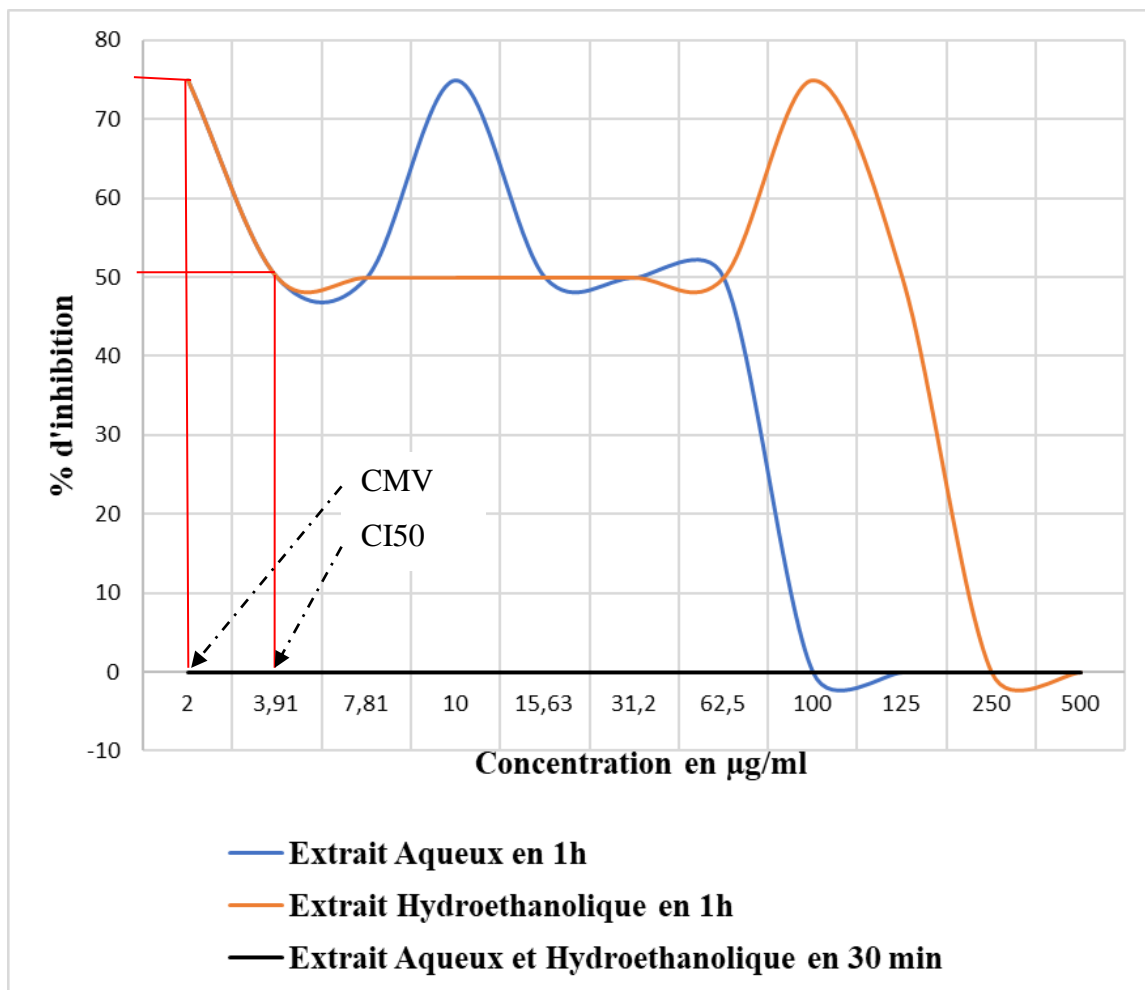


Figure 23: Evolution du pourcentage d'inhibition de la réplication de PV1SL par différentes concentrations des extraits de *Ocimum gratissimum* (T=30 min ; T=1 h).

### 3.2. Discussion

Le rendement d'extraction révèle que l'extrait aqueux a un rendement élevé (15,15 %) par rapport à celui de l'extrait hydroéthanolique (10,71 %). Ces résultats signifient que l'extrait aqueux est plus riche en métabolites secondaires que l'extrait hydroéthanolique, car il existe un lien entre le rendement d'extraction et les activités biologiques selon Adeniyi *et al* (2010). En tant que solvant, l'eau distillée est meilleure à l'éthanol puisqu'il permet d'obtenir la plus grande quantité d'extractibles.

Le rendement d'extraction aqueux dans notre travail est supérieur à celui de Bouagnon *et al* (2002) qui est de 9,81 %. Les feuilles de *Ocimum gratissimum* avec lesquelles notre étude a été effectuée, originaire de la ville de Daloa, offrent un rendement plus efficace que celles utilisées dans l'étude de Bouagnon *et al.* (2002) originaire de la ville d'Abidjan. Cette différence de rendement peut être due aux conditions environnementales.

Concernant la cytotoxicité de l'extrait aqueux, les faibles dilutions ne sont pas toxiques pour les cellules L20B depuis la dilution 1/512 (ou  $c = 2 \mu\text{g/mL}$ ) jusqu'à la dilution 1/16 (ou  $c = 62,5 \mu\text{g/mL}$ ). De même les fortes dilutions aqueuses ne sont pas toxiques pour les cellules L20B depuis la dilution  $10^{-9}$  (ou  $c = 0,000001 \mu\text{g/mL}$ ) jusqu'à la dilution  $10^{-2}$  (ou  $c = 10 \mu\text{g/mL}$ ). Cette absence de toxicité serait liée au fait que les cellules L20B dans notre travail supportent l'intensité de ces concentrations. Cependant les dilutions  $10^{-1}$  (ou  $c = 100 \mu\text{g/mL}$ ) jusqu'à l'extrait pur (ou  $c = 1000 \mu\text{g/mL}$ ) sont toxiques à cause de l'intensité de leurs concentrations trop élevées pour les cellules L20B. Ces concentrations trop élevées provoqueraient au niveau des cellules des modifications morphologiques (condensation du noyau, arrondissement des cellules, formation de nombreuses vésicules membranaires, réarrangements du cytosquelette, détachement) et biochimiques similaires à l'ECP selon Wafa (2014). En fonction de l'intensité des concentrations, ces modifications pourraient conduire à l'apoptose cellulaire.

Selon Bouagnon *et al.* (2022), toutes les dilutions aqueuses ( $c = 2$  à  $c = 1000 \mu\text{g/mL}$ ) ne sont pas toxiques pour les cellules L20B. Cette différence serait due au matériel végétal utilisé dans notre expérience qui offre un rendement plus efficace et qui serait plus concentré en principes actifs. Les faibles dilutions hydroéthanoliques n'ont aucun effet cytotoxique depuis la dilution 1/512 ( $c = 2 \mu\text{g/mL}$ ) jusqu'à la dilution 1/8 ( $c = 125 \mu\text{g/mL}$ ). S'agissant des fortes dilutions hydroéthanoliques, il n'y a pas d'effet cytotoxique depuis la dilution  $10^{-9}$  ( $c = 0,000001 \mu\text{g/mL}$ ) jusqu'à la dilution  $10^{-1}$  ( $c = 100 \mu\text{g/mL}$ ). Cette absence de toxicité serait

aussi liée au fait que les cellules L20B dans notre travail supportent l'intensité de ces concentrations. Cependant les dilutions 1/4 ( $c = 250 \mu\text{g/mL}$ ) jusqu'à l'extrait pur ( $c = 1000 \mu\text{g/mL}$ ) sont cytotoxiques du fait de l'intensité de leurs concentrations trop élevées pour les cellules L20B. Ces concentrations trop élevées provoqueraient au niveau des cellules des modifications morphologiques et biochimiques similaires à l'ECP selon Wafa (2014).

L'extrait aqueux n'est pas toxique pour les cellules L20B depuis la dilution 1/512 ( $c = 2 \mu\text{g/mL}$ ) jusqu'à la dilution 1/16 ( $c = 62,5 \mu\text{g/mL}$ ) alors que l'extrait hydroéthanolique n'est pas toxique pour les cellules L20B depuis la dilution 1/512 ( $c = 2 \mu\text{g/mL}$ ) jusqu'à la dilution 1/8 ( $c = 125 \mu\text{g/mL}$ ). Cette différence signifierait que, l'extrait aqueux est plus toxique pour les cellules L20B que l'extrait hydroéthanolique.

Concernant l'activité antivirale, lorsque le temps de contact entre le *Poliovirus 1* et les différentes concentrations aqueuses et hydroéthanolique est de 30 minutes, aucune activité antivirale n'est observée (0% d'inhibition d'ECP). En 30 minutes de contact, les extraits aqueux et hydroéthanolique n'aurait pas suffisamment le temps d'agir au niveau du processus soit de fixation, de pénétration, de décapsidation, de rétro transcription, de transfert de l'ARN viral, d'intégration, de transcription ou de maturation des protéines virales selon Baudot (1997). La réplication virale, se déroule normalement et les cellules L20B sont le siège des effets cytopathiques (ECP). En plus des modifications morphologiques, des modifications biochimiques ont lieu avec une inhibition des ARN polymérase par une protéase virale. Cet arrêt des synthèses cellulaires appelé « shut-off » provoquerait une baisse des défenses immunitaires et une atténuation des fonctions de la cellule infectée à signaler l'effraction commise par le virus.

Mais lorsque le temps de contact entre le PV1SL et les différentes dilutions (aqueuses et hydroéthanolique) est de 1 heure, des effets antiviraux sont notables depuis les dilutions aqueuses 1/512 ( $c = 2 \mu\text{g/mL}$ ) jusqu'à 1/16 ( $c = 62,5 \mu\text{g/mL}$ ) et les dilutions hydroéthanolique 1/512 ( $c = 2 \mu\text{g/mL}$ ) jusqu'à 1/8 ( $c = 125 \mu\text{g/mL}$ ). Ces effets antiviraux signifieraient qu'en une (1) heure de contact avec le PV1SL, les extraits aqueux et hydroéthanolique auraient le temps d'inhiber l'activité du virus. Cette action d'inhibition pourrait être provoquée par les flavonoïdes ou les triterpènes se trouvant dans les feuilles de *Ocimum gratissimum*. En effet selon Kahn *et al.* (2005), les polyphénols seraient capables de provoquer des activités antivirales. Selon Baudot (1997), les composés naturels comme les triterpènes sont capables d'inhiber la propagation virale en interférant au niveau de la fusion (pénétration) du virus. Le

mécanisme d'action antivirale des flavonoïdes sur les virus à ARN étant mal connu, le mécanisme d'action de *Ocimum gratissimum* sur le *Poliovirus 1* pourrait se situer soit au niveau de la fixation, de la pénétration, de la décapsidation, de la rétro transcription, du transfert de l'ARN viral, de l'intégration, de la transcription ou de maturation des protéines virales.

Il ressort tout de même que la  $CI_{50}$  de ces deux extraits est de  $c = 3,91 \mu\text{g/mL}$  (à  $d = 1/256$ ). Cette  $CI_{50}$  correspond à la concentration de l'extrait pour laquelle 50 % de l'activité antivirale est inhibée.

L'activité antivirale maximale est atteinte à  $c = 2 \mu\text{g/mL}$  qui correspond à la concentration la plus faible. Cela montre en effet que la concentration minimale virucide (CMV) des deux extraits est de  $c = 2 \mu\text{g/mL}$ . Cette CMV inhibe 75 % d'ECP dans notre expérience alors qu'elle inhibe environ 50 % des ECP dans l'expérience de Bouagnon *et al.* (2022). Cette différence significative confirmerait l'efficacité de notre matériel végétal par rapport à celui de Bouagnon *et al.* (2022).

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude a permis de montrer d'une façon générale l'activité antivirale des extraits aqueux et hydroéthanolique des feuilles de *Ocimum gratissimum* sur des souches de Poliovirus 1 isolées en Côte d'Ivoire. Après avoir déterminé les rendements d'extraction, ce travail a montré que l'extrait aqueux des feuilles de *Ocimum gratissimum*, était toxique pour les cellules L20B à partir de la concentration  $c = 125 \mu\text{g/mL}$ . Mais l'extrait hydroéthanolique des feuilles d'*Ocimum gratissimum* était cytotoxique à partir de la concentration  $c = 250 \mu\text{g/mL}$ .

Par la suite, cette étude a révélé qu'en 30 minutes de contact avec le *Poliovirus 1*, les extraits aqueux et hydroéthanolique des feuilles de *Ocimum gratissimum*, n'ont aucune activité sur ce virus. Cependant, en 1 heure de contact, ces extraits de feuilles de *Ocimum gratissimum* exerce une activité antivirale notable sur le *Poliovirus 1*. Par conséquent la CI50 (Concentration Inhibitrice 50 %) et la CMV (Concentration Minimale Virucide) des deux extraits ont été déterminé, qui sont respectivement  $c = 3,91 \mu\text{g/mL}$  et  $c = 2 \mu\text{g/mL}$ .

Des travaux futurs seront nécessaires pour évaluer l'activité antivirale de *Ocimum gratissimum* sur les *Entérovirus* en générale, étudier le mécanisme d'action des molécules antivirales contenues dans *Ocimum gratissimum* (flavonoïdes, triterpènes) et tester l'efficacité de ces molécules *in vivo* sur un modèle animal.

## REFERENCES

- Adams M.J., King A.M. & Carstens E.B. (2013). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology*, 158: 2023–2030.
- Adeniyi S.A., Orjiekwe C.L., Ehiagbonare J.E., & Arimah B.D. (2010). Preliminary phytochemical analysis and insecticidal activity of ethanolic extracts of four tropical plants (*Vernonia amygdalina*, *Sida acuta*, *Ocimum gratissimum* and *Telfaria occidentalis*) against beans weevil (*Acanthscelides obtectus*). *International Journal of Physical Sciences*, 5(6): 753-762.
- Akinmoladun A.C., Ibukun E.O., Emmanuel A., Obuotor E.M., Farombi E.O. (2007). Phytochemical constituent and antioxidant activity of extract from the leaves of *Ocimum gratissimum*. *Scientific Research Essay*, 2: 163-166.
- Ammendolia M.G., Tinari A., Calcabrini A. & Superti F. (1999). Poliovirus infection induces apoptosis in CaCo-2 cells. *Journal of Medical Virology*, 59: 122–129.
- Arnold E., Luo M., Vriend G., Rossmann M.G., Palmenberg A.C., Parks G.D., Nicklin M.J. & Wimmer E. (1987). Implications of the picornavirus capsid structure for polyprotein processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84: 21–25.
- Baudot D. (1997). Evaluation in vitro de l'activité antivirale des molécules originales sur le virus VISNA-MAEDI. Thèse de Doctorat, UFR des Sciences Pharmaceutiques, Université de Limoges (Limoges, France), 185 p.
- Békro Y.A., Békro J.A.M., Boua B.B., Tra B.F.H., & Ehilé E.E. (2007). Ethnobotanic study and phytochemical screening of *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) (Caesalpinaceae). *Revue Scientifique Nature*, 4 : 217- 225.
- Blondel B., *et al.* (2000). Aspect moléculaire de la pathogenèse de la poliomyélite : les interactions poliovirus-cellules nerveuses. *Virologie*, 4(4) : 305-317.
- Bouagnon J.J.R., Bolou G.E.K., Guédé K.B., Sanga D., Koffi L.R., N'Guessan C.D.R., Konan Y., Adjogoua E.V., N'Guessan J.D., Djaman A.J., & Dosso M. (2022). Phytochemical study and evaluation of the antiviral activity of aqueous extracts of three medicinal plants; *Xylopi aethiopica*, *Gliricidia sepium* and *Ocimum gratissimum* used in Cote d'Ivoire. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, 23(2): 141-148.



- Boyer F.C., *et al.* (2010). Post-polio syndrome: Pathophysiological hypotheses, diagnosis criteria, medication therapeutics. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, 53(1): 34-41.
- Cooper P.D. (1978). *Picornaviridae*: second report. *Intervirology*, 10: 165–180.
- Doedens J., Maynell L.A., Klymkowsky M.W. & Kirkegaard K. (1994). Secretory pathway function, but not cytoskeletal integrity, is required in poliovirus infection. *Archives of virology Supplementum*, 9: 159–172.
- Enders J.F. (1972). Early observations on cytopathogenicity of poliovirus. *American Journal of Clinical Pathology*, 57: 846–847.
- Ernst M.E., & Franey R.J. Acyclovir- and ganciclovir-induced neurotoxicity. (1998). *Annals of Pharmacotherapy*, 32: 111-113.
- Fauquet & Mayo. (2005). Family Picornaviridae. In « Virus Taxonomy. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *In Virus Taxonomy*, 9: 757–778.
- Flexner S. & Noguchi H. (1913). Experiments on the cultivation of the microorganism causing epidemic poliomyelitis. *Journal of Experimental Medicine*, 18: 461–485.
- GPEI. (Global Polio Eradication Initiative). (2022). History of polio [en ligne] <http://www.polioeradication.org/Polioandprevention/Historyofpolio.aspx>, consulté le 26/09/2022.
- Gilbert C., Bestman-Smith J., & Boivin G. (2001). Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: Clinical impacts and future prospects. *Journal of Clinical Virology*, 22: 73-89.
- Girard S., Couderc T., Destombes J., Thiesson D., Delpeyroux F. & Blondel B. (1999).
- Hellen C.U., Kräusslich H.G. & Wimmer E. (1989). Proteolytic processing of polyproteins in the replication of RNA viruses. *Biochemistry*, 28: 9881–9890.
- Hellen C.U., Lee C.K. & Wimmer E. (1992). Determinants of substrate recognition by poliovirus 2A proteinase. *Journal of Virology*, 66: 3330–3338.
- Hogle J.M., Chow M. & Filman D.J. (1985). Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science*, 229: 1358–1365.
- Iwasaki A., Welker R., Mueller S., Linehan M., Nomoto A. & Wimmer E. (2002). Immunofluorescence analysis of poliovirus receptor expression in Peyer's patches of humans, primates, and CD155 transgenic mice: implications for poliovirus infection. *Journal of Infectious Diseases Impact*, 186: 585-92.

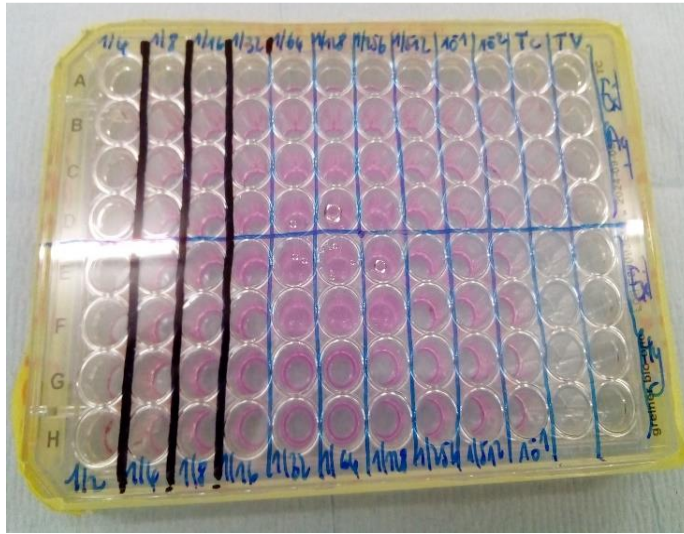
- Jassim S. & Nadji M.A. (2003). Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *Journal of Applied Microbiology*, 95(3): 412-427.
- Kew O.M., Sutter R.W., de Gourville E.M., Dowdle W.R. & Pallansch, M.A. (2005). Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication. *Annual Review of Microbiology*, 59: 587–635.
- Kitamura N., Semler B.L., Rothberg P.G., Larsen G.R., Adler C.J., Dorner A.J., Emini E.A., Hanecak R., Lee J.J. & other authors. (1981). Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature*, 291: 547–553.
- Kpètèhoto W.H., Hessou S., Dougnon T.V., Johnson R.C., Boni G., Houéto E.E., Assogba F., Pognon E., Loko F., Boko M., Gbénou J. (2017). Étude ethnobotanique, phytochimique et écotoxicologique d'*Ocimum gratissimum* Linn (*Lamiaceae*) à Cotonou. *Journal of Applied Biosciences*, 109 : 10609-10617.
- Kpodekon M.T., Boko C., Mainil Jacques, Farougou S., Sessou P., Yehouenou B., Gbenou J., Duprez J.N., Bardiau M., KPOKAME M.S. (2013). Composition chimique et test d'efficacité in vitro des huiles essentielles extraites de feuilles fraîches du basilic commun (*Ocimum basilicum*) et du basilic tropical (*Ocimum gratissimum*) sur *Salmonella enterica* sérotype *Oakland* et *Salmonella enterica* sérotype *Legon*. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, 35 : 41 – 48.
- Kpokame M. (2019). Etude comparative de l'effet de l'huile essentielle des graines d'*Ocimum gratissimum* et de l'*Amitraz* sur la tique *Rhipicephalus microplus*. Mémoire de Licence, Option : Production et Santé Animales, Département de Production et Santé Animales, Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi, (Abomey-Calavi, Benin), 42 p.
- Kristensson K. (1999). The discovery of the poliovirus. *Brain Research Bulletin*, 50: 461.
- Lalière G. (2009). Plantes comestibles, cueillette et recettes des 4 saisons. Edition Debaisieux, 174 p.
- Lashkevich V.A. (2008). 100 years of studying poliomyelitis virus and no poliomyelitis enteroviruses. *Voprosy virusologii*, 53 : 41–44.
- Lauber C. & Gorbalenya A.E. (2012). Toward genetics-based virus taxonomy: comparative analysis of a genetics-based classification and the taxonomy of picornaviruses. *Journal of Virology*, 86 : 3905–3915.

- Manampisoa N.D. (2021). Huiles essentielles d'*Ocimum gratissimum* : Extraction et formulation d'un baume. Mémoire de Master en Chimie Inorganique - Génie des Procédés, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo, (Antananarivo, Madagascar), 46 p.
- Melnick J. L. (1996). Current Status of Poliovirus Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(3): 293-300.
- Mezaghcha W. (2019). Structure et Classification des virus. Cours de microbiologie 2<sup>e</sup> année médecine dentaire, Faculté de médecine, Université de Sétif, Algérie, 28 p.
- Momou J., Koffi A.C., Traore K., Adjougou V., Tieoulou L., Géraud B.J., Signo P., Akre D.S., Guidy F., Traore F., Houenou P. & Dosso M. (2012). Persistance des entérovirus dans les eaux usées à Yopougon, Côte d'Ivoire : *Revue des sciences de l'eau* ; 24(4) : 343-353 :
- Mueller S., Wimmer E. & Cello J. (2005). Poliovirus and poliomyelitis: a tale of guts, brains, and an accidental event. *Virus Research*, 111: 175-193.
- Nasri D., Bouslama L., Pillet S., Bourlet T., Aouni M. & Pozzetto B. (2007). Basic rationale, current methods and future directions for molecular typing of human enterovirus. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 7: 419–434.
- Ojo O.O., Oluyeye J.O. & Famurewa O. (2009). Antiviral properties of two Nigerian plants. *African Journal of Plant Science*, 3(7): 157-159.
- Ouzilou L., Caliot E., Pelletier I., Prévost M.C., Pringault E., Colbère F. (2002). Poliovirus transcytosis through M-like cells. *Journal of General Virology*, 83: 2177-82.
- Poliovirus induces apoptosis in the mouse central nervous system. *Journal of Virology*, 73: 6066–6072.
- Pöyry T., Kinnunen L., Hyypiä T., Brown B., Horsnell C., Hovi T. & Stanway G. (1996). Genetic and phylogenetic clustering of enteroviruses. *Journal of General Virology*, 77(8): 1699–1717.
- Ren R.B., Costantini F., Gorgacz E.J., Lee J.J. & Racaniello V.R. (1990). Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: a new model for poliomyelitis. *Cell*, 63: 353–362.
- Sabin A.B. (1959). Present position of immunization against poliomyelitis with live virus vaccines. *British Medical Journal*, 1: 663–680.

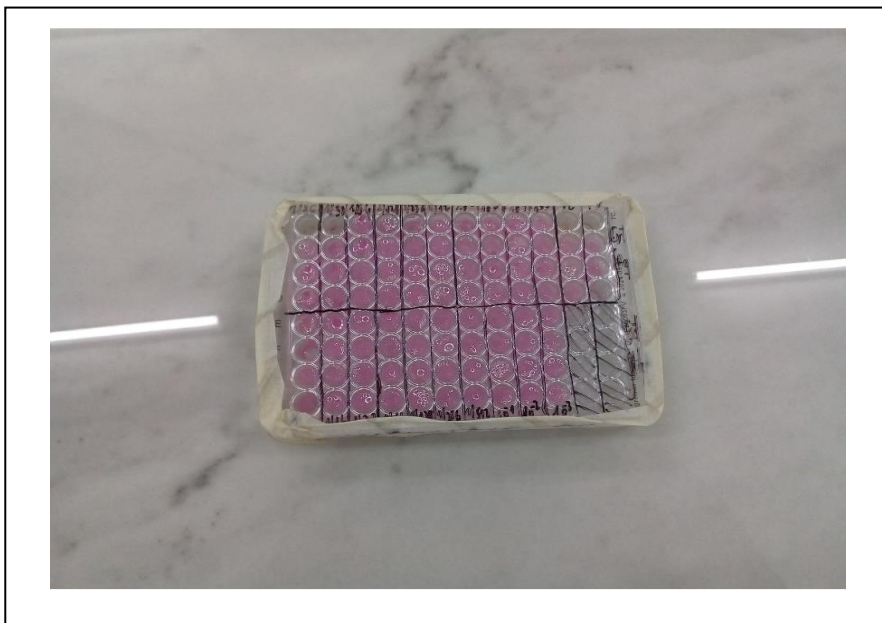
- Sabin A.B. (1985). Oral poliovirus vaccine: history of its development and use and current challenge to eliminate poliomyelitis from the world. *Journal of Infectious Diseases*, 151: 420–436.
- Sabin A.B., Boulger L.R. (1973). History of Sabin attenuated poliovirus oral live vaccine strains. *Journal of Biological Standardization*, 1: 115-118.
- Salk J.E. (1955). Consideration in the preparation and use of poliomyelitis virus vaccine. *Journal of the American Medical Association*, 154: 1239-1248.
- Salk J.E. (1956). Poliomyelitis vaccine in the fall of 1955. *American Journal of Public Health and the Nation's Health*, 46: 1–14.
- Salk J.E. (1959). Poliomyelitis vaccine preparation and administration; analysis of basic premises and current practices. *Journal of the American Medical Association*, 169 : 1829–1838.
- Tan S. H. L. (2016). La poliomyélite : une maladie ré-émergente ou en voie d'éradication ? Thèse de doctorat, UFR Sante, Pharmacie, Université d'Anger (Anger, France), 125 p.
- Volle R. (2015). Pathogénie des entérovirus : étude de la charge virale au cours de méningites et de la perméabilité des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines. Thèse de Doctorat, UFR des Sciences de la vie santé-agronomie-environnement, Université d'Auvergne (Clermont, France), 200 p.
- Wafa I. (2014). Mise au point et évaluation d'une technique de PCR permettant la détection et le typage des *Entérovirus* directement à partir de produits pathologiques ou d'échantillons environnementaux. *Thèse de doctorat en Sciences médicales mention Virologie*, Université Jean Monnet de Saint-Etienne (Saint-Etienne, France), 216 p.
- WHO. (1988). Global eradication of poliomyelitis by the year 2000. *Weekly Epidemiological Record*; 63:161–62.
- Wood D.J. & Hull B. (1999). L20B cells simplify culture of polioviruses from clinical samples. *Journal of medical virology*, 58:188–192, 1999. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9071\(199906\)58:2<188::AID-JMV15>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199906)58:2<188::AID-JMV15>3.0.CO;2-H).
- Xiang W., Cuconati A., Hope, D., Kirkegaard K. & Wimmer E. (1998). Complete protein linkage map of poliovirus P3 proteins: interaction of polymerase 3Dpol with VPg and with genetic variants of 3AB. *Journal of Virology*, 72: 6732–6741.

Zihiri G.N., Kra A.K., Bahi C. & Guédé F. (2003). Plantes médicinales immunostimulantes : critères de sélection, techniques rapides d'extraction des principes actifs et méthodes d'évaluation de l'activité immunogène. *Revue de Médecine et Pharmacie d'Afrique*, 17: 131-138.

## ANNEXES



**Annexes 1 : Schéma de plaque des tests antiviraux des extraits aqueux et hydroéthanolique sur le *Poliovirus 1* en 30 minutes d'incubation.**



**Annexe 2 : Plaque des tests antiviraux des extraits aqueux et hydroéthanolique sur le *Poliovirus 1* en 1 heure d'incubation.**



**Annexe 3 : Schéma d'une plaque de test de cytotoxicité**

## RESUME

**Introduction :** L'émergence des infections virales et la pandémie à SRASCov-2, nous ont interpellé sur la nécessité de disposer de nouvelles molécules antivirales. Le présent travail s'inscrit dans le cadre d'une exploration à la recherche de nouvelles molécules antivirales à partir des plantes médicinales utilisées dans la pharmacopée traditionnelle en Côte d'Ivoire. L'objectif général de cette étude était d'évaluer l'activité antivirale des extraits aqueux et hydroéthanolique des feuilles de *Ocimum gratissimum* contre le *Poliovirus 1 Sabin*, un virus à ARN non enveloppé, responsable de la poliomyélite antérieure aiguë chez les enfants de moins de 5 ans. **Méthodologie:** Après vérification de leur innocuité (test cytotoxicité) pour les lignées cellulaires L20B, différentes concentrations des extraits aqueux et hydroéthanolique des feuilles de *Ocimum gratissimum*, ont été utilisés pour réaliser les tests d'inhibition de réplication des souches de *Poliovirus 1 Sabin Like* (PVSL1). **Résultats:** L'extrait aqueux de *Ocimum gratissimum* s'est avéré plus riche en métabolites secondaires que l'extrait hydroéthanolique. Par contre, l'extrait hydroéthanolique s'est révélé moins cytotoxique que l'extrait aqueux, après 72 heures de contact avec le tapis cellulaire de L20B. Aussi, une activité antivirale aurait été mise en évidence pour ces deux extraits de *Ocimum gratissimum* à différentes concentrations ; après 1 heure de contact avec la souche virale de PVSL1. Les  $CI_{50}$  des deux extraits étaient de  $CI_{50} = 3,91 \mu\text{g/mL}$  et leurs CMV =  $2 \mu\text{g/mL}$ . **Conclusion:** Les extraits aqueux et hydroéthanolique de *Ocimum gratissimum* ont donc montré une activité antivirale intéressante contre le PV1SL. Cette activité serait due à la présence des polyphénols et triterpènes dans les principes actifs de extraits de *Ocimum gratissimum*.

**Mots clés :** *Ocimum gratissimum*, extraits aqueux, hydroéthanolique, Cytotoxicité, activité antivirale,  $CI_{50}$ , CMV.

## ABSTRACT

**Introduction :** The emerging viral infections and the SARS-Cov-2 pandemic have highlighted the need for new antiviral molecules. The present work is part of an exploration in the search for new antiviral molecules from medicinal plants used in the traditional pharmacopoeia in Côte d'Ivoire. The aim of this study was to evaluate the antiviral activity of aqueous and hydroethanolic extracts of *Ocimum gratissimum* leaves against Poliovirus 1, a non-enveloped RNA virus, responsible for acute anterior poliomyelitis in children under 5 years of age. **Methodology:** After verification of their safety (cytotoxicity test) for L20B cell lines, different concentrations of aqueous and hydroethanolic extracts of *Ocimum gratissimum* leaves, were used to perform replication inhibition tests of Poliovirus 1 Sabin Like (PVSL1) strains. **Results:** The aqueous extract of *Ocimum gratissimum* was found to be more abundant in secondary metabolites than the hydroethanol extract. However, the hydroethanolic extract was less cytotoxic than the aqueous extract, after 72 hours of contact with the L20B cell mat. Also, an antiviral activity was demonstrated for these two extracts of *Ocimum gratissimum* at different concentrations ; after 1 hour of contact with the PVSL1 viral strain. The  $IC_{50}$  of the two extracts were  $IC_{50} = 3.91 \mu\text{g/mL}$  and their VMC =  $2 \mu\text{g/mL}$ . **Conclusion:** The aqueous and hydroethanolic extracts of *Ocimum gratissimum* showed interesting antiviral activity against PV1SL. This activity would be due to the presence of polyphenols and triterpenes in the active principles of *Ocimum gratissimum* extracts.

Key words: *Ocimum gratissimum*, aqueous extracts, hydroethanolic, Cytotoxicity, antiviral activity,  $IC_{50}$ , CMV