



HAL
open science

Élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques à l'encontre du virus de la grippe

Ho Hong Hai Vo

► **To cite this version:**

Ho Hong Hai Vo. Élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques à l'encontre du virus de la grippe. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10001 . tel-00903685

HAL Id: tel-00903685

<https://theses.hal.science/tel-00903685>

Submitted on 12 Nov 2013

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

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

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE - EVOLUTION ECOSYSTEMES MICROBIOLOGIE MODELISATION

-----*-*-----

THESE

Présentée devant

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Pour l'obtention

du **DIPLOME DE DOCTORAT**

(arrêté du 7 août 2006)

Spécialité : Virologie

par

Mlle **VO Ho Hong Hai**

TITRE :

ELABORATION DE NOUVELLES STRATEGIES THERAPEUTIQUES

A L'ENCONTRE DU VIRUS DE LA GRIPPE

Directeur de thèse : Pr. **Bruno LINA**

Présentée et soutenue le 05 janvier 2011 devant le jury :

Madame le Professeur Florence MORFIN

Monsieur le Docteur Jean-Claude MANUGUERRA

Monsieur le Docteur Hugues LORTAT-JACOB

Monsieur le Docteur Benoît DARBLADE

Monsieur le Docteur Olivier FERRARIS

Monsieur le Professeur Bruno LINA

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. Collet

M. le Professeur J-F. Mornex

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation

Département de Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut de Science Financière et d'Assurance

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. le Professeur F. Gieres

Directeur : M. le Professeur C. Gautier

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Directeur : M. N. Siauve

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Directeur : Mme S. Fleck

Directeur : M. le Professeur P. Hantzpergue

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M R. Bernard

REMERCIEMENTS

Je témoigne ma plus sincère reconnaissance à Monsieur le Professeur Bruno LINA, directeur de l'unité CNRS FRE3011, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire de recherche, et aussi directeur de cette thèse, pour sa confiance, et son soutien.

-----&-&-&-----

Je tiens à témoigner toute ma gratitude la plus profond à mon co-encadrant, Monsieur le Docteur Olivier FERRARIS, pour sa grande disponibilité, ses conseils précieux, ses encouragements et sa gentillesse.

-----&-&-&-----

J'adresse tous mes remerciements à Monsieur le Docteur Hugues LORTAT-JACOB et Monsieur le Docteur Jean-Claude MANUGUERRA, pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger ce travail et de participer à mon jury de thèse.

-----&-&-&-----

Je remercie très vivement Madame le Professeur Florence MORFIN et Monsieur le Docteur Benoît DARBLADE pour l'honneur qu'ils me font en participant à mon jury de thèse.

-----&-&-&-----

J'aimerais également remercier tout particulièrement Madame Alexandra ERNY, Madame Mendy BARTHELEMY, et Monsieur Aurélien TRAVERSIER pour leur participation scientifique, technique et leur sympathie.

-----&-&-&-----

Au cours de ces trois années, j'ai eu le plaisir de travailler avec tous les membres au sein de l'équipe du 4^{ème} étage. Je leur adresse mes remerciements pour leur contribution de près ou de loin à ce travail, leur gentillesse et leur sens de l'amitié.

Je tiens à remercier toutes les équipes du laboratoire CNRS FRE3011 pour leur accueil chaleureux.

-----&-&-&-----

J'exprime ma grande reconnaissance à Madame le Docteur CAO Thi Bao Van et Madame le Professeur TRUONG Thi Xuan Lien, pour leurs encouragements et leur soutien.

Mes remerciements sont également adressés à mes collègues et amis au sein du laboratoire Biologie Moléculaire de l'Institut Pasteur, Hochiminh ville, qui ont eu à supporter le surcroît de travail pendant ma période de mobilité.

-----&-&-&-----

Je témoigne ma grande gratitude à Monsieur LAM Thanh My et Madame DIEP Thi Xuan pour leur soutien et l'agréable ambiance familiale durant ces années de thèse.

-----&-&-&-----

Des contributions diverses m'ont permis de mener à bien ce travail. Que mes amis, reçoivent ici mes vifs remerciements, pour vos encouragements, pour tous les moments amicaux que nous partageons ensemble, au Vietnam et en France.

-----&-&-&-----

J'adresse du plus profond de mon cœur ma gratitude et mon amour à mes parents pour leur soutien, leur compréhension et leur encouragement tout au long de ma vie.

-----&-&-&-----

Je remercie le CNRS pour m'avoir accordé une bourse de thèse et l'association GEI pour son aide de financement en fin de thèse.

RESUME

Les virus influenza provoquent chaque année la grippe saisonnière qui peut toucher 5 à 15 % de la population. Les médicaments antiviraux sont un moyen important complémentaire à la vaccination pour le traitement et la prévention de la grippe. Actuellement, deux classes d'antiviraux ont été approuvées, l'une pour inhiber l'étape de décapsidation (l'inhibiteur du canal ionique M2), et l'autre pour empêcher la libération de néo-virions (l'inhibiteur de la neuraminidase). Cependant, de plus en plus de virus sont nativement résistants aux inhibiteurs de la protéine M2. Des virus résistants aux inhibiteurs de la neuraminidase ont également circulé durant les hivers 2008 – 2009. Le développement de nouveaux médicaments afin de substituer ou de compléter ces inhibiteurs est donc crucial dans la lutte contre les virus de la grippe. L'accent mis ces dernières années sur l'activité biologique des sucres (oligosaccharides/polysaccharides) montre une voie pour l'étude de l'activité antivirale d'une des plus importantes biosources.

Dans le but d'évaluer le potentiel antigrippal des molécules dérivées de sucres, nous avons effectué un criblage à partir d'une bibliothèque de 245 composés de polysaccharides et d'oligosaccharides, dont la plupart proviennent d'algues et de végétaux supérieurs. Plusieurs molécules actives réparties dans différentes familles de sucres ont été mises en évidence. Parmi les candidats d'intérêt, l'oligosaccharide sulfaté 152, appartenant à la famille des arabinogalactanes de l'espèce *Codium fragile*, a présenté une activité inhibitrice vis-à-vis des deux virus influenza de type A et de type B *in vitro*. Le mécanisme d'action de cet oligosaccharide a été caractérisé. Il montre que les deux glycoprotéines de surface, l'hémagglutinine et la neuraminidase, sont les cibles virales de cette molécule.

Discipline : Virologie

Mots-clés : virus influenza, antiviraux, polysaccharide, oligosaccharide

Adresse : Virologie et Pathologie Humaine, CNRS FRE 3011,
Université Claude Bernard Lyon 1, Faculté de Médecine RTH Laënnec,
7-11 Rue Guillaume Paradin,
69372 Lyon Cedex 08 - France

TITLE

DEVELOPMENT OF NEW THERAPEUTIC STRATEGIES AGAINST INFLUENZA VIRUS

ABSTRACT

The annual seasonal flu caused by influenza viruses can affect 5 to 15 % of the population. In addition to vaccination, the use of antiviral drugs in the treatment and prevention allows the control of influenza virus infection. So far, two classes of antiviral drugs have been approved for influenza treatment, one to inhibit the uncoating step (M2 inhibitors), and the other to prevent the release of progeny virions (NA inhibitors). However, the emergence and circulation of M2 inhibitor resistant viruses at high frequencies have restricted the use of these inhibitors. Neuraminidase inhibitor resistance among circulating influenza viruses has emerged since the 2008 – 2009 season. The development of new classes of antiviral agents is crucial in the fight against influenza virus. In recent years, many molecules belonging to a large group of compounds known as carbohydrates (oligosaccharides/polysaccharides) have been revealed essential for various biological activities. The establishment of carbohydrate-based antiviral agents is, therefore, a highly promising strategy.

In order to evaluate the potentially anti-influenza molecules derived from carbohydrates, we have performed a screening from a library of 245 polysaccharides and oligosaccharides. These compounds were extracted mainly from plants and algae. Several active molecules of different families have been identified. Among them, the sulfated oligosaccharide 152, belonging to the family of arabinogalactane, was found to be highly active toward both influenza virus A and B *in vitro*. This oligosaccharide was purified from the green algal species *Codium fragile*. The study of the 152 mechanism suggests that this oligosaccharide can cooperatively inhibit both viral HA binding activity and NA catalytic activity.

Key words : Influenza virus, antiviral, polysaccharide, oligosaccharide

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| TABLE DES ILLUSTRATIONS..... | 10 |
| LISTE DES ABREVIATIONS | 12 |
| INTRODUCTION..... | 15 |
| CHAPITRE I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE | 18 |
| I.1. GENERALITES SUR LES VIRUS INFLUENZA | 19 |
| I.1.1. La grippe et classification des virus grippaux | 19 |
| I.1.1.1. La grippe en général..... | 19 |
| I.1.1.2. Classification des virus grippaux | 20 |
| I.1.2. Structure générale du virion | 21 |
| I.1.3. Le génome viral..... | 23 |
| I.1.4. Les protéines virales..... | 26 |
| I.1.4.1. L'hémagglutinine (HA) | 26 |
| I.1.4.1.1. La structure de l'hémagglutinine | 26 |
| I.1.4.1.2. La fonction de l'hémagglutinine | 28 |
| I.1.4.1.3. Les sites antigéniques..... | 31 |
| I.1.4.1.4. La glycosylation | 32 |
| I.1.4.2. La neuraminidase (NA)..... | 33 |
| I.1.4.2.1. La structure de la région globulaire | 33 |
| I.1.4.2.2. La fonction de la neuraminidase | 35 |
| I.1.4.2.3. La glycosylation..... | 36 |
| I.1.4.3. La protéine de canal (A/M2 et BM2)..... | 37 |
| I.1.4.4. La protéine NB..... | 38 |
| I.1.4.5. La protéine de matrice (M1) | 38 |
| I.1.4.6. La nucléoprotéine NP | 39 |
| I.1.4.7. Le complexe polymérasique (PB1, PB2, PA)..... | 39 |
| I.1.4.7.1. La protéine basique 1 (PB1)..... | 39 |
| I.1.4.7.2. La protéine basique 2 (PB2)..... | 40 |
| I.1.4.7.3. La protéine acide (PA) | 40 |
| I.1.4.8. La protéine non structurale NS1 | 40 |
| I.1.4.9. La protéine d'export nucléaire (NEP, anciennement NS2) | 41 |
| I.1.4.10. La protéine PB1-F2..... | 41 |
| I.1.5. Cycle biologique du virus | 42 |
| I.1.6. Les variations antigéniques des virus influenza | 45 |
| I.1.6.1. Les variations antigéniques mineures | 45 |
| I.1.6.2. Les variations antigéniques majeures | 46 |
| I.2. LES ANTIVIRAUX..... | 47 |
| I.2.1. Les inhibiteurs de l'entrée virale..... | 48 |
| I.2.1.1. Camostat – L'inhibiteur de l'activation protéolytique de la protéine hémagglutinine..... | 48 |
| I.2.1.2. Cyanovirin-N – L'inhibiteur de l'attachement virale..... | 48 |
| I.2.1.3. DAS181 – La protéine de fusion composée de l'activité sialidase..... | 49 |
| I.2.1.4. TBHQ – L'inhibiteur du changement conformationnel de l'hémagglutinine | 50 |
| I.2.1.5. Dérivés d'adamantane – L'inhibiteur du canal ionique M2..... | 51 |
| I.2.2. Les inhibiteurs de la réplication et de la transcription du virus influenza..... | 52 |
| I.2.2.1. Ribavirine, viremagine – Les analogues de nucléoside synthétique..... | 52 |
| I.2.2.2. T-705..... | 53 |
| I.2.2.3. Flutimide – L'inhibiteur de l'activité endonucléasique | 54 |

| | | |
|---------------|--|-----|
| I.2.3. | Les inhibiteurs de la sortie du virus – Les inhibiteurs de la neuraminidase | 55 |
| I.2.3.1. | Zanamivir | 55 |
| I.2.3.2. | Oseltamivir | 56 |
| I.2.3.3. | Les virus résistants aux inhibiteurs de la neuraminidase | 57 |
| I.2.3.4. | Les nouveaux candidats potentiels des inhibiteurs de la neuraminidase | 58 |
| I.2.3.4.1 | Forme dimère du zanamivir | 58 |
| I.2.3.4.2 | Peramivir (RWJ-270201) | 58 |
| I.2.3.4.3 | Laninamivir | 60 |
| I.3. | DIVERSITE ET FONCTIONS DES GLUCIDES | 60 |
| I.3.1. | La diversification des monosaccharides et oligosaccharides | 61 |
| I.3.2. | La structure diversifiée des polysaccharides | 67 |
| I.3.3. | Les glycanes de glycoconjugués et l'infection des pathogènes | 69 |
| I.3.3.1. | Les glycoconjugués | 69 |
| I.3.3.1.1. | Les glycoprotéines | 69 |
| I.3.3.1.2. | Les protéoglycanes | 71 |
| I.3.3.1.3. | Les glycolipides | 72 |
| I.3.3.2. | Rôle des glycoconjugués dans la pathologie microbienne | 73 |
| I.3.3.2.1. | Rôles des protéoglycanes dans l'étape d'entrée et dans la pathogénéicité des pathogènes | 74 |
| I.3.3.2.2. | Implication des sialyloligosaccharides dans la spécificité de récepteur, le spectre d'hôte et le tropisme du pathogène | 76 |
| I.3.4. | Les polysaccharides naturels d'intérêt | 78 |
| I.3.4.1. | Les polysaccharides sulfatés | 79 |
| I.3.4.2. | Les polysaccharides pectiques | 82 |
| CHAPITRE II. | MATERIELS ET METHODES | 86 |
| II.1. | MATERIELS | 87 |
| II.1.1. | La banque des polysaccharides et oligosaccharides | 87 |
| II.1.2. | Les lignées cellulaires | 89 |
| II.1.3. | Les virus | 89 |
| II.2. | METHODES | 90 |
| II.2.1. | Production de virus | 90 |
| II.2.2. | Test de cytotoxicité au rouge neutre | 90 |
| II.2.3. | Titration du pouvoir infectieux du virus | 91 |
| II.2.4. | Essai de neutralisation de la multiplication virale | 92 |
| II.2.4.1. | Criblage des composés | 92 |
| II.2.4.2. | Evaluation de l'effet inhibiteur des molécules actives | 94 |
| II.2.5. | Test d'hémagglutination et dosage de l'activité hémagglutinante | 94 |
| II.2.5.1. | Test d'hémagglutination | 94 |
| II.2.5.2. | Dosage de l'activité hémagglutinante | 95 |
| II.2.6. | Test fluorimétrie de l'activité neuraminidasique | 95 |
| II.2.6.1. | Détection de l'activité de la NA du virus dans le surnageant de culture | 96 |
| II.2.6.2. | Inhibition de l'activité neuraminidasique | 96 |
| II.2.7. | Essai de neutralisation de la multiplication virale au cours du temps | 96 |
| II.2.8. | Détermination de l'affinité du virus/sucre | 98 |
| II.2.8.1. | Immobilisation du composé de sucre | 98 |
| II.2.8.2. | Essai de compétition entre la févine et le composé de sucre | 100 |
| CHAPITRE III. | CRIBLAGE DES MOLECULES CAPABLES DE NEUTRALISATION DE L'INFECTION VIRALE | 102 |
| RESULTATS | | 103 |

| | |
|--|-----|
| III.1. LES FAMILLES SULFATEES | 106 |
| III.1.1. Les arabinogalactanes | 106 |
| III.1.2. Les fucanes | 111 |
| III.1.3. Les galactofucanes | 117 |
| III.1.4. Les hétéroglycanes sulfatés | 119 |
| III.1.5. Les spirulanes | 122 |
| III.1.6. Les carraghénanes – les xylanes sulfatés – les xylomannanes sulfatés – les ulvanes | 123 |
| III.2. LES FAMILLES CHARGEES | 127 |
| III.2.1. Les apiogalacturonanes | 127 |
| III.2.2. Les alginates | 130 |
| III.3. LES FAMILLES NEUTRES | 131 |
| DISCUSSION | 133 |
| | |
| CHAPITRE IV. EVALUATION DE L'ACTIVITE INHIBITRICE & CARACTERISATION DES CIBLES VIRALES | 144 |
| RESULTATS | 145 |
| IV.1. EVALUATION DE LA CAPACITE DE NEUTRALISATION DE L'OLIGOSACCHARIDE 152 | 146 |
| IV.1.1. Effet inhibiteur de l'oligosaccharide 152 vis-à-vis des gripes saisonnières de sous- type A (H3N2), A (H1N1) et de type B | 146 |
| IV.1.2. Effet inhibiteur de l'oligosaccharide 152 contre les souches pandémiques A (H1N1) 2009 | 147 |
| IV.1.3. Effet inhibiteur de l'oligosaccharide 152 vis-à-vis de la souche parentale A (H3N2) et son mutant R292K (résistant à l'oseltamivir) | 150 |
| IV.2. CARACTERISATION DES CIBLES VIRALES | 152 |
| IV.2.1. L'impact de l'oligosaccharide 152 sur l'activité de l'enzyme NA des virus influenza de type A et de type B | 152 |
| IV.2.2. Etude d'action neutralisale de l'oligosaccharide 152 dans des phases précoces et phases tardives de l'infection virale | 154 |
| IV.2.3. Caractérisation de l'interaction entre l'oligosaccharide 152 et la protéine HA de surface des virus de type A | 157 |
| DISCUSSION | 160 |
| | |
| CONCLUSION | 166 |
| | |
| PERSPECTIVES | 170 |
| | |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 172 |
| | |
| ANNEXES | 196 |

TABLE DES ILLUSTRATIONS

| | | |
|---------------|--|-----|
| Figure 1.1 : | Représentation schématique du virus influenza A et du complexe ribonucléoprotéique..... | 22 |
| Figure 1.2 : | Modèle de la distribution des glycoprotéines HA et NA dans un virion d'influenza | 22 |
| Figure 1.3 : | Représentation schématique du génome du virus A/Puerto Rico/8/34. | 24 |
| Figure 1.4 : | Représentation schématique du génome du virus B/Lee/40 | 25 |
| Figure 1.5 : | Structure de la protéine hémagglutinine | 27 |
| Figure 1.6 : | a) Représentation schématique du site de liaison de l'hémagglutinine (sous-type H3) lié avec l'acide sialique ; b) Deux types de liaison entre l'acide sialique et le galactose voisin..... | 29 |
| Figure 1.7 : | L'événement de fusion membranaire..... | 30 |
| Figure 1.8 : | La distribution des sites antigéniques | 32 |
| Figure 1.9 : | Structure de la neuraminidase | 34 |
| Figure 1.10 : | L'interaction entre les résidus du site actif de la NA avec l'acide sialique..... | 35 |
| Figure 1.11 : | Schéma du domaine transmembranaire de deux protéines A/M2 et BM2 | 38 |
| Figure 1.12 : | Schéma du cycle d'infection des virus influenza de type A | 44 |
| Figure 1.13 : | Représentation des variations antigéniques majeures du virus influenza | 47 |
| Figure 1.14 : | Le site de fixation de la molécule TBHQ sur la protéine HA. | 50 |
| Figure 1.15 : | Structure chimique de a) Amantadine ; b) Rimantadine..... | 52 |
| Figure 1.16 : | Structure chimique de a) Ribavirine ; b) Viramidine ; c) T-705; d) Flutimide..... | 54 |
| Figure 1.17 : | Structure chimique de a) NANA ; b) DANA ; c) GS4071 (carboxylate d'oseltamivir) ; d) GS4104 ; e) 4-guanidino-DANA (zanamivir) ; f) RWJ-270201 (peramivir)..... | 59 |
| Figure 1.18 : | Structures du glycéraldéhyde et du dihydroacétone dans la projection de Fisher | 63 |
| Figure 1.19 : | Représentation structurelle des D-aldoses | 63 |
| Figure 1.20 : | Cyclisation schématique du D-galactose avec deux configurations d'anomère α et d'anomère β | 64 |
| Figure 1.21 : | Les conformations chaises du β -D-glucose..... | 65 |
| Figure 1.22 : | Structures des disaccharides importants..... | 66 |
| Figure 1.23 : | Schémas structuraux des hétéropolysaccharides..... | 68 |
| Figure 1.24 : | Trois classes des types de N-glycanes | 70 |
| Figure 1.25 : | Les structures de type O-GalNAc | 70 |
| Figure 1.26 : | Les structures de différentes classes de protéoglycanes..... | 72 |
| Figure 1.27 : | Les structures centrales différentes des glycosingolipides..... | 72 |
| Figure 1.28 : | Différentes classes de glycanes des glycoconjugués membranaires | 73 |
| Figure 1.29 : | a) Représentation des glycanes dans une puce ; b) Les conformations formées par les sialylolygosaccharides terminés par la liaison $\alpha(2,3)$ et $\alpha(2,6)$ avec des glycanes de tailles différentes | 78 |
| Figure 1.30 : | Les 5 types disaccharidiques de chondroïtines sulfatés | 80 |
| Figure 1.31 : | La structure de l'héparine contenant un domaine lié à l'antithrombine AT-III (ADB) et des domaines liés à la thrombine (TBD)..... | 81 |
| Figure 1.32 : | Structure chimique des homogalacturonanes, des xylogalacturonanes, des apiogalacturonanes.. .. | 84 |
| Figure 1.33 : | Représentation schématique des éléments structurels de la pectine..... | 84 |
| Figure 1.34 : | Modèle de la structure primaire de la pectine | 85 |
| Figure 2.1 : | Plan de plaque pour l'essai de neutralisation | 93 |
| Figure 2.2 : | Structure chimique du substrat MUN (4-methylumbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminic) et du produit fluorescent (4-methylumbellifère)..... | 95 |
| Figure 2.3 : | Structure de l'oligosaccharide de la fétuine..... | 100 |
| Figure 3.1 : | Histogramme de la distribution des molécules actives en fonction des 3 groupes d'inhibition vis-à-vis du virus de type A | 135 |
| Figure 3.2 : | Histogramme de la distribution des molécules actives en fonction des 3 groupes d'inhibition vis-à-vis du virus de type B | 136 |
| Figure 3.3 : | Structure chimique d'une chaîne d'apiogalacturonane..... | 138 |
| Figure 3.4 : | Caractère structurel de l'aginate..... | 138 |
| Figure 3.5 : | Structure de l'arabinogalactane de type II des plantes terrestres | 140 |

| | | |
|----------------|--|-----|
| Figure 3.6 : | Structures du fucane sulfaté des algues brunes..... | 141 |
| Figure 3.7 : | Structure chimique des trois types de carraghénane | 142 |
| Figure 4.1 : | L'activité antivirale de l'oligosaccharide 152..... | 149 |
| Figure 4.2 : | Comparaison de l'activité de l'oligosaccharide 152 vis-à-vis de la souche sauvage et du mutant résistant à l'oseltamivir..... | 151 |
| Figure 4.3 : | L'inhibition de l'activité de l'enzyme NA..... | 154 |
| Figure 4.4 : | Essai de neutralisation de la multiplication virale au cours du temps... .. | 157 |
| Figure 4.5 : | Interaction entre les virus et l'oligosaccharide 152..... | 158 |
| Figure 4.6 : | Interaction entre les virus et la fêtuine..... | 158 |
| Figure 4.7 : | La compétition entre l'oligosaccharide 152 et la fêtuine vis-à-vis des virus de type A | 159 |
| Schéma 3.1 : | La relation de l'activité antivirale et des propriétés des arabinogalactanes | 110 |
| Schéma 3.2 : | La relation de l'activité antivirale et des propriétés des fucanes | 116 |
| Schéma 3.3 : | La relation de l'activité antivirale et des propriétés des galactofucanes..... | 118 |
| Schéma 3.4 : | La relation de l'activité antivirale et des propriétés des hétéroglycanes sulfatés..... | 121 |
| Schéma 3.5 : | La relation de l'activité antivirale et des propriétés des apiogalacturonanes..... | 129 |
| Tableau 2.1 : | Liste des molécules testées..... | 88 |
| Tableau 2.2 : | Liste des souches virales testées..... | 90 |
| Tableau 3.1 : | La distribution des molécules en fonction de leurs charges électrostatiques, de leurs familles et de leurs sources..... | 105 |
| Tableau 3.2 : | Activité inhibitrice (%) des molécules de la famille des arabinogalactanes vis-à-vis du virus de type A..... | 108 |
| Tableau 3.3 : | Activité inhibitrice (%) des molécules de la famille des arabinogalactanes vis-à-vis du virus de type B..... | 109 |
| Tableau 3.4 : | Activité inhibitrice (%) des molécules de la famille des fucanes vis-à-vis du virus de type A | 113 |
| Tableau 3.5 : | Activité inhibitrice (%) des molécules de la famille des fucanes vis-à-vis du virus de type B | 114 |
| Tableau 3.6 : | Activité inhibitrice (%) des molécules de la famille des galactofucanes vis-à-vis du virus de type A..... | 117 |
| Tableau 3.7 : | Activité inhibitrice (%) des molécules de la famille des galactofucanes vis-à-vis du virus de type B..... | 118 |
| Tableau 3.8 : | Activité inhibitrice (%) des molécules de la famille des hétéroglycanes sulfatés vis-à-vis du virus de type A..... | 120 |
| Tableau 3.9 : | Activité inhibitrice (%) des molécules de la famille des hétéroglycanes sulfatés vis-à-vis du virus de type B | 120 |
| Tableau 3.10 : | Activité inhibitrice (%) des molécules de la famille des spirulanes vis-à-vis du virus de type A | 122 |
| Tableau 3.11 : | Activité inhibitrice (%) des molécules de la famille des spirulanes vis-à-vis du virus de type B | 123 |
| Tableau 3.12 : | Activité inhibitrice (%) des molécules des familles des carraghénanes, des xylanes sulfatés, des xylomannanes sulfatés, des ulvanes vis-à-vis du virus de type A | 125 |
| Tableau 3.13 : | Activité inhibitrice (%) des molécules des familles des carraghénanes, des xylanes sulfatés, des xylomannanes sulfatés, des ulvanes vis-à-vis du virus de type B | 126 |
| Tableau 3.14 : | Activité inhibitrice (%) des molécules de la famille des apiogalacturonanes vis-à-vis du virus de type A..... | 128 |
| Tableau 3.15 : | Activité inhibitrice (%) des molécules de la famille des apiogalacturonanes vis-à-vis du virus de type B..... | 128 |

LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|--------|---|
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ARN | Acide ribonucléique |
| ARNc | ARN complémentaire |
| ARNm | ARN messenger |
| ARNv | ARN viral |
| BM2 | Le canal à protons du virus influenza de type B |
| CCID50 | Dose infectieuse en culture de cellule 50 % |
| CI50 | La concentration inhibitrice à 50 % |
| CRM1 | Chromosome Region Maintenance protein 1 |
| DO | Densité optique |
| DPBS | Dulbecco's Phosphate Buffered Saline |
| ECP | Effets cytopathiques |
| ELISA | Enzyme linked immunoassay |
| EMEM | Eagle Minimal Essential Medium |
| HA | Hémagglutinine |
| INA | Inhibiteur de la neuraminidase |
| GROG | Groupes Régionaux d'Observation de la Grippe |
| kDa | Kilo Dalton |

| | |
|-----------|--|
| M1 | Protéine de matrice |
| M2 (A/M2) | Le canal à protons M2 du virus influenza de type A |
| MDCK | Cellules Madin Darby Canine Kidney |
| MES | 2-N-Morpholino Ethanesulfonic Acid, sodium salt |
| MUN | 2'-o-(4 methylumbelliferyl)-N-acetylneuraminic acid |
| NA | Neuraminidase |
| NB | Protéine transmembranaire du virus influenza de type B |
| Neu5Ac | Acide N-acétylneuraminique |
| Neu5Gc | Acide N-glycolylneuraminique |
| NEP | Nuclear export protein |
| NES | Nuclear Export Signal (signal d'export nucléaire) |
| NLS | Nuclear Localisation Signal (signal de localisation nucléaire) |
| NP | Nucléoprotéine |
| NS1 | Protéine non structural 1 |
| NS2 | Protéine non structural 2 |
| OMS | Organisation mondiale de la santé |
| ORF | Cadre ouvert de lecture |
| PA | Protéine acide |
| PB1 | Protéine basique 1 |
| PB2 | Protéine basique 2 |
| PBS | Phosphate buffer salin |
| RBS | Site de liaison au récepteur cellulaire |
| RNPv | Complexe ribonucleoprotéique viral |
| SA | Acide sialique |

ACIDES AMINES, CODES A UNE ET TROIS LETTRES

| Nom complet de l'acide aminé | Code à une lettre | Code à trois lettres |
|-------------------------------|-------------------|----------------------|
| Alanine | A | Ala |
| Arginine | R | Arg |
| Asparagine | N | Asn |
| Aspartate ou acide aspartique | D | Asp |
| Cystéine | C | Cys |
| Glutamate ou acide glutamique | E | Glu |
| Glutamine | Q | Gln |
| Glycine | G | Gly |
| Histidine | H | His |
| Isoleucine | I | Ile |
| Leucine | L | Leu |
| Lysine | K | Lys |
| Méthionine | M | Met |
| Phénylalanine | F | Phe |
| Proline | P | Pro |
| Sérine | S | Ser |
| Thréonine | T | Thr |
| Tryptophane | W | Trp |
| Tyrosine | Y | Tyr |
| Valine | V | Val |

INTRODUCTION

La grippe est une maladie respiratoire infectieuse causée par le virus influenza appartenant à la famille des *Orthomyxoviridae*. C'est une maladie qui évolue sur un mode épidémique et qui a, chaque hiver, un impact socio-économique important. Parmi les trois types de virus influenza (A, B et C), ceux de type A (sous-type H1N1 ou H3N2) et ceux de type B sont responsables des épidémies de grippe saisonnière chez l'homme. Cependant seuls les virus influenza de type A peuvent provoquer des pandémies grippales. Au cours du XXe siècle dernier, ils sont responsables de trois grandes pandémies grippales (1918 H1N1, 1957 H2N2, et 1968 H3N2), causant des millions de morts (140). Alors que l'humanité craint une pandémie grippale d'origine aviaire provoquée par le sous-type A (H5N1) depuis 2003 (212), elle doit faire face à l'émergence d'un nouveau virus grippal de type A (H1N1) d'origine porcine (92). La propagation rapide de ce virus au niveau mondial a conduit l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) à élever son niveau d'alerte pandémique en phase 6, officialisant la venue de la première pandémie grippale du XXIe siècle. Cela remarque une apparition imprévisible de nouveaux virus de la grippe.

Au niveau de la stratégie thérapeutique, la vaccination reste le meilleur moyen de lutte contre l'infection grippale. Malheureusement, en cas d'émergence d'un virus pandémique, le délai de production de ces vaccins est un inconvénient. Il est essentiel de mettre en place d'autres stratégies pour faire face à une pandémie. Dans cette optique, il est important de pouvoir disposer d'un traitement antiviral curatif. Jusqu'à maintenant, deux classes d'antiviraux ont été approuvées dans le traitement de l'infection grippale : les inhibiteurs du canal ionique M2 (amantadine et rimantadine) et les inhibiteurs de la neuraminidase (oseltamivir et zanamivir) (51).

Cependant, on assiste déjà aujourd'hui à l'apparition de souches virales résistantes aux composés actuels (56, 124, 181), ce qui rend nécessaire l'identification de substances antivirales suffisamment différentes pour échapper au phénomène de la résistance croisée. Le développement de nouvelles classes d'antiviraux contre la grippe est donc un objectif majeur des années à venir, afin d'étoffer la pharmacopée des produits pouvant être utilisés au cours d'une pandémie, ou au cours d'une grippe saisonnière particulièrement importante.

Les glucides, communément appelé sucres, sont une classe de molécules essentielles des être vivants. Les découvertes récentes montrent que le rôle des sucres dans l'organisme ne se limite pas simplement à une source d'énergie des cellules, et un rôle de structure (par exemple la paroi des cellules végétales). Sous forme de glycoconjugués, les sucres participent dans de très nombreux processus biologiques. Plusieurs pathogènes se servent de ces

structures spéciales, localisées à la surface des cellules, pour pénétrer à travers ces surfaces et diffuser dans l'organisme hôte (322). Les virus influenza, donc, constituent un exemple typique, l'attachement de sa glycoprotéine HA à l'acide sialique terminal des glycoconjugués au niveau de la surface membranaire a été beaucoup étudié (253).

Ces interactions biologiques sont donc une cible potentielle pour le développement d'une nouvelle classe de médicament basée sur des glucides : ces analogues structuraux des glycoconjugués peuvent empêcher l'adhésion des pathogènes aux cellules hôte. Le développement d'inhibiteurs ciblant l'étape d'attachement du virus est une alternative aux molécules antivirales qui ciblent les étapes de décapsidation, répllication, ou libération du virus.

L'origine naturelle des glucides (végétaux) en fait, est une source quasi-inépuisable. La multiplicité des structures exploitables ouvre autant de potentialités thérapeutiques. De façon intéressante, plusieurs polysaccharides sulfatés ont une potentialité d'inhibition *in vitro* sur un large spectre de virus enveloppés, dont le virus de la grippe (221, 310). Cela nous promet une stratégie effective à développer et faire valoriser l'activité antigrippale des sucres d'origine naturelle.

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche financé par l'ANR et la DGE intitulé CARBINFEC. Il s'agit, en collaboration avec deux partenaires industriels (KALYS et ELICITYL) et des partenaires académiques (CNRS CERMAV, IBS-UMR CNRS-CEA-UJF, INSERMU758, CNRS FER3011), de la production de molécules dérivées de sucres complexes et de l'identification de l'activité anti-infectieuse de ces dernières.

Le travail de thèse a consisté dans un premier temps en deux objectifs :

- Notre premier objectif est de cribler une banque d'oligo/polysaccharides fournie par mise en évidence d'un effet inhibiteur contre les virus de la grippe. Cette étude apportera des données de base sur les propriétés antivirales des molécules testées, et nous permet de sélectionner des candidats appropriés pour l'étude ultérieure.
- Notre deuxième objectif est de caractériser la cible virale des molécules d'intérêt ainsi que l'étape du cycle infectieux inhibée par ces dernières.

CHAPITRE I.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. GENERALITES SUR LES VIRUS INFLUENZA

I.1.1. La grippe et classification des virus grippaux

I.1.1.1. *La grippe en général*

La grippe est une infection respiratoire hautement contagieuse provoquée par des virus influenza. Sa transmission interhumaine s'effectue généralement par les contacts rapprochés et l'inhalation de microgouttelettes riches en virus projetées dans l'air par la toux et les éternuements des sujets infectés. L'infection se caractérise par l'apparition brutale d'une forte fièvre, d'une toux sèche, d'angine, d'une rhinite, de maux de tête, de douleurs musculaires. Habituellement, la période d'infection dure environ une semaine, et la plupart des sujets atteints peuvent guérir sans traitement. Cependant, cette maladie peut également évoluer vers une pathologie sévère induisant une mortalité par pneumonie virale ou par surinfection ou par décompensation d'une maladie chronique, en particulier pour les personnes à risques comme les enfants moins de 2 ans, les personnes âgées (≥ 65 ans), les femmes enceintes ou les malades souffrant de pneumopathies, de diabète, de cancer, ou avec des problèmes cardiaques ou rénaux (302).

Les virus grippaux circulent dans le monde entier et provoquent des épidémies annuelles au cours de l'automne et de l'hiver dans les régions tempérées. Quant à la région tropicale, ils surviennent tout au long de l'année, particulièrement au cours de la saison des pluies. Il est estimé que les gripes saisonnières sont responsables de 3 à 5 millions de cas graves et 250 000 à 500 000 décès par an dans le monde (302). Outre le fait d'être une préoccupation de santé publique, la grippe est un problème médico-économique en raison du grand nombre de personnes pouvant être touchés lors d'une épidémie et du coût des soins résultants. Afin de diminuer l'impact de cette maladie, la vaccination reste le moyen prophylactique le plus efficace. Elle permet de réduire jusqu'à 60 % la morbidité et 80 % la mortalité chez les personnes âgées ; et jusqu'à 70 à 90 % des pathologies à la grippe chez les adultes en bonne santé (302).

Au cours du XXe siècle, trois pandémies de grippe ont été décrites et se sont caractérisées par une importante morbidité et mortalité induite. La plus connue et meurtrière est celle de la grippe espagnole A (H1N1) en 1918, avec 20 à 40 millions de morts. La grippe asiatique de 1957 A (H2N2) est responsable de plus d'un million de morts et la grippe de

Hong Kong de 1968 A (H3N2) moins sévère avec environ 500 000 de morts. L'émergence surprenante d'un virus H1N1 d'origine porcine au début du mois avril de l'année 2009 a provoqué une nouvelle pandémie, la première du XXI^e siècle. On estime le nombre de cas rapporté lors de cette pandémie grippale à une dizaine de millions (92). D'autre part, le virus aviaire hautement pathogène de sous type A (H5N1) dont les premiers cas de transmission à l'homme ont été rapportés en 1997, a longtemps été considéré comme un potentiel virus pandémique. Il reste aujourd'hui un virus à fort potentiel pandémique en raison des cas de transmissions rapportés depuis 2003. En sept ans, 505 cas ont été rapportés dont 300 cas mortels (d'après WHO : Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A (H5N1) reported to WHO). La mortalité associée aux infections par le virus H5N1 reste supérieure à 50 %.

1.1.1.2. Classification des virus grippaux

Les virus influenza sont des virus à ARN simple brin de polarité négative, appartenant à la famille des *Orthomyxoviridae*. Il existe trois types sérologiques de virus influenza (A, B et C) classés selon la spécificité antigénique des protéines virales internes, la nucléoprotéine NP et la protéine interne de matrice M1 (208, 300). Parmi ces trois types, seuls les virus de type A sont subdivisés en fonction des deux glycoprotéines de surface, l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA), permettant la définition de 16 sous-types de HA (H1 à H16) et de 9 sous-types de NA (N1 à N9) (79). Alors que les virus de type A ont un large spectre d'hôte (tels que l'homme, plusieurs espèces de mammifères, les oiseaux aquatiques sauvages, les espèces de volailles), les virus de type B et C infectent principalement l'homme. Les virus de type A et B sont responsables des épidémies saisonnières mais seuls les virus de type A sont capables de provoquer des pandémies grippales à intervalles imprévisibles. Les virus C sont liés à des cas sporadiques corrélés à des maladies bénignes.

Les virus de type A responsables d'épidémie sont depuis 1977 de sous-types H3N2 et H1N1, avec dans les années 2000 l'incursion durant 2 saisons du sous-type H1N2 (163). Pour les virus de type B, deux lignées antigéniquement distinctes ont co-évolué depuis les années 1980. Ces deux lignées sont apparentées à la souche B/Victoria/2/87 (la lignée B/Victoria) ou à la souche B/Yamagata/16/88 (la lignée B/Yamagata) (233).

La nomenclature officielle d'un isolat du virus influenza contient les renseignements suivants : le type du virus, l'hôte d'origine (pour toutes les souches isolées de

l'hôte différent de l'homme), le lieu d'isolement, le code de l'isolement, l'année de l'isolement, l'indication des sous-types d'hémagglutinine et de neuraminidase (notée HxNy) uniquement pour le type A (301). Par exemple : A/Brisbane/10/07 (H3N2) signifie virus de type A, de sous-type H3N2, isolé chez l'homme à Brisbane en 2007 dont le numéro d'ordre est 10 ; B/Florida/4/06 (lignée B/Yamagata) signifie virus de type B, isolé chez l'homme à Florida en 2006 dont le numéro d'ordre est 4.

I.1.2. Structure générale du virion

Le virion du virus grippal comporte trois composants majeurs : l'enveloppe virale provenant de la cellule hôte, la couche protéique de matrice (M1), et le core composé de segments d'ARN associés avec les protéines internes.

La structure du virus influenza de type A est de beaucoup la plus étudiée. Son enveloppe est porteuse de trois protéines transmembranaires, l'hémagglutinine (HA) en trimère, la neuraminidase (NA) en tétramère, et le canal à proton (M2) en tétramère. L'hémagglutinine est la protéine majeure de surface (~80 %), la deuxième est la neuraminidase (~17 %), la protéine M2 est présente en faible quantité (~16 – 20 molécules pour chaque virion) (195). En dessous de cette enveloppe, il existe une couche protéique de matrice (M1) qui forme un lien entre l'enveloppe et le génome interne. Une faible quantité de protéine d'export nucléaire (NEP, anciennement appelée NS2) est également associée à M1. Une représentation schématique du virus influenza A est illustrée sur la **figure 1.1**.

Le virus influenza se présente sous forme polymorphe. La structure des virions du virus A/Aichi/2/68 (H3N2) a été analysée par microscopie électronique par Harris *et al.* en 2006 (107). Deux grandes morphologies sont observées, 80 % de particules sphériques de 84 – 170 nm de diamètre, et environ 14 % de formes filamenteuses de 100 nm de diamètre. Le ratio de la quantité des protéines HA et NA à la surface virale est d'environ 6:1. Il semble que les glycoprotéines ne sont pas uniformément réparties à la surface virale par le fait d'une observation de zones à forte densité en neuraminidase (Harris *et al.*) (**figure 1.2**).

Les structures des virus de type B et de type A sont presque similaires. Cependant le type B possède quatre protéines transmembranaires de surface, l'hémagglutinine (HA), la neuraminidase (NA), le canal ionique BM2, et la protéine NB (33) (voir partie I.1.4.3 et I.1.4.4).

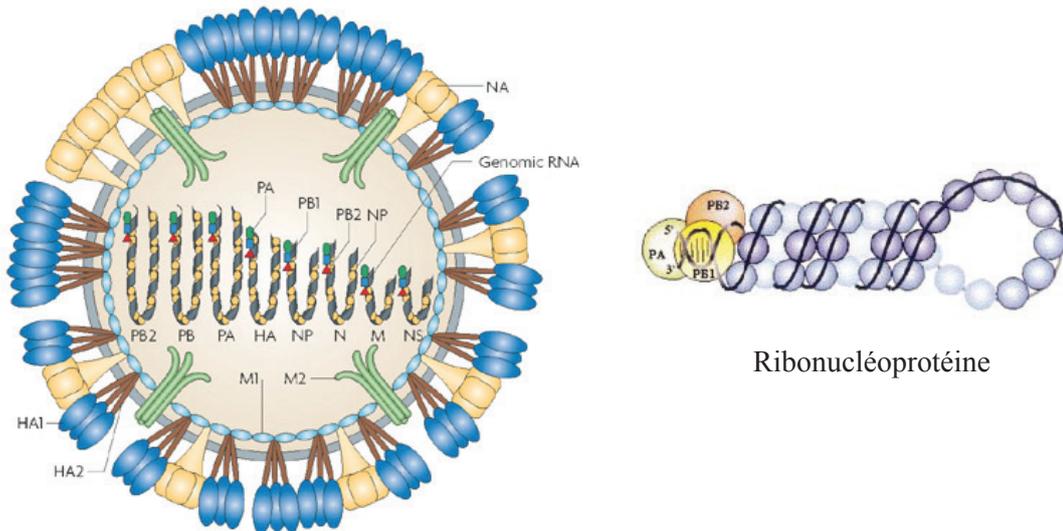


Figure 1.1 : Représentation schématique du virus influenza A et du complexe ribonucléoprotéique. Trois protéines virales sont exposées à l'extérieur des particules de virus : la protéine trimérique HA (contenant deux sous-unités HA1 et HA2 activées par le clivage protéolytique), la protéine tétramérique NA et la protéine de canal ionique M2. Les protéines de matrice M1 tapissent une couche à l'intérieur de la membrane virale. Le génome viral est constitué de 8 segments d'ARN. Chaque segment ARN est associé avec les protéines de nucléocapside NP et les protéines de complexe polymérasique (PA, PB1, PB2) pour former 8 composés de ribonucléoprotéines. (Source : Karlson Hedestam et al, Nat Rev Micro, 2008 (133) ; Portela et Digard, 2002, J Gen Virol (219))

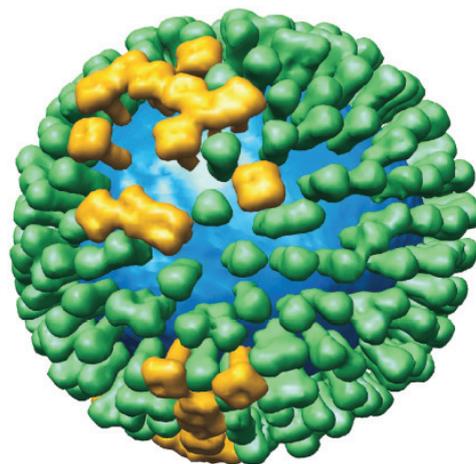


Figure 1.2 : Modèle de la distribution des glycoprotéines HA et NA dans un virion d'influenza. Les protéines HA présentées en vert, les protéines NA présentées en jaune, la bicouche lipidique de la membrane virale est en bleu. Barre d'échelle 20 nm. (Source : Harris et al, 2006, PNAS (107))

I.1.3. Le génome viral

Les virus grippaux possèdent un génome segmenté formé d'ARN monocaténaire de polarité négative. Les virus influenza de type A et de type B comportent huit segments de taille variable. Chaque ARN viral (ARN_v) est trouvé associé avec plusieurs monomères de nucléoprotéine (NP), et avec un complexe polymérasique composé de trois sous-unités (PB1, PB2 et PA) aux extrémités 5' et 3'. Ce complexe à la structure hélicoïdale est appelé ribonucléoprotéine (RNP) ; il est responsable de la transcription et de la réplication de chaque segment d'ARN viral (44, 144). La région codante de chaque segment est flanquée par deux régions non codantes aux extrémités 5' et 3'. Ces régions non codantes se composent d'une partie conservée pour tous les segments (11 à 13 et 9 à 12 nucléotides de l'extrémité 5' et 3' respectivement) et d'une partie non conservée caractérisée par une taille variable et une séquence nucléotidique différente pour chaque segment (229). Les régions non codantes sont impliquées dans la transcription, la réplication, et l'empaquetage des segments (170).

Le génome des virus A et B codent pour 10 à 11 protéines (**figure 1.3 et 1.4**). Pour les deux virus, 9 protéines nécessaires pour la réplication virale sont codées de manière similaire par 8 segments d'ARN. Les segments 1 à 3 codent pour trois protéines, PB1, PB2, et PA, l'association de ces trois protéines formant le complexe polymérasique. Les segments 4, 5, 6, 7, et 8 codent pour l'hémagglutinine (HA), la nucléoprotéine (NP), la neuraminidase (NA), la protéine de matrice (M1), la protéine non-structurale NS1 et la protéine d'export nucléaire (NEP/NS2) respectivement. D'autre part, les génomes de ces virus se distinguent également par le fait qu'ils codent pour des protéines supplémentaires. Pour le génome des virus de type A, le segment 7 code aussi pour une protéine transmembranaire (M2) issu d'un chevauchement des cadres de lecture et qui est transcrite par un processus d'épissage. Certaines souches de type A possèdent une petite protéine PB1-F2 codée par le segment 2. Le génome des virus B code pour deux protéines transmembranaires en plus. La protéine BM2 du segment 7 possède un codon d'initiation chevauchant avec le codon de terminaison de la protéine M1. La glycoprotéine NB est codée par le segment 6.

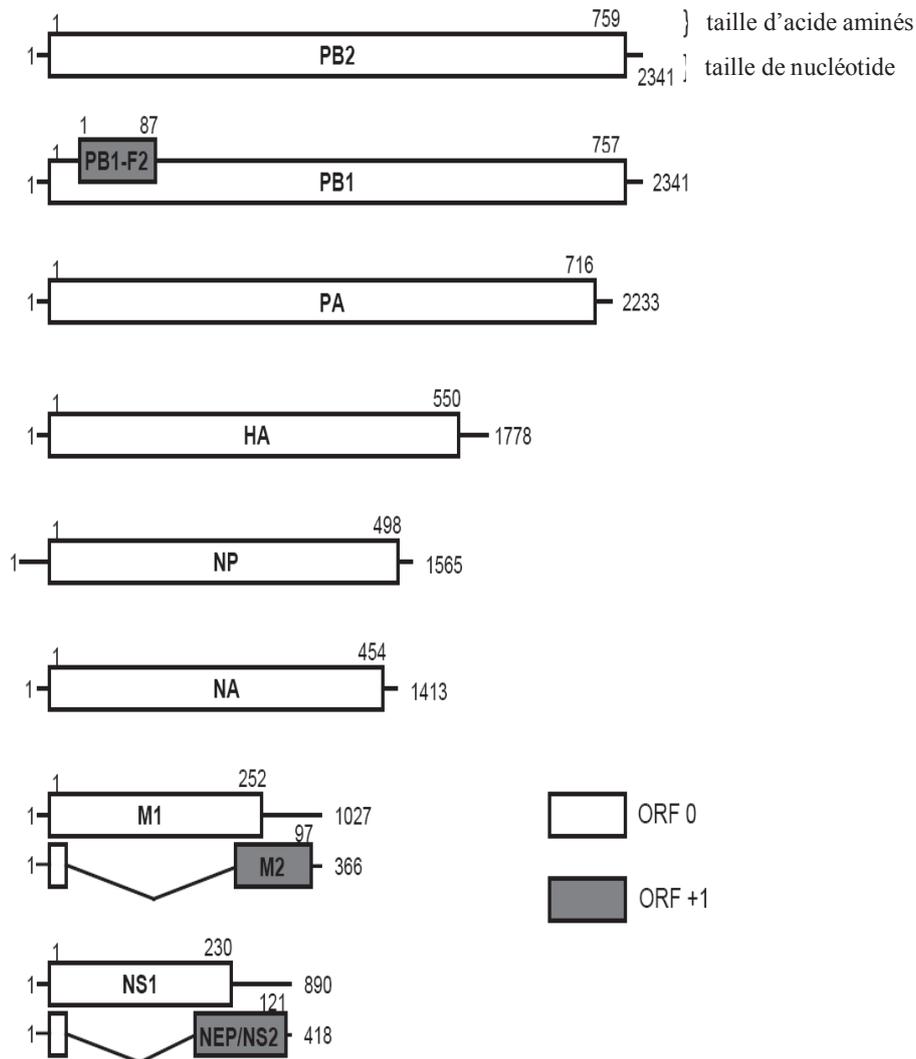


Figure 1.3 : Représentation schématique du génome du virus A/Puerto Rico/8/34. Les rectangles représentent la taille des 8 segments d'ARN (de sens positif) en nucléotides et leurs protéines codées en acides aminés. Les lignes représentent les régions non codantes aux extrémités 5' et 3'. Le segment 2 comporte un deuxième ORF +1 (cadre ouvert de lecture dans la phase +1) code pour la protéine PB1-F2 (cette protéine n'existe pas dans toutes les souches virales). Les protéines M2 (segment 7) et NEP/NS2 (segment 8) sont transcrites par un processus d'épissage à ORF +1 (les introns sont indiqués par des lignes en forme V).

Source : Palese et Shaw, 2007, *Fields Virology* (5th edition) (209)

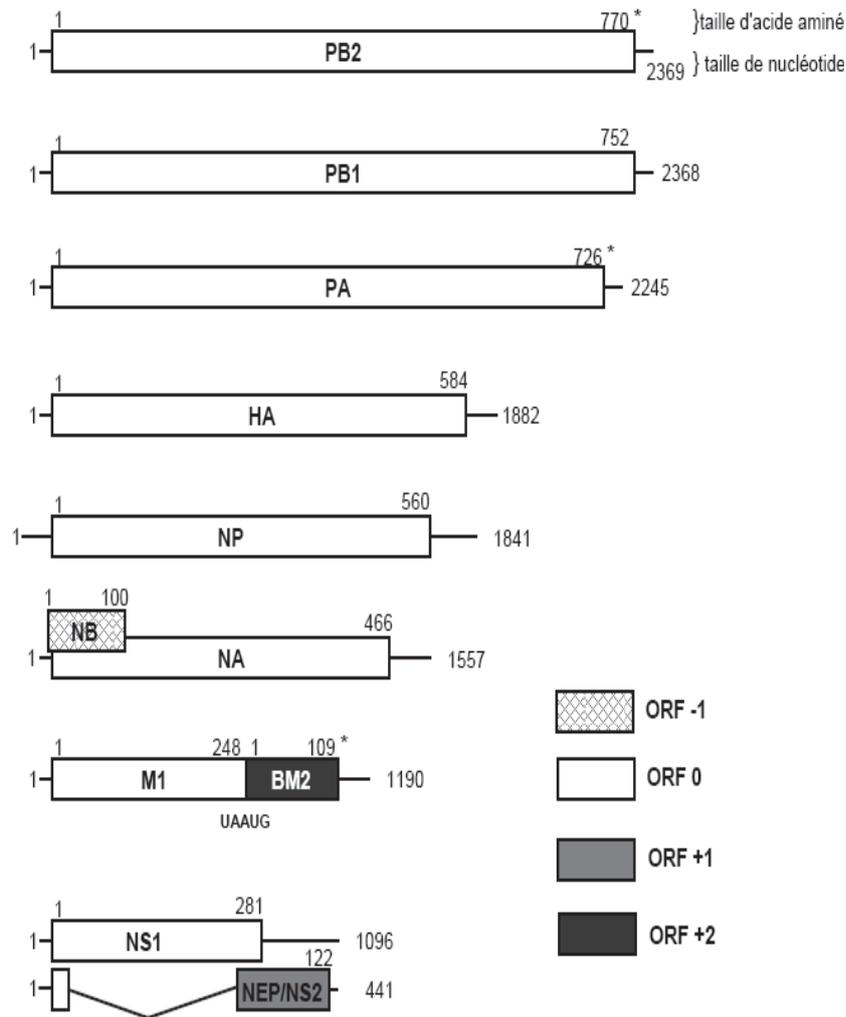


Figure 1.4 : Représentation schématique du génome du virus B/Lee/40. Les rectangles représentent la taille des 8 segments d'ARN (de sens positif) en nucléotides et leurs protéines codées en acides aminés. Les lignes représentent les régions non codantes aux extrémités 5' et 3'. Le segment 6 comporte un deuxième ORF -1 (cadre ouvert de lecture dans la phase -1) code pour la protéine NB. Le segment 7 possède une séquence UAAUG, dont UAA est le codon stop de la protéine M1 tandis que AUG est le codon d'initiation de la protéine BM2 (ORF +2). La protéine NEP/NS2 (segment 8) est transcrite par un processus d'épissage à ORF +1 (les introns sont indiqués par des lignes en forme V). Les astérisques indiquent que les segments d'ARN proviennent du virus B/Memphis/97/12.

Source : Palese et Shaw, 2007, *Fields Virology* (5th edition) (209)

I.1.4. Les protéines virales

I.1.4.1. L'hémagglutinine (HA)

I.1.4.1.1 La structure de l'hémagglutinine

L'hémagglutinine est la glycoprotéine de surface la plus abondante du virion (80 %). C'est une molécule d'environ 220 kDa formée de trois monomères identiques, qui s'associent de façon non covalente. La structure définie de l'HA du virus A/Hong Kong/1968, est composée pour chaque sous-unité monomérique d'un ectodomaine de 503 acides aminés, d'un domaine hydrophobe (24 - 28 acides aminés) qui s'ancre dans la membrane, et d'une queue cytoplasmique (10 - 15 acides aminés) à l'extrémité C-terminale (305) (**figure 1.5c**). Chaque polypeptide de l'hémagglutinine contient aussi un peptide signal (16 acides aminés) à l'extrémité N-terminale, qui est subséquentement enlevé au cours de la procédure de maturation. La protéine HA est synthétisée sous la forme d'un précurseur HA0 non fonctionnel (550 acides aminés) qui est clivé post-traductionnellement en position arginine 329 par une protéase extracellulaire (304). Ses deux sous-unités HA1 (328 acides aminés, 36 kDa) et HA2 (221 acides aminés, 26kDa) sont liées par un pont disulfure entre le résidu 14 de la molécule HA1 et le résidu 137 de la molécule HA2 (**figure 1.5a**).

La structure tridimensionnelle de la partie d'ectodomaine trimérique, libérée par la protéase bromélaïne, a été déterminée par cristallographie aux rayons X. Cette structure contient toute la partie HA1 et les 175 premiers résidus de la partie HA2. Deux régions distinguées sont formées : une région globulaire associée à une région fibreuse allongée (**figure 1.5b**).

- La région globulaire composée de 8 feuillets β antiparallèles sur lesquels se forme une poche où se situe le site de liaison aux récepteurs entouré par les sites antigéniques. Cette région ne contient qu'une partie des acides aminés de l'HA1.
- La région fibreuse contenant à la fois le reste des résidus de l'HA1 et les 175 acides aminés de l'HA2. Cette région est caractérisée principalement par une structure cylindrique de motif hélice-boucle-hélice (résidus 36 – 130 de l'HA2). Trois des hélices (un de chaque monomère) s'associent ensemble en formant une structure « triple-stranded coiled-coil » qui stabilise le trimère. L'extrémité N-terminale d'HA2 porte un domaine hydrophobe appelé « peptide de fusion », il est impliqué dans l'événement de fusion membranaire.

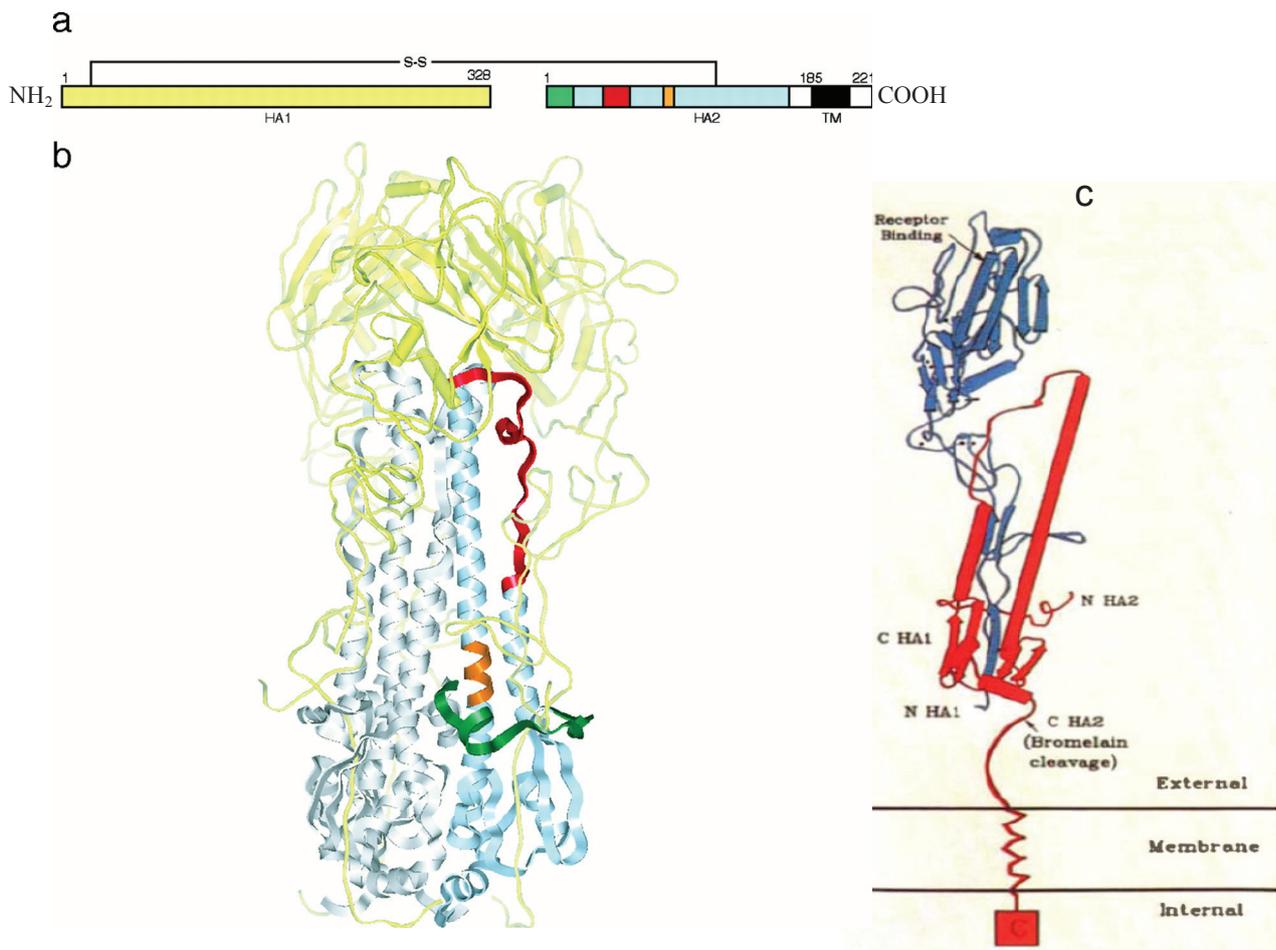


Figure 1.5 : Structure de la protéine hémagglutinine **a)** La structure primaire de la protéine HA, deux sous-unités HA1 et HA2 sont liées entre elles par un pont disulfure. **b)** La structure trimérique de la protéine HA, incluant toute la partie HA1 et les 175 premiers résidus de la partie HA2. Trois monomères d'HA1 (en jaune) sont situés au-dessus d'une région fibreuse composée de trois monomères d'HA2 (deux en gris, un en bleu). Les 20 premiers résidus du peptide de fusion sont indiqués en vert. Une boucle est formée par les résidus 55 à 76 (en rouge) et une structure en hélice α de résidus 106 à 112 (en orange) participent aussi au processus de fusion. **c)** La structure monomérique de l'hémagglutinine, les lettres N et C indiquent les extrémités N-terminale et C-terminale pour deux polypeptides de la protéine HA, HA1 (328 acides aminés) et HA2 (225 acides aminés).

Source : Eckert et al., 2001, *Annu Rev Biochem* (63) ; Wilson et Cox, 1990, *Annu Rev Biochem* (306)

1.1.4.1.2 La fonction de l'hémagglutinine

L'hémagglutinine joue deux rôles principaux dans le cycle viral : 1) Elle reconnaît et s'attache aux récepteurs cellulaires terminés par un résidu d'acide sialique 2) Elle initie le processus d'infection du virus par implication dans l'événement de fusion membranaire.

La fixation spécifique de l'hémagglutinine vis-à-vis de l'acide sialique du récepteur de la cellule hôte

L'attachement des hémagglutinines aux récepteurs cellulaires initie le démarrage de l'infection par le virus influenza. Le site de liaison au récepteur cellulaire (RBS), situé sur la tête globulaire de la protéine HA, est formé par des résidus hautement conservés parmi les virus de type A et B, incluant le Tyr 98, Trp 153, His 183, Gln 190, Leu 194, et Tyr 195 (305). La molécule HA se lie à l'acide sialique (SA) situé en position terminale des chaînes des glycoprotéines ou glycolipides membranaires (304). L'interaction entre la protéine HA et la molécule SA est relativement faible avec une constante de dissociation de l'ordre du millimolaire. Cependant la force de l'attachement est renforcée grâce aux multiples liaisons formées simultanément par les protéines HA et les molécules SA. Les résidus d'acides aminés du site de liaison impliqués dans l'interaction avec l'acide sialique sont représentés dans la **figure 1.6a**.

La spécificité de liaison du site RBS vis-à-vis du récepteur cellulaire dépend de l'acide sialique présent à l'extrémité de la glycoprotéine membranaire. La dénomination, acide sialique, caractérise une famille de monosaccharides composée d'une cinquantaine de molécules qui dérivent de l'acide neuraminique. Ainsi, l'HA des virus de la grippe humaine a une plus forte affinité pour l'acide N-acétylneuraminique (Neu5Ac) que pour l'acide N-glycolylneuraminique (Neu5Gc) bien que ces deux molécules soient courantes chez les mammifères (82). D'autre part, cette spécificité de liaison est déterminée par le type de liaison entre l'acide sialique et le pénultième carbohydre de la glycoprotéine. La liaison pouvant être de type $\alpha(2,6)$ ou $\alpha(2,3)$, selon si la liaison entre l'acide sialique et le pénultième galactose se fait entre le carbone C₂ de l'acide sialique et le carbone C₆ ou C₃ du galactose (**figure 1.6b**). Cette spécificité est hôte dépendant et peut être une des raisons de la barrière d'espèce entre les virus de la grippe aviaire et humaine. Les virus isolés chez l'homme reconnaissent préférentiellement la liaison SA $\alpha(2,6)$ Gal, alors que les virus aviaires reconnaissent la liaison SA $\alpha(2,3)$ Gal (231-232). Dans le cas de virus de sous-types H2 et H3,

cette spécificité de liaison dépend des résidus 226 et 228 présentant dans le site RBS de la protéine HA. L'hémagglutinine des virus humains possède une leucine en 226 et une sérine en 228 ce qui détermine la reconnaissance de la liaison SA α (2,6)Gal, tandis que l'hémagglutinine des virus aviaires possède une glutamine en position 226, associée à la glycine 228 (45) conférant une spécificité pour la liaison SA α (2,3)Gal. Pour les sous-types H1 de la grippe humaine et porcine issus de l'adaptation de virus aviaires, les mutations de glutamine en aspartate en position 190 et glycine en glutamine en position 225 augmentent la spécificité pour la liaison SA α (2,6)Gal (176).

La distribution de différents types de liaisons sialylosiques parmi les espèces et les cellules cibles fait partie d'une pression de sélection par l'hôte. Chez l'homme une grande quantité des sialylooligosaccharides terminés par la liaison SA α (2,6)Gal a été observée sur les cellules de l'épithélium du tractus respiratoire supérieur. Les cellules portant des sialylooligosaccharides terminés par la liaison SA α (2,3)Gal se trouvent dans la partie basse du tractus respiratoire. Ce même type de liaison est présent principalement au niveau de l'épithélium intestinal des canards sauvages (47, 135). Chez le porc, les deux variétés et les deux types de liaison sont présents sur l'épithélium trachéal, ce qui fait de cet animal un lieu de recombinaison possible entre les virus de la grippe humaine et aviaire (128).

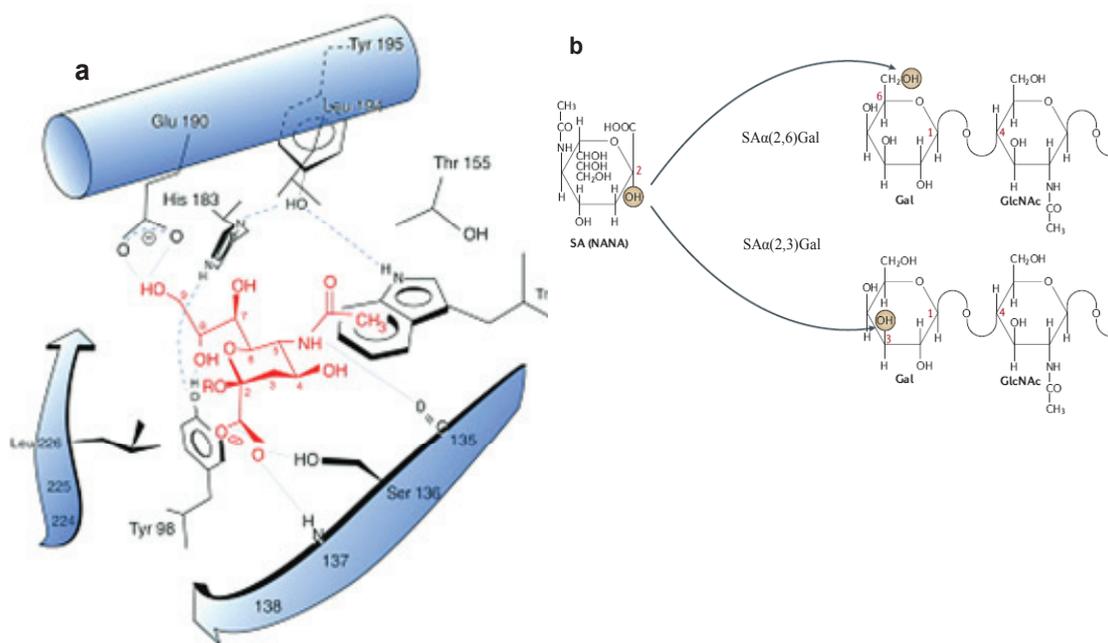


Figure 1.6 : **a)** Représentation schématique du site de liaison de l'hémagglutinine (sous-type H3) lié avec l'acide sialique (en rouge). La base du site de liaison est composée de résidus : Tyr 98, Trp 153, Glu 190, Leu 194, His 183, Thr 155 ; ses côté droit et gauche sont formés par les résidus 134 – 138 et 224 – 228 respectivement. **b)** Deux types de liaison

entre l'acide sialique et le galactose voisin, $\alpha(2,6)$ et $\alpha(2,3)$. Le galactose se lie au résidu N-acétylglucosamine par la liaison $\beta(1,4)$.

Source: Weis et al., 1988, *Nature* (299); Skehel et Wiley, 2000, *Annu Rev Biochem* (253) ; Erik De Clercq, 2006, *Nature Review* (51)

La fusion membranaire

L'événement de fusion a lieu à condition que le clivage du précurseur HA0 soit effectué. Une fois que le virus est internalisé dans un endosome et exposé à un environnement acide ($\text{pH} \sim 5,2$), un changement irréversible de configuration de la protéine HA aura lieu (251). Le réarrangement des composants structurels des deux parties HA1 et HA2 permet d'exposer le peptide de fusion qui est enfoui dans la structure native sous le pH physiologique. Ce peptide hydrophobe à l'extrémité N-terminale d'HA2 est ensuite déplacé à la région distale et s'insère dans la membrane endosomale. Ces activités, par conséquent, entraînent un effondrement des membranes du virus et de l'endosome, favorisant la fusion des membranes et la création d'un pore (**figure 1.7**).

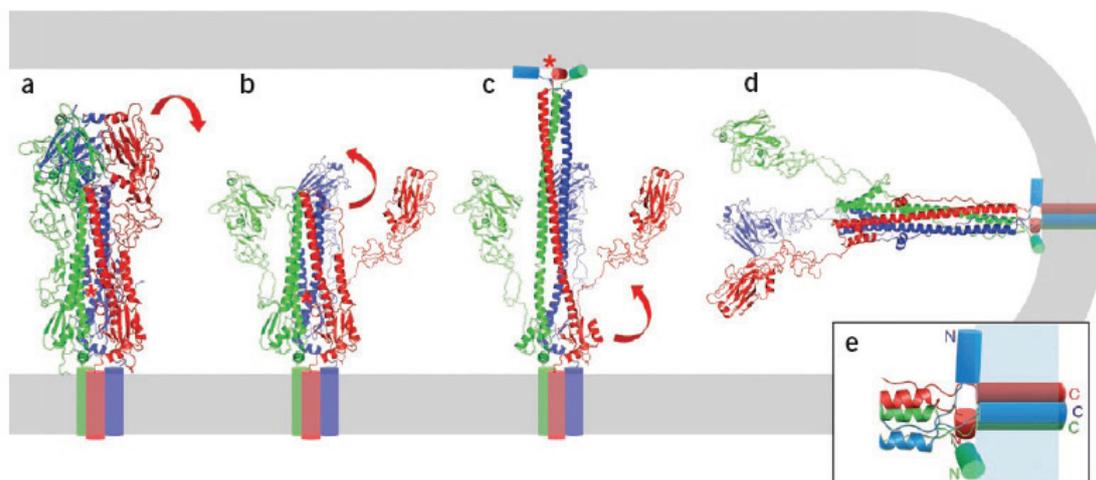


Figure 1.7 : L'événement de fusion membranaire **a)** La structure native de l'hémagglutinine (la liaison entre le site RBS et le récepteur cellulaire n'est pas indiquée). **b)** Les sous-unités HA1 sont dissociées des parties HA2. **c)** Le changement de conformation de l'HA2, la boucle qui connecte deux structures en hélice α devient la même structure en hélice, générant une structure étendue. Cela permet au peptide de fusion (marqué en astérisque) de se déplacer vers la membrane cible et de s'insérer dans la membrane. **d)** L'effondrement de la conformation intermédiaire est effectué pour générer la conformation de post-fusion dans

une orientation horizontale. Cet événement est terminé lors que les deux membranes sont fusionnées complètement. e) La position des extrémités N-terminale et C-terminale de la sous-unité HA2 chez la membrane après la fusion. (Source : Harisson, 2008, *Nat Struct Mol Biol* (108))

Le clivage de la molécule HA

La glycoprotéine HA est synthétisée sous forme d'un précurseur HA0 qui est ensuite modifié par clivage protéolytique en deux molécules HA1 et HA2 liées par un pont disulfure. La combinaison de la composition du site de clivage et la présence des protéases appropriées dans la cellule hôte fait partie d'un facteur de détermination du tropisme viral, donc cette combinaison a une influence particulière sur la virulence du virus aviaire (29, 137, 262, 289).

Tous les virus sont clivés au niveau d'un résidu arginine lié à un résidu glycine conservé. Le site de clivage des virus humains et des virus aviaires avirulents ne contient qu'un acide aminé basique, l'arginine (R). L'action protéolytique est réalisée par les protéases extracellulaires excrétées uniquement par les cellules épithéliales du tractus respiratoire ou par les cellules du tissu intestinal des oiseaux. C'est pour cette raison que la propagation virale est localisée dans ces organes. L'addition de trypsine ou de certaines protéases de type trypsine (telles que la plasmine ou la tryptase Clara) dans le milieu de culture permet également le clivage de la protéine HA (136, 192). Deux protéases de type sérine (TMPRSS2 et HAT) produites par les cellules du tractus respiratoire sont des enzymes potentielles de l'activation protéolytique *in vivo* (30).

Le site de clivage de la molécule HA des virus hautement pathogènes H5 et H7 possède une séquence pluribasique reconnue par les protéases ubiquitaires localisées principalement dans le système *trans*-Golgi comme les protéases de type subtilisine (la furine, le PC5/6) (120). Cela conduit ces virus à se multiplier dans de nombreux tissus de l'hôte, provoquant une infection systémique suivi d'une mort rapide. La plupart des virus virulents portent une séquence consensus R-X-R/K-R ou R-X-X-R (X pour l'acide aminé non-basique, K pour lysine).

1.1.4.1.3 Les sites antigéniques

La glycoprotéine HA est l'antigène majeur reconnu par des anticorps neutralisants. Elle subit une pression de sélection entraînant constamment des modifications au cours du

temps pour échapper aux défenses immunitaires. Cinq épitopes (A, B, C, D, E) ont été identifiées chez le sous-type H3 (283) (**figure 1.8**). Le site A est formé par une boucle des résidus 140 - 146. Le site B est localisé au centre d'une boucle des résidus 155 - 160 et une région hélice α (188 - 198). Le site C est situé à la base du domaine globulaire. Le site D est présent à proximité de l'interface trimérique des domaines globulaires. Le site E se trouve proche à la base du domaine globulaire entre les sites A et C.

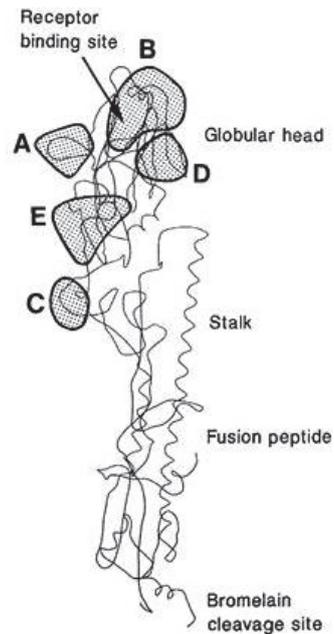


Figure 1.8 : La distribution des sites antigéniques

Source : Wright et al., 2007, *Fields Virology* (5th edition)

1.1.4.1.4 La glycosylation

La quantité et la distribution des sites de glycosylation ne sont pas conservées parmi les hémagglutinines de différentes souches et sous-types (306). De 5 à 11 sites sont présents sur la protéine HA de chaque souche. La composition des chaînes d'oligosaccharide est dépendante non seulement de la souche virale mais aussi de la cellule hôte.

Chaque monomère de l'hémagglutinine du virus A/Hong Kong/68 (H3N2) possède 7 sites de glycosylation via le résidu asparagine, dont 6 chaînes d'oligosaccharides s'attachent à la sous-unité HA1 (en positions 8, 22, 38, 81, 165, 285) et une chaîne à la partie HA2 en position 154 (305). Les chaînes d'oligosaccharide en position 165 et 285 sont constituées

uniquement de deux types de monosaccharides (le N-acétylglucosamine et le mannose), tandis que les autres contiennent le galactose et le fucose en plus. Deux sites de glycosylation 81 et 165 sont localisés dans la région globulaire de la partie HA1. L'absence du résidu d'acide sialique à l'extrémité terminale de ces chaînes d'oligosaccharide est due à l'activité de l'enzyme neuraminidasique.

La fonction biologique des glycanes de l'hémagglutinine n'a pas encore tout à fait été élucidée. Ils sont importants pour le maintien structurel et la stabilité de la protéine HA. La position des oligosaccharides peut moduler l'efficacité du clivage de l'HA, entraînant à une influence sur la virulence virale (55). En outre, il a été démontré qu'ils protègent la protéine à la reconnaissance des protéases et des anticorps neutralisants (252). Une augmentation de la quantité de sites glycosylés sur la tête globulaire de l'HA chez les sous-types H3N2 circulant a été observée, dont récemment 6 à 7 nouvelles positions ont été ajoutées par rapport à 2 sites des souches en 1968. Cette observation suggère que l'addition de nouveaux oligosaccharides permet aux virus d'avoir une capacité à échapper aux anticorps humains (2). Les virus A (H1N1) et B isolés récemment possèdent également plusieurs oligosaccharides sur la région globulaire.

1.1.4.2. La neuraminidase (NA)

La neuraminidase est la deuxième glycoprotéine majeure présente à la surface du virion. C'est un homotétramère (environ 240 kDa) sous forme d'un champignon. Chaque monomère est composé de 4 régions : une queue cytoplasmique conservée (184), un domaine transmembranaire (9), une région linéaire nommée « pied », et une région globulaire, nommée « tête ». La tête globulaire (~200 kDa) s'attache au pied qui s'insère sur la membrane virale par sa région transmembranaire proche de l'extrémité N-terminale (**figure 1.9a,b**).

1.1.4.2.1. La structure de la région globulaire

Le traitement protéolytique de la molécule neuraminidase (du sous-type N2) permet la libération de sa tête globulaire, dont la structure tridimensionnelle a été déterminée par cristallographie aux rayons X en 1983 (285). Cette structure est divisée en 6 parties composées principalement de feuilletts β antiparallèles. Elle porte 4 sites enzymatiques (un sur chaque monomère), et 7 zones antigéniques (43). La poche de fixation de l'acide sialique est

constituée des résidus conservés communs entre les souches du virus de type A et B (**figure 1.9c**).

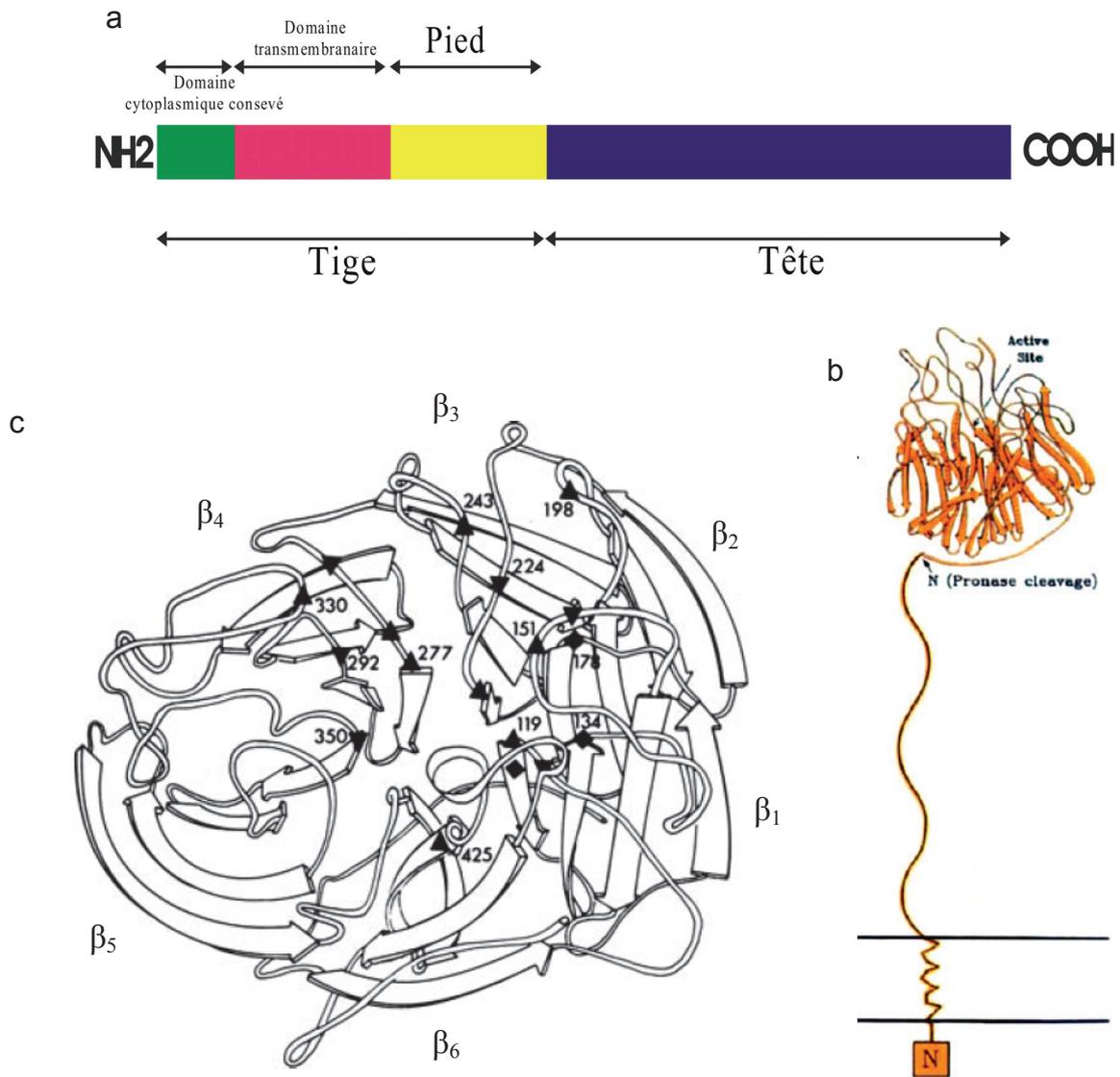


Figure 1.9 : Structure de la neuraminidase **a)** Représentation schématique de la structure secondaire de la NA. **b)** La structure monomérique de la NA. **c)** Représentation schématique du monomère de la NA (sous-type N2) et ses résidus conservés autour du site actif : ▲ Glu 119, Asp 151, Asp 198, Glu 227, Asp 243, Glu 276, Glu 277, Asp 330, Glu 425 ; ▼ Arg 118, Arg 152, Arg 224, His 274, Arg 292, Lys 350 ; ◆ Tyr 121 (remplacé par Phe pour les virus de sous-type N1 et de type B), Leu 134, Trp 178.

Source : Colman, Varghese et Laver, 1983, *Nature* (43) ; Wilson et Cox, 1990, *Annu Rev Biochem* (306)

L'activité enzymatique de la neuraminidase, aussi appelée sialidase, est montrée par sa capacité à hydrolyser la liaison glucosidique entre l'acide sialique et le galactose voisin (59). Huit résidus du site actif ont une interaction directement avec le substrat : Arg 292, Glu 276, Glu 277, Glu 119, Asp 151, Arg 152, Arg 118, Tyr 406 (**figure 1.10**).

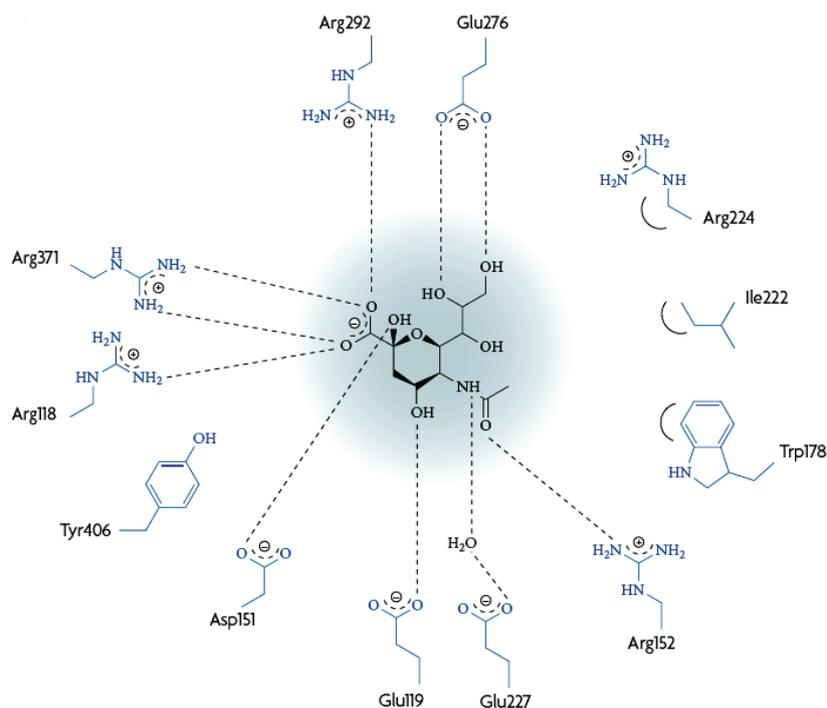


Figure 1.10 : L'interaction entre les résidus du site actif de la NA avec l'acide sialique.
Source : von Itzstein, 2007, Nat Rev Drug Discov (292)

1.1.4.2.2. La fonction de la neuraminidase

Le rôle biologique de la neuraminidase n'est pas encore tout à fait élucidé. Il a été démontré que la neuraminidase jouait un rôle principalement au niveau de la sortie du cycle viral. Elle facilite la libération des virions néoformés par la destruction de ce résidu sialique situé sur l'enveloppe virale et sur les cellules infectées, évitant le phénomène d'agrégation du virus (207). L'hydrolyse des acides sialiques portés par les sécrétions muqueuses des voies respiratoires suggère un autre rôle facilitant l'infection des cellules par les virus (177). La spécificité de la neuraminidase pour les liaisons SA α (2,6)Gal et SA α (2,3)Gal en fonction de l'hôte est arrêté que celle de la protéine HA. L'étude des virus humains de sous-type N2 de

1957 à 1987 a montré l'augmentation de la capacité de cliver la liaison $\alpha(2,6)$ en gardant la spécificité à la liaison $\alpha(2,3)$ au cours de l'évolution de la molécule NA (15).

L'hémagglutinine et la neuraminidase jouent toutes les deux un rôle indispensable mais leurs fonctions sont complètement différentes, voire antagonistes. Leur activité complémentaire est cruciale afin d'atteindre une réplication optimale du virus (185).

Il a été démontré que les anticorps antineuraminidases n'empêchent pas l'infection du virus comme ceux de la protéine HA (132). Cependant, leur capacité à inhiber l'activité de la NA dans la phase tardive permet à ces anticorps de réduire la réplication virale, ainsi la gravité et la durée de la maladie (41, 139).

Bien que la séquence phylogénétique de la protéine NA soit très différente entre les virus de type A et de type B (environ 80 % d'hétérogénéité), leurs résidus du site actif et les structures tridimensionnelles sont conservés. L'activité neuraminidasique du virus de type B est comparable à celle du virus de type A (89, 169).

1.1.4.2.3. La glycosylation

La neuraminidase subit des modifications post-traductionnelles, notamment la glycosylation. Les chaînes d'oligosaccharide s'attachent aux résidus asparagines situés dans différentes régions sur la tête globulaire. La structure et la composition des oligosaccharides dépendent de la cellule hôte (61). De plus, la présence ou l'absence d'une glycosylation peut varier en fonction des souches virales. Quatre positions potentielles ont été identifiées pour le sous-type N2 : 86, 146, 200, 234 (285). La glycosylation sur le site Asn 146 est conservée pour toutes les séquences de la protéine NA, associée avec un glycane de type complexe (N-acétylglucosamine, mannose, galactose, fucose). Elle contient ainsi le résidu N-acétylgalactosamine, qui n'existe pas dans les composants de type complexe des autres sites de glycosylation des protéines NA ou HA (296). Cette glycosylation est située à proximité du site catalytique, et semble avoir une fonction de régularisation. Il a été démontré que l'absence du site de glycosylation à la position 146 permet une augmentation de l'activité neuraminidasique, résultant en un virus neurovirulent chez la souris comme observé avec le virus A/WSN/33 (H1N1) (160).

I.1.4.3. La protéine de canal (A/M2 et BM2)

La protéine A/M2 (ou M2) du virus influenza A est une petite protéine transmembranaire (~ 96 acides aminés), intégrée dans le virion en faible quantité (321). Elle se présente sous la forme d'un homotétramère, chaque unité comporte trois domaines structuraux : le domaine extracellulaire dans la partie N-terminale, le domaine transmembranaire, et le domaine cytoplasmique dans la partie C-terminale. Cette protéine fonctionne comme un canal à ions, permettant aux protons d'entrer dans la particule virale où ils provoquent la dissociation des protéines de la matrice M1 des ribonucléoprotéines virales (RNPv) (215). Le courant ionique traverse le canal formé par les quatre sous-unités identiques de la partie transmembranaire, où les protons doivent être sélectionnés par les résidus constituant la paroi du canal. Parmi ces composants, deux résidus His 37 et Trp 41, trouvés dans le motif HXXXW, jouent un rôle important impliqué dans la sélection ionique et l'activation du canal à pH acide (216) (**figure 1.11**). La protéine M2 est la cible des antiviraux amantadine et rimantadine. Un rôle de maintien d'un pH élevé dans le système *trans*-Golgi en afin de bloquer le changement de conformation de l'hémagglutinine a été démontré lors de l'étude du mécanisme de l'amantadine chez les souches aviaires pathogènes (268).

La décapsidation du virus influenza de type B dépend également de l'activité du canal ionique. Cette activité est attribuée à la protéine BM2, protéine membranaire du virus influenza B (190, 211). La protéine BM2, sous la forme d'un homotétramère, est composée de trois domaines comme A/M2. Deux résidus clés de l'activité de cette protéine, His 19 et Trp 23, sont situés dans le même motif HXXXW du domaine transmembranaire (211) (**figure 1.11**). Cependant, la réplication des virus B n'est pas inhibée par l'amantadine (295). Il semble que le remplacement de certains résidus hydrophobes, situés dans la structure du domaine transmembranaire de BM2, par des résidus polaire de sérine réduit son affinité au résidu hydrophobe de l'adamantane (216).

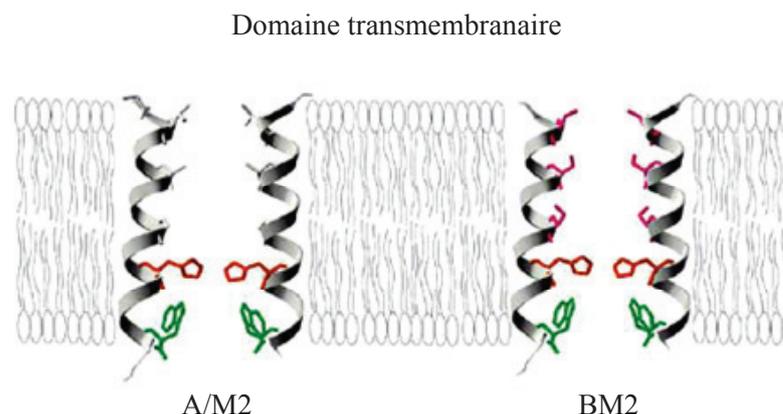


Figure 1.11 : Schéma du domaine transmembranaire de deux protéines A/M2 et BM2. Deux résidus conservés sont indiqués, histidine en rouge et tryptophane en vert. Les sérines de BM2 sont marquées en rose. (Source : Paterson et al., 2003, *Virology* (211))

1.1.4.4. La protéine NB

La protéine NB est une des quatre protéines transmembranaires de surface du virus influenza de type B. Elle est codée par le même segment de la neuraminidase mais avec une ORF différente (23). Cette protéine de 100 acides aminés est présente avec environ 15 à 100 molécules à la surface du virion (33). Elle comprend une région d'ectodomaine dans la partie N-terminale, un domaine transmembranaire, et une queue cytoplasmique. Des études ont suggéré que la fonction de la NB ressemble à celle d'une protéine de canal ionique (220, 269). De plus il a été démontré que la protéine NB est nécessaire pour une réplication efficace du virus *in vivo* mais pas *in vitro* (111). Toutefois la fonction de la NB dans la réplication virale reste encore à élucider.

1.1.4.5. La protéine de matrice (M1)

La protéine M1 est le composant structurel le plus abondant des virus influenza. Elle joue plusieurs rôles indispensables dans différentes étapes du cycle viral, notamment dans le processus de bourgeonnement conduisant à la formation morphologique du virus. En tapissant la face interne de l'enveloppe, les protéines M1 forment une couche intermédiaire entre les protéines de l'enveloppe et les ribonucléoprotéines virales (RNPv). Elle interagit avec la membrane virale par des interactions électrostatiques via son domaine N-terminal (acide aminé 1-164) et avec les RNPv via le domaine C-terminal (acide aminé 165-252) (14). Ces deux domaines sont aussi impliqués dans les processus de polymérisation M1-M1 pour former les dimères et multimères. La zone d'interaction entre la protéine M1 et l'ARN virale (ARNv) se situe au niveau d'un signal de localisation nucléaire (NLS) (65). Elle est un intermédiaire de l'association entre les protéines NEP et RNPv essentielle au transport des RNPv à l'extérieur du noyau (3). De même, l'interaction de la molécule M1 avec les queues cytoplasmiques des glycoprotéines HA et NA semble nécessaire pour le transport de M1 au site de bourgeonnement sur la membrane (294).

1.1.4.6. La nucléoprotéine NP

La nucléoprotéine NP, composant principal du complexe RNPv, est la deuxième protéine la plus abondante du virion. Elle recouvre l'ARNv à raison d'une molécule NP pour 24 nucléotides de l'ARNv (206). L'interaction entre la NP et l'ARNv s'effectue grâce aux résidus chargés positivement de la protéine NP et au squelette phosphorique chargé négativement de l'ARNv (68). Le brin d'ARNv est supposé s'enrouler autour de la molécule NP avec ses bases exposées à l'extérieur, afin qu'il puisse être accessible par la polymérase sans perturber la structure RNPv (13). En plus, la protéine NP possède également la propriété d'homo-oligomérisation contribuant à la structure du complexe RNPv. Cette structure qui peut persister même en l'absence de son composant d'ARNv, est essentielle pour le maintien de l'activité de transcription du complexe RNPv (67, 235). Il s'agit d'une interaction directe entre la protéine NP et deux protéines PB1 et PB2 du complexe polymérasique, interaction qui peut être impliquée dans le mécanisme de sélection entre les voies transcriptionnelles et répliquatives de l'ARN virale (27). Le transport des RNPv et ainsi des NP à l'intérieur du noyau est facilité principalement par les signaux de localisation nucléaire de la protéine NP (48, 202).

1.1.4.7. Le complexe polymérasique (PB1, PB2, PA)

Le complexe polymérasique du virus influenza se compose de trois sous-unités : la protéine basique 1 (PB1), la protéine basique 2 (PB2), et la protéine acide (PA). Ces trois protéines jouent des rôles étroitement liés à l'activité de transcription et de répllication du virus influenza.

1.1.4.7.1. La protéine basique 1 (PB1)

La protéine PB1 contient les motifs conservés responsables du caractère d'ARN polymérase ARN-dépendante (26), catalysant l'addition de nucléotides durant l'étape d'élongation de la chaîne d'ARNv (31). Il a été démontré que la protéine PB1 se lie avec les deux sous-unités PA et PB2 par ses régions N-terminale et C-terminale respectivement (95). En outre, la protéine PB1 se lie aux extrémités 5' et 3' de l'ARN complémentaire (ARNc), et s'associe préférentiellement à l'extrémité 5' de l'ARNv (96-97) pour l'initiation de la

transcription et de la réplication. PB1 possède une activité endonucléasique permettant de cliver la coiffe située à l'extrémité 5' des ARN messagers (ARNm) cellulaires (159).

1.1.4.7.2. La protéine basique 2 (PB2)

La protéine PB2 reconnaît et se lie à la coiffe (5'-m⁷GpppNm) des ARNm cellulaires, qui est ensuite clivée par la protéine PB1 afin de libérer des amorces (10-13 nucléotides) servant à initier l'étape de transcription des ARNm viraux (159, 282). Il a été démontré que la région N-terminale de la protéine PB2 est impliquée dans l'étape de réplication de l'ARNv (88).

De plus, la protéine PB2 joue un rôle important dans la restriction d'hôte ainsi que dans la virulence des virus influenza de type A. En effet, les virus ayant une lysine en position 627 sont capables de se répliquer de façon plus efficace chez les cellules mammifères que ceux avec un acide glutamique (265). Il a été montré que certaines souches aviaires H5N1, H7N7 hautement virulente pour l'homme, possédaient la substitution du résidu lysine par le résidu acide glutamique en position 627 (78, 110).

1.1.4.7.3. La protéine acide (PA)

Le rôle de la protéine PA est moins élucidé. De nombreuses hypothèses l'impliquent dans la réplication ainsi que dans la transcription. Des études de mutagenèse dirigée sur la molécule PA ont permis de relier à la protéine PA une activité endonucléasique et sa capacité de liaison à la coiffe de l'ARNv et au promoteur (76, 106). La protéine PA semble participer à l'assemblage des particules virales (226). Il a été montré que cette molécule possède ou induit l'activité protéolytique (241). De plus, la co-expression des protéines PB1 et PA est nécessaire pour faciliter leur transport au noyau (77).

1.1.4.8. La protéine non structurale NS1

La protéine NS1 est une protéine avec de multiples fonctions, on peut l'isoler uniquement dans les cellules infectées car elle n'est pas intégrée dans le virion. Deux domaines importants de cette protéine ont été décrits : le domaine N-terminal permet la liaison à plusieurs types d'ARN et le domaine C-terminal (appelé domaine effecteur) permet

l'interaction avec des facteurs cellulaires (222). Durant le cycle infectieux, la protéine NS1 participe à la régulation de l'activité du complexe ARN polymérase (247), et à l'induction de la traduction des ARNm viraux (53). Elle est également impliquée dans l'inhibition de la maturation des ARNm cellulaires (165, 196). L'un des rôles importants de la protéine NS1 est l'inhibition du déclenchement de la réponse immunitaire antivirale, particulièrement la réponse aux interférons IFN- α/β (86, 145).

1.1.4.9. La protéine d'export nucléaire (NEP, anciennement NS2)

Traduite du segment 8, avec un ORF différente de la protéine NS1, cette protéine est détectée dans le virion à raison d'environ 130 – 200 molécules (315). Le nom NEP, anciennement NS2, est dû à son rôle indispensable dans l'export nucléaire du complexe RNP virale (203). Elle possède un motif d'export nucléaire (NES) permettant sa liaison avec le facteur cellulaire d'export nucléaire CRM1 (Chromosome Region Maintenance protein 1) par la région N-terminale (197). D'autre part, la protéine NEP interagit aussi avec la protéine M1, qui se lie au RNPv, par la région C-terminale (3). Le complexe entre NEP, M1, RNPv, et CRM1 joue coopérativement afin de conduire le processus d'export nucléaire des RNPv. Récemment, il a été montré que la protéine NEP permet de réguler la transcription et la réplication des virus influenza A par la diminution de l'accumulation des ARN messagers et l'augmentation des ARN complémentaires (228).

1.1.4.10. La protéine PB1-F2

La protéine PB1-F2, récemment découverte par Chen *et al* (2001), est une protéine non-structurale traduite à partir d'un cadre de lecture alternatif du gène codant pour PB1 (40). C'est un peptide de taille de 87 à 90 acides aminés, qui s'exprime dans presque toutes les souches humaines mais pas dans les souches porcines. La protéine PB1-F2 se situe dans la mitochondrie des cellules infectées, où elle provoque une altération morphologique et fonctionnelle de la mitochondrie, induisant une mort par apoptose de la cellule (318). Cette protéine semble participer à la virulence des souches qui la possèdent. Il est montré que la présence de cette protéine permet l'augmentation de virulence du virus d'épreuve lors d'une étude chez les souris (319). En agissant sur le système immunitaire, elle s'attaque aux macrophages alvéolaires et les détruit (42).

I.1.5. Cycle biologique du virus

L'étude *in vivo* a montré que les cellules épithéliales du tractus respiratoire sont les cibles majeures du virus influenza. Le cycle d'infection du virus influenza pourrait être divisé en étapes telles que : l'entrée du virus dans la cellule hôte, le transport des RNPv dans le noyau cellulaire, la transcription et la réplication du génome viral, l'exportation des RNPv du noyau, l'assemblage et le bourgeonnement des particules virales (**figure 1.12**).

Etape 1 : Entrée du virus dans la cellule hôte

Le cycle du virus influenza commence par la reconnaissance spécifique et l'attachement des hémagglutinines aux résidus d'acides sialiques terminaux des glycoprotéines ou des glycolipides de la membrane cellulaire. Une fois que la particule virale se fixe sur la membrane, elle pénètre dans la cellule hôte par un phénomène d'endocytose (151), ce qui fait que le virus est englobé au sein d'une vésicule endosomale. L'environnement acidifié à l'intérieur de l'endosome (pH 5 à 6) provoque le changement conformationnel de l'hémagglutinine (HA2) pour exposer son peptide de fusion. L'événement de fusion membranaire se déroule par l'insertion de la région N-terminale du peptide fusion à la membrane cellulaire alors que la région C-terminale de la partie HA2 reste dans la membrane virale. Ce réarrangement permet aux glycoprotéines de s'ancrer aux deux membranes et à fusionner. En même temps, le courant ionique H⁺ dans l'endosome traverse le canal proton M2 du virus, induisant la dissociation des RNPv de la couche des protéines matricielles M1. Ces deux événements ont lieu ensemble et permettent la libération des 8 ribonucléoprotéines virales dans le cytoplasme.

Etape 2 : Transport des complexes ribonucléoprotéines dans le noyau cellulaire

Une fois libérés dans le cytoplasme, les RNPv sont transportés dans le noyau en traversant le pore nucléaire. Tous les composants de RNPv possèdent les signaux de localisation nucléaire reconnus par les facteurs de transport nucléaire de la cellule hôte (les importines). Cependant, les signaux des protéines NP semblent les plus impliqués dans le trafic d'import nucléaire (202).

Etape 3 : Transcription et réplication du génome viral

Les protéines du complexe polymérasique (PB1, PB2 et PA) sont responsables de la transcription et de la réplication du virus. Dès l'arrivée dans le noyau, les ARNv à polarité négative sont transcrits en ARNm à polarité positive. C'est un processus dépendant de

l'amorce d'oligonucléotide dérivée de la coiffe de l'ARNm cellulaire. La structure de cette coiffe (5'-m⁷GpppNm) est reconnue et clivée par les protéines PB2 et PB1 respectivement. L'élongation est suivie par la protéine PB1 possédant l'activité d'ARN polymérase ARN dépendante. Les ARNm viraux sont maturés par addition d'une queue poly A en 3'. Ils sont exportés dans le cytoplasme pour la fabrication des protéines du virus.

A l'inverse de la transcription, la réplication virale ne dépend pas des coiffes pour l'initiation. Les segments d'ARNv sont utilisés comme matrice pour la synthèse des ARN complémentaires (ARNc) non polyadénylés. Ces ARNc à polarité positive restent dans le noyau et à leur tour servent de matrice pour la synthèse d'ARN négatifs du génome viral. Ils sont également recouverts par les protéines NP et associés avec les protéines du complexe polymérasique.

Les protéines PB1, PB2, PA, NP, NS1, NEP, M1 sont fabriquées dans le cytoplasme. Les protéines de l'enveloppe HA, NA et M2 sont traduites par les ribosomes du réticulum endoplasmique, subissent les modifications post-traductionnelles, et sont transportées vers la membrane de la cellule hôte via l'appareil de Golgi. Les ARN négatifs du génome viral s'associent avec les protéines néosynthétisées NP et les complexes polymérasiques pour former des ribonucléoprotéines RNPv.

Etape 4 : Exportation des complexes ribonucléoprotéines du noyau cellulaire

Les nouvelles RNPv sont transportées du noyau par un processus dépendant de l'interaction entre le facteur cellulaire d'export nucléaire CRM1 et les protéines M1, NEP (3, 197). Les protéines nouvellement synthétisées M1 et NEP sont importées dans le noyau où ces molécules et les RNPv interagissent entre elles pour former le complexe RNPv-M1-NEP. Le motif d'export nucléaire situé sur la protéine NEP lui permet de se lier avec le facteur cellulaire d'export nucléaire CRM1. Les RNPv sont transportées par le pore nucléaire et orientées vers la membrane cellulaire où se trouvent les HA, NA, et M2 nouvellement synthétisées.

Etape 5 : Assemblage, bourgeonnement, et libération des particules virales

L'assemblage du virion se produit à la membrane cytoplasmique de la cellule hôte. Durant ce processus, tous les composants viraux tels que HA, NA, M2, M1, et RNP, sont transportés et rassemblés de façon ordonnée au site d'assemblage. La protéine M1 joue un rôle important dans les processus d'assemblage et de bourgeonnement. (revue, (195))

Les virions néoformés restent attachés à la membrane de la cellule par la liaison de l'hémagglutinine et l'acide sialique. La protéine NA ensuite joue son rôle enzymatique et clive cette liaison pour libérer les virions et leur permettre de se propager sur les nouvelles cibles.

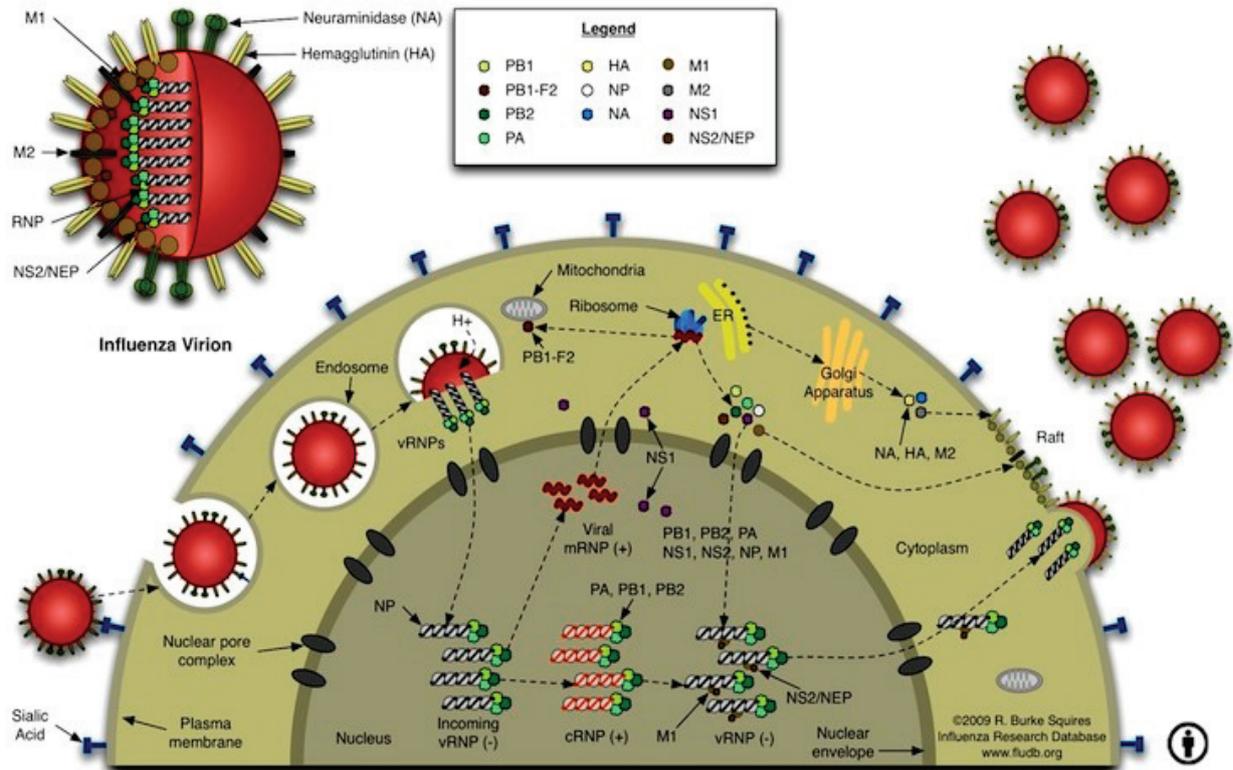


Figure 1.12 : Schéma du cycle d'infection des virus influenza de type A. L'infection du virus commence par la reconnaissance et l'attachement de l'hémagglutinine sur des récepteurs cellulaires contenant d'acide sialique, puis pénétrant dans la cellule par endocytose. Grâce au pH acide à l'intérieur de l'endosome, la membrane virale fusionne avec la membrane de l'endosome permettant la libération de matériel génétique du virus dans le cytosol. Les complexes RNPv se dirigent vers le noyau de la cellule dans laquelle a lieu la réplication et la transcription. Les protéines virales sont synthétisées dans le cytosol. Finalement, c'est le processus de l'assemblage des protéines et le matériel génétique du virus pour former les particules virales. Les virions néosynthétisés ensuite bourgeonnent et disséminent aux cellules voisines.

(Disponible sur : http://www.reactome.org/cgi-bin/eventbrowser?DB=gk_current&ID=168254)

I.1.6. Les variations antigéniques des virus influenza

Les virus grippaux sont dynamiques et évoluent en permanence. Chez l'homme, le taux d'évolution se distingue pour les différents types du virus influenza, le type A évolue plus rapidement suivi par le type B, le type C est plus stable (313).

Les virus influenza de type A sont les plus inquiétants non seulement à cause de leur instabilité mais aussi par leur grand nombre d'espèces d'hôte. L'analyse phylogénétique montre que tous les sous-types HA et NA connus sont maintenus dans les espèces aviaires, notamment les oiseaux aquatiques sauvages (298), une source de réserve gigantesque pour la diversité du virus influenza A. Chez les oiseaux, les virus influenza semblent avoir attendu une adaptation optimale avec un changement limité des acides aminés. Cependant, une fois transmis à un nouvel hôte, tels que les mammifères ou les volailles, ils subissent une évolution pour s'adapter à ce dernier.

L'évolution génétique des virus influenza résulte de deux mécanismes, les variations antigéniques mineures et les variations antigéniques majeures, ces dernières s'appliquent uniquement pour les virus de type A.

I.1.6.1. Les variations antigéniques mineures

Des mutations ponctuelles chez les virus influenza ont lieu fréquemment au cours de la réplication d'ARN faute d'un mécanisme de réparation. En générale, chez les virus à ARN les erreurs d'incorporation de nucléotides par la polymérase est de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-5} par nucléotide et par cycle de réplication (57). La plupart des mutations chez les virus influenza sont silencieuses à l'exception des gènes codant pour les glycoprotéines de surface HA et NA, principalement lorsque ces mutations apparaissent dans des zones antigéniques. Sous la pression de sélection immunologique, les mutations affectant les sites antigéniques s'accumulent progressivement, ce qui correspond à la théorie de l'évolution positive (74). Cela conduit à l'apparition de nouvelles souches grippales capables d'échapper aux défenses immunitaires de l'hôte. De ce fait l'efficacité d'un vaccin peut être diminuée, d'où la nécessité d'une surveillance de la grippe au cours des épidémies pour analyser les propriétés antigéniques et sélectionner les nouvelles souches vaccinales. L'évolution antigénique des virus A (H3N2) semble plus importante que celle subit par les virus A (H1N1). Le taux de substitution nucléotidique dans la sous-unité HA1 du sous-type H3N2 est environ de 4×10^{-3}

substitutions par site et par an, suivi par un taux de 5×10^{-3} de la substitution d'acide aminé par résidu par an (114). Les virus de type B se caractérisent par la co-circulation de variants antigéniquement distincts (114).

1.1.6.2. Les variations antigéniques majeures

Les variations antigéniques majeures résultent d'un changement génétique qui donne naissance à un sous-type, dont l'immunité préalable est absente dans la population humaine et le vaccin des souches saisonnières est inefficace. Ce type de variation est associé avec le risque d'une pandémie et peut survenir de différentes manières. Le mécanisme le plus connu est dû au réassortiment génétique, entraînant un échange de gènes entiers lors de la co-infection d'une cellule par deux virus distincts au minimum. Il résulte des nouveau virus « hybrides », donc 2^8 combinaisons possibles en théorie. Néanmoins, il faut que les combinaisons soient reproductives et adaptées à l'hôte.

Ce phénomène a été responsable des deux pandémies grippales du XXe siècle, dont celle de 1957 (grippe asiatique au sous-type H2N2) et celle de 1968 (grippe de Hong Kong au sous-type H3N2) (**figure 1.13**) (164). Le virus A (H2N2) de 1957 est issu d'un réassortiment entre le virus humain (H1N1) et le virus aviaire (H2N2). En effet, trois segments d'origine aviaire, dont les segments HA, NA, PB1, ont été incorporés dans un fond génétique correspondant au virus H1N1 circulant dans la population humaine depuis la pandémie de 1918. Par conséquent, ce virus remplaça le sous-type H1N1 et se répandit rapidement chez l'homme. En suite, le sous-type H3N2 de 1968 devenu circulant chez l'homme après un réassortiment entre le virus humain H2N2 et un virus aviaire de sous-type H3, dont deux nouveaux segments (HA et PB1) d'origine aviaire ont été acquis. Concernant le virus pandémique H1N1 2009, c'est un virus issu d'une combinaison des souches circulant chez le porc. En effet, la première souche, circulant en Amérique du Nord, est un triple recombinant entre une souche porcine H1N1, une souche humaine H3N2 et une souche aviaire. La deuxième est une souche porcine H1N1 d'origine aviaire, circulant en Europe et en Asie (258).

Dans le cas de la pandémie espagnole de 1918, le virus n'est pas issu d'un réassortiment génétique, mais est dû à un virus aviaire adapté directement à l'homme (**figure 1.13**) (18). Ce mécanisme de transfert à l'homme sans adaptation du virus dans un hôte

intermédiaire, se rapproche de la zoonose observée avec le virus A (H5N1) bien que ce dernier ne se soit pas suffisamment adapté pour permettre une transmission interhumaine.

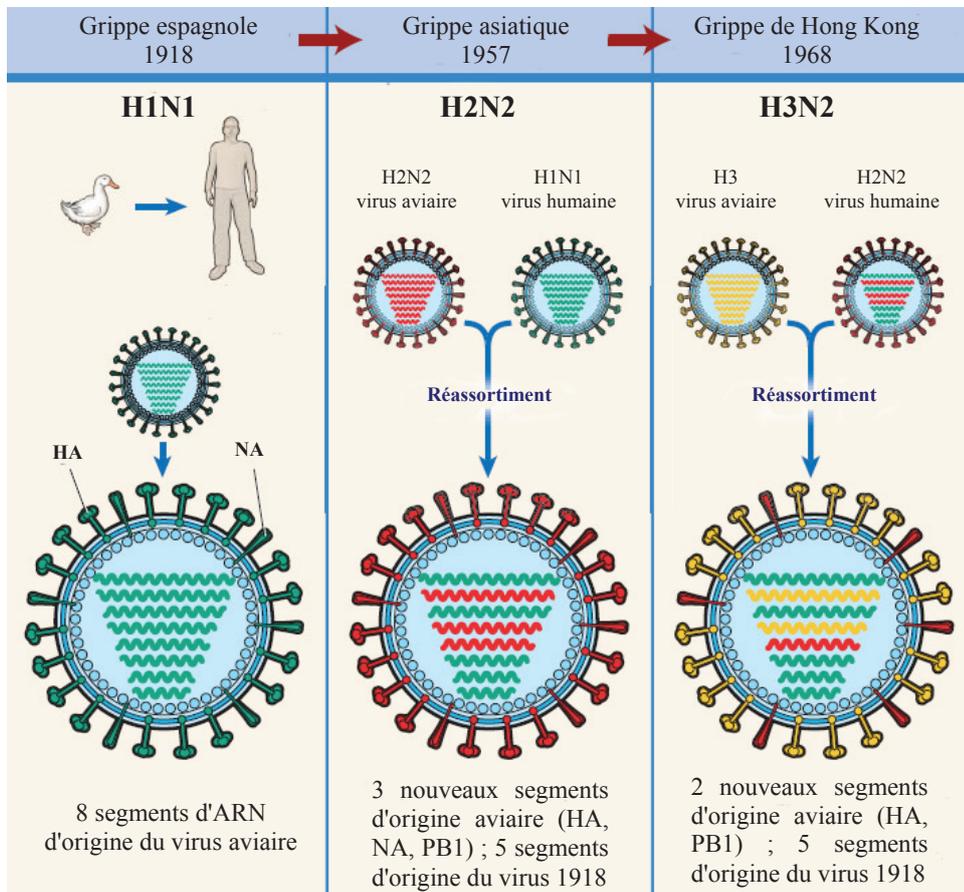


Figure 1.13 : Représentation des variations antigéniques majeures du virus influenza

Source : Belshe, 2005, NEJM (18)

I.2. LES ANTIVIRAUX

Les antiviraux contre la grippe sont des composés développés pour cibler directement les protéines virales ou indirectement les protéines cellulaires impliquées dans le cycle infectieux. En outre, le cycle répliatif du virus influenza pourrait être divisé en trois grandes phases : la phase d'entrée virale incluant l'attachement, la pénétration, la fusion membranaire ; la phase de la répliation et de la transcription du génome viral ; la phase de sortie composée de l'assemblage, de la libération, et de la dissémination du virion néoformé. Donc les antiviraux pourraient être classés en fonction de leurs cibles sur chacune de ces trois phases. Bien que plusieurs antiviraux potentiels aient été étudiés, seulement deux classes de

médicaments sont disponibles pour le traitement et la prophylaxie des infections grippales : les inhibiteurs de la protéine de canal (M2) et les inhibiteurs de la neuraminidase (NA). Actuellement, les inhibiteurs de la neuraminidase sont recommandés à utiliser dans le traitement curatif et préventif du virus de la grippe. En raison de l'émergence rapide de mutations de résistance et de l'incidence des effets secondaires au cours de traitement, les adamantanes sont moins recommandés pour le traitement des patients infectés. La réduction complète de l'utilisation de l'amantadine résulte aujourd'hui de la circulation de souches résistantes aux adamantanes aussi bien dans le sous-type H3N2 que H1N1.

I.2.1. Les inhibiteurs de l'entrée virale

I.2.1.1. Camostat – L'inhibiteur de l'activation protéolytique de la protéine hémagglutinine

Le clivage de la protéine HA est une étape préalable pour initier l'infection virale. L'inhibition de cette activité peut, par conséquent, bloquer la réplication virale. Le camostat mesilate, un dérivé du p-guanidinobenzoate, est l'un des inhibiteurs potentiels ciblant le processus protéolytique du virus influenza. Il joue le rôle d'un inhibiteur de la protéase de type sérine, donc bloquant indirectement le clivage du précurseur HA0. Dans l'étude *in vitro*, le camostat a présenté une activité inhibitrice vis-à-vis des virus influenza de type A/H3N2 (A/Ishikawa/7/82) et de type B (B/Singapore/222/79), avec les valeurs CI50 (concentration inhibitrice de 50 %) à 2,2 µg/ml et à 5,8 µg/ml respectivement (122). Son activité a été évaluée *in vivo* chez les souris infectées par la souche A/Taiwan/1/86 (H1N1). Après 5 jours post-infection, les souris traitées par le camostat présentent une diminution de l'excrétion virale de 45 % par rapport à celle du groupe témoin (155). Cependant l'activité potentielle de ces inhibiteurs a été relativement inexplorée.

I.2.1.2. Cyanovirin-N – L'inhibiteur de l'attachement virale

La Cyanovirin-N, une protéine provenant de la cyanobactérie *Nostoc elliposporum*, est capable d'inhiber un large spectre de virus incluant le virus influenza. L'effet inhibiteur contre plusieurs souches grippales de type A et B, dont les virus résistants à l'inhibiteur de la neuraminidase, a été démontré *in vitro* avec une valeur CI50 comprise entre 0,004 µg/ml et

0,04 µg/ml (201). Les oligosaccharides de la glycoprotéine de surface (HA) ont été identifiés comme les cibles spécifiques de cette molécule. L'activité inhibitrice de Cyanovirin-N a été évaluée *in vivo* chez les souris (0,5 mg/kg/jour pendant 4 jours) et les furets (deux fois de 50 µg par jour pendant 5 jours) (256). Le traitement précoce (4 heures avant de l'inoculation virale) a diminué jusqu'à 1000 fois les titres viraux dans le poumon des souris au 3^{ème} jour de l'infection avec 100 % de survie. Le traitement des furets avec la Cyanovirin-N a commencé 24 heures avant de l'infection virale. Le jour de l'inoculation virale, une première dose de Cyanovirin-N est administrée aux furets 4 heures avant l'instillation du virus. Une seconde dose est inoculée aux furets 4 heures après le challenge viral. Le résultat obtenu s'est également traduit par la diminution de la charge virale de 100 fois dans les lavages nasaux après un jour de l'infection. Ces résultats présentent le potentiel de Cyanovirin-N pour la prophylaxie et le traitement précoce des infections par le virus grippal.

1.2.1.3. DAS18 – La protéine de fusion composée de l'activité sialidase

La DAS181 (Fludase) est une protéine de fusion recombinante composée de domaine catalytique de sialidase, provenant d'*Actinomyces viscosus*, fusionnée avec une séquence d'ancrage à la surface des cellules de l'épithélium respiratoire (173). Elle fonctionne en enlevant les acides sialiques du récepteur cellulaire afin de bloquer l'entrée du virus influenza. Son activité antivirale contre les virus grippaux de type A et B a été observée *in vitro*, ainsi qu'*in vivo* par l'inhibition de la réplication des souches H1N1 chez les souris et les furets. De plus, le traitement quotidien par DAS181 à 1 mg/kg/jour a permis de protéger 100 % des souris vis-à-vis de la souche hautement pathogène H5N1 (A/Vietnam/1203/2004) (16). La fonction sialidase de cette molécule a aussi été évaluée sur les cultures mimant des cellules du tractus respiratoire différenciées et des tissus bronchiques humains (279). L'action antivirale de la DAS181 a été confirmée sur des souches saisonnières résistantes à l'oseltamivir (280). L'efficacité remarquable de la DAS181 représente une nouvelle stratégie antivirale innovante dans la lutte contre les virus grippaux.

1.2.1.4. TBHQ – L'inhibiteur du changement conformationnel de l'hémagglutinine

La molécule TBHQ (tert-butyl hydroquinone) appartient à la classe des inhibiteurs bloquant le changement conformationnel de la protéine HA, l'événement indispensable pour le déclenchement de l'étape de la fusion membranaire (28, 119). Deux structures cristallographiques des protéines HA (sous-types H3 et H14) en présence de la molécule TBHQ ont été caractérisées (238) (**figure 1.14**). En effet, cette molécule se fixe dans une poche hydrophobe formée à l'interface entre les monomères de la protéine HA. Elle stabilise donc la conformation de la protéine HA dans l'environnement acidifié, empêchant son réarrangement nécessaire à la fusion membranaire. Une modification structurelle de la molécule TBHQ est nécessaire afin d'obtenir une des molécules plus puissantes pour confirmer cette nouvelle stratégie thérapeutique.

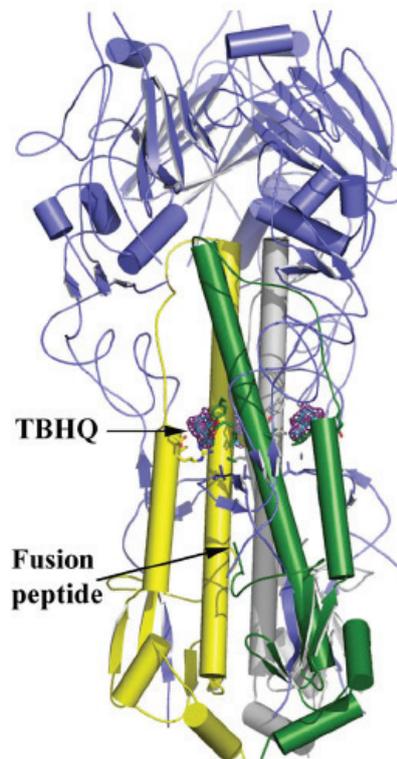


Figure 1.14 : Le site de fixation de la molécule TBHQ sur la protéine HA.

Source : Russell, 2008, PNAS (238)

1.2.1.5. Dérivés d'adamantane – L'inhibiteur du canal ionique M2

L'amantadine (Symmetrel) et son dérivé, la rimantadine, ont été découvertes dans les années soixante et sont capables d'inhiber la multiplication du virus influenza de type A (49, 179). Ce sont des amines primaires stables à 10 carbones sous forme de chlorhydrate (1-adamantanamine et α -méthyl-1-adamantane méthylamine respectivement) (**figure 1.15**). L'amantadine a été approuvée en 1976 pour traiter des infections aux virus grippaux de type A. Elle est bien absorbée par voie orale (272). La dose de 200 mg/jour est utilisée dans le traitement chez les adolescents. Le traitement pendant 24 – 48 h dès l'apparition des symptômes et sa continuation jusqu'à un ou deux jours après la fin des symptômes sont recommandés pour l'efficacité du médicament. La rimantadine est aussi utilisée pour le traitement de la grippe A. Elle possède une activité comparable à celle de l'amantadine (75). Des essais cliniques ont montré qu'une dose inférieure à 100 mg de l'adamantane était efficace pour la prophylaxie de l'infection par le virus grippal de type A (32, 244). Ces inhibiteurs agissent principalement dans la phase précoce de la réplication virale. Ils interviennent dans l'action des canaux ioniques M2, entraînant l'inhibition de la dissociation des protéines matricielles M1 et les nucléoprotéines virales RNPv (113, 146). L'utilisation de ces inhibiteurs est limitée à cause de nombreux effets secondaires concernant le système nerveux central (nervosité, dépression mentale, insomnie) et les désordres gastro-intestinaux (nausées, vomissements, diarrhée).

Cependant, le problème le plus important est la sélection rapide de virus résistants lors du traitement avec les adamantanes. Ce phénomène a été observé dans les études *in vitro* et *in vivo* (4, 17). Les virus résistants sont caractérisés par l'une des mutations en positions 26, 27, 30, 31, ou 34 sur la région transmembranaire de la protéine M2. De plus ces résistants sont stables, transmissibles, et aussi virulents que les sauvages (270). Selon des programmes de surveillance, la prévalence des virus résistants a significativement augmenté de 0,4 % en 1994 – 1995 à 12,3 % en 2003 – 2004, et à 91 % au cours de la saison 2005 – 2006, particulièrement chez les sous-type A (H3N2) (34, 56). Aux Etats-Unis, 91 % du sous-type A (H3N2) ont montré une substitution en position 31 (sérine à asparagine) concernant la résistance à l'amantadine et à la rimantadine dans la saison grippale 2005 – 2006 (35). L'émergence des résistants chez le sous-type H1N1 a atteint les 15,5 % dans la saison 2005 – 2006 (56). Une partie des virus de la grippe aviaire H5N1 (2003 – 2004) isolés dans les pays d'Asie du Sud-est possèdent ce type de résistance (158). Vu le risque d'émergence de

résistances à l'amantadine et à la rimantadine, elles ne sont plus recommandées dans le traitement et la prophylaxie des virus grippaux.

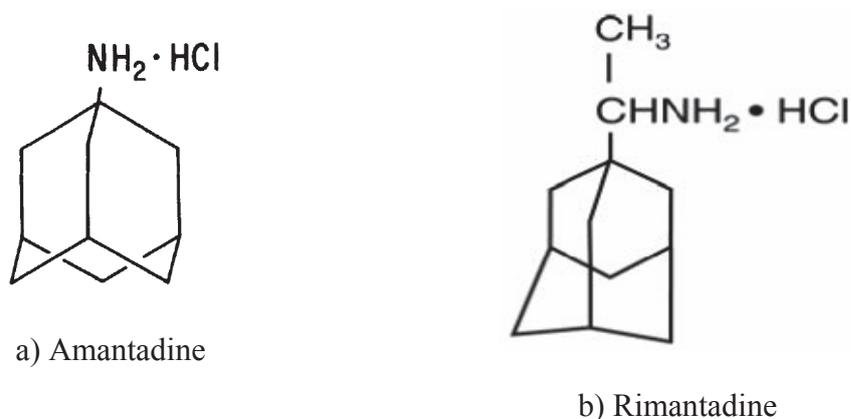


Figure 1.15 : Structure chimique de **a)** Amantadine ; **b)** Rimantadine

1.2.2. Les inhibiteurs de la réplication et de la transcription du virus influenza

1.2.2.1. Ribavirine, viramidine – Les analogues de nucléoside synthétique

La ribavirine (Virazole) a été découverte comme un inhibiteur contre de nombreux virus à ADN et à ARN depuis longtemps (248, 264) (**figure 1.16a**). C'est un analogue nucléosidique de la guanosine (1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide). Il a été démontré que la forme triphosphate de la ribavirine (RTP) est incorporée par l'ARN polymérase, bloquant ainsi l'élongation de l'ARN viral (69). L'efficacité de la ribavirine vis-à-vis des virus influenza de type A et B a été étudiée *in vivo* (19, 307). Le traitement administré par voie orale, sous forme d'aérosol, est efficace pour les virus grippaux de type A (H1N1) et de type B (91). Cependant l'utilisation de la ribavirine est limitée à cause de certains effets secondaires observés par voie orale (312). La combinaison de la ribavirine et de l'interferon α a été approuvée dans le traitement de l'hépatite C (50).

La viramidine (ribamidine, 1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) est un analogue nucléosidique de la purine (**figure 1.16b**). Elle présente une activité antivirale contre les virus influenza de type A (H1N1, H3N2, H5N1) et de type B *in vitro* et *in vivo*

(249). Dans ces expériences, les valeurs de CI50 *in vitro* et la toxicité de la viramidine (2 à 32 µg/ml, et 760 µg/ml) sont inférieures à celles de la ribavirine (0,6 à 5,5 µg/ml, et 560 µg/ml). L'administration par voie orale de la viramidine de 15 à 31 mg/kg/jour pendant 5 jours a protégé les souris infectées. De plus, les deux molécules viramidine et ribavirine sont efficaces dans le traitement même après 48 heures de retard chez les souris infectées par le virus A/NWS/33 (H1N1). La tolérance de la viramidine est trouvée meilleure que celle de la ribavirine (162). L'étude approfondie concernant l'efficacité de la viramidine contre les infections aux virus grippaux doit être poursuivie.

1.2.2.2. T-705

Le T-705 (6-fluoro-3-hydroxy-2-pyrazinecarboxamide) est un dérivé de la pyrazine développé par le laboratoire pharmaceutique japonais Toyama Chemical (**figure 1.16c**). Il présente une forte activité inhibitrice vis-à-vis du virus influenza de type A, B, et C *in vitro* et *in vivo* (80). Les valeurs de CI50 de T-705 sont dans l'intervalle de 0,013 à 0,48 µg/ml, alors qu'il ne présente pas de toxicité jusqu'à la concentration de 1000 µg/ml. Il est aussi actif contre certaines souches résistantes à l'inhibiteur de la neuraminidase et de l'amantadine. L'administration par voie orale de T-705 à 100 mg/kg/jour (4 fois/jour) pendant 5 jours réduit significativement la multiplication virale (A/PR/8/34 H1N1) au niveau pulmonaire des souris. Il a été démontré que le T-705 n'interagit pas avec la synthèse de l'ADN ou de l'ARN cellulaire. Lors de l'entrée dans la cellule, le T-705 est converti en sa forme active de triphosphate en inhibant l'activité polymérase de l'ARNv et bloque la réplication virale (81). Des essais de T-705 chez les souches aviaires H5N1 ont montré que la concentration inhibitrice se situe entre 1,3 à 7,7 µM. Elle est moins efficace que celles de l'oseltamivir et du zanamivir mais plus que celle de la ribavirin dans la même expérience (250). La dose de 30 à 300 mg/kg/jour par voie orale de T-705 est tolérée et lui permet de protéger les souris infectées. Particulièrement, la dose de 300 mg/kg/jour est encore effective même dans le cas du traitement retardé de 96 heures après l'infection. Le T-705, déjà en phase I des essais cliniques, offrirait une alternative thérapeutique contre le virus grippal.

I.2.2.3. Flutimide – L'inhibiteur de l'activité endonucléasique

L'activité endonucléasique du complexe polymérasique est responsable de l'initiation de la transcription de l'ARNv. Les composés dérivés de l'acide 2,4-dioxobutanoïque sont capables d'inhiber sélectivement l'activité endonucléasique du virus influenza de type A et B, avec les valeurs de CI50 de 0,2 à 29,0 μM (277). De la même façon, un produit naturel extrait du fungi *Delitschia confertaspora*, nommé Flutimide (2,6-diketopiperazine), a montré sa capacité à inhiber la réplication des virus grippaux (278) (**figure 1.16d**). Cette activité endonucléasique est conservée dans les virus influenza, et peut donc constituer une cible de choix en perspective pour développer un nouvel antiviral contre les virus influenza.

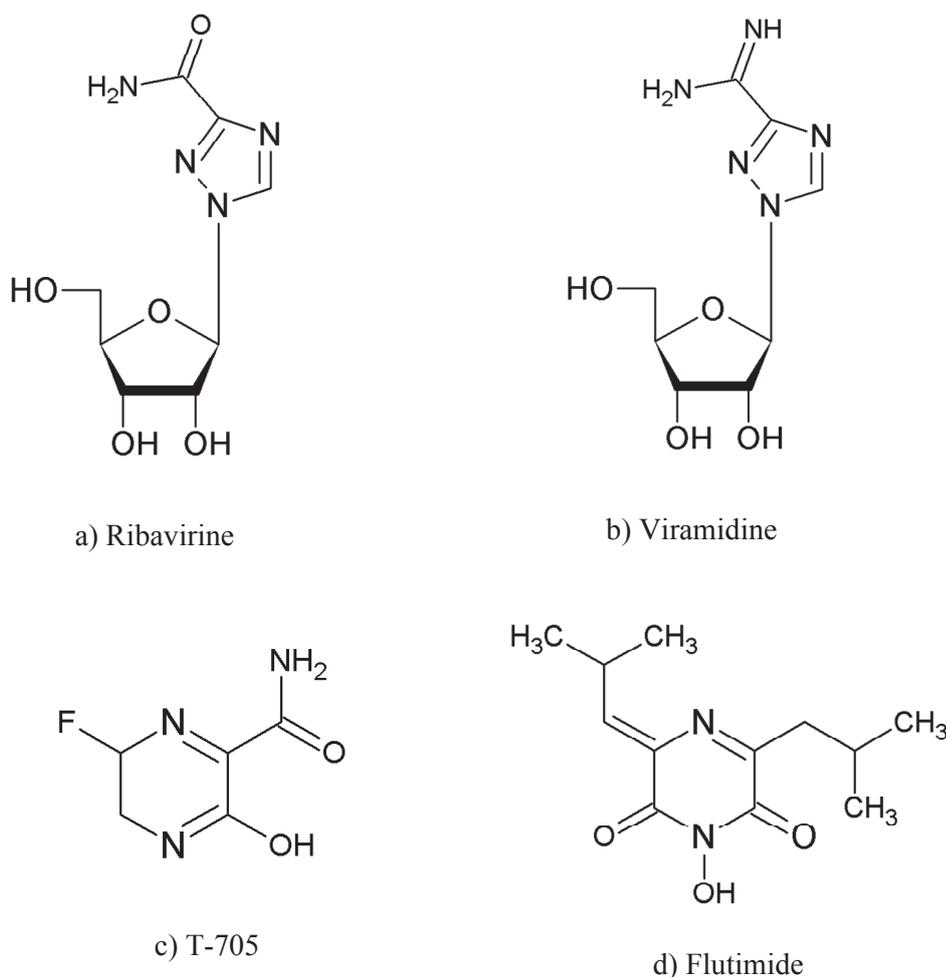


Figure 1.16 : Structure chimique de **a)** Ribavirine ; **b)** Viramidine ; **c)** T-705 ; **d)** Flutimide

I.2.3. Les inhibiteurs de la sortie du virus – Les inhibiteurs de la neuraminidase (INA)

Grâce à son rôle indispensable et son site actif hautement conservé, la neuraminidase est intéressante pour la stratégie de développement d'inhibiteurs. Les inhibiteurs de la neuraminidase permettent d'inhiber l'activité enzymatique, empêchant ainsi la libération des virions néoformés et leur relargage. Deux inhibiteurs de la neuraminidase, le zanamivir (Relenza[®], GlaxoSmithKline) et l'oseltamivir (Tamiflu[®], Roche Pharmaceuticals), ont été approuvés par l'organisation de FDA comme traitement curatif contre des virus grippaux. Ces médicaments sont efficaces contre les deux types de virus influenza, le type A et le type B. Le développement de ces molécules s'est basé sur la méthode appelée « Structure based drug design ». En effet il s'agit de l'utilisation de la structure cristallographique de la protéine neuraminidase (principalement du sous-type N2) complexée avec son substrat l'acide sialique (285-286), et en combinaison avec des outils bioinformatiques permettant la prédiction des sites de liaison favorables. Ainsi, ils sont des dérivés du premier inhibiteur potentiel, DANA ou Neu5Ac2en (2-désoxy-2,3-didéhydro-N-acétylneuraminique), qui mime l'état de transition de l'acide sialique durant la réaction enzymatique (182).

I.2.3.1. Zanamivir

Le zanamivir était le premier du groupe des inhibiteurs de la neuraminidase à avoir été approuvé et commercialisé sous le nom Relenza[®]. Il a été créé par la substitution d'un groupement guanidinium sur le carbone 4 de la molécule DANA pour former son dérivé 4-guanidino-Neu5Ac2en (GG167) (291). Ce groupement guanidinium interagit avec deux résidus conservés Glu 119 et Glu 227 de l'enzyme, permettant à la molécule de se lier fortement au site actif. Les structures chimiques des molécules DANA, NANA (acide sialique), et zanamivir sont présentées dans la **figure 1.17 a,b,e**.

L'étude *in vitro* a montré une forte activité de la molécule zanamivir spécifique vis-à-vis des neuraminidases de plusieurs souches virales de type A et B, avec une valeur CI50 de l'ordre de la nanomole (311). De plus, le traitement par voie intranasale des souris et furets infectés *in vivo* a démontré son efficacité pour diminuer le taux de mortalité (239-240). Le zanamivir est également efficace contre les virus influenza aviaries (H6N1, H9N2 et H5N1) (157).

Des études cliniques du zanamivir ont été réalisées (revue (66)). Le zanamivir est administré par inhalation à cause de sa faible biodisponibilité, environ 90 % de la dose est éliminée dans l'urine sous forme active. Il est indiqué dans le traitement des virus influenza de type A et B chez l'adulte et les enfants à partir de 7 ans lorsque l'apparition des symptômes est inférieure à 48 heures. Le traitement consiste en 2 inhalations de 5 mg de zanamivir par jour pendant 5 jours. Le zanamivir est toléré avec certains effets secondaires communs tels que la diarrhée, des nausées, des étourdissements, des maux de tête... Il est déconseillé aux patients souffrant d'asthme ou de broncho-pneumopathie obstructive chronique. L'utilisation du zanamivir est aussi évaluée pour la prophylaxie afin de prévenir la transmission du virus grippal (117). En outre, l'efficacité et la sécurité du zanamivir administré par voie intraveineuse ont été étudiées (37).

1.2.3.2. Oseltamivir

L'oseltamivir est le deuxième inhibiteur de la neuraminidase à être approuvé et commercialisé sous le nom Tamiflu[®]. Aujourd'hui, il est le plus utilisé pour le traitement et la prophylaxie dans la lutte contre les virus grippaux. De plus, il est actuellement stocké par de nombreux pays dans le cas d'explosion d'une pandémie grippale. L'oseltamivir est un analogue carboxylique dérivé de la molécule DANA et zanamivir, principalement basé sur un cyclohexène sans oxygène avec une substitution d'un groupement hydrophobe attaché à la position 6 via un lien esthétic (141). L'oseltamivir est synthétisé sous forme d'une prodrogue de phosphate d'oseltamivir (GS4104), qui est hydrolysé par les enzymes d'estérase pour le transformer en son métabolite actif, le carboxylate d'oseltamivir (GS4071) (161). Ce caractère structurel permet à l'oseltamivir d'avoir une bonne biodisponibilité orale en maintenant son effet antiviral. Deux structures chimiques de l'oseltamivir sous forme carboxylate et de sa prodrogue sont présentées dans la **figure 1.17 c,d**.

Comme le zanamivir, l'oseltamivir possède une activité inhibitrice *in vitro* vis-à-vis de plusieurs souches virales de type A et B, avec une constante d'inhibition (K_i) de moins de 1 nM (116). Le traitement par voie orale chez les souris (10 mg/kg/jour) et les furets (25 mg/kg/jour) infectés par les virus grippaux de type A et B a montré l'effet de protection du GS4104 (183). La dose de 1 et 10 mg/kg/jour de l'oseltamivir protège les souris contre des souches grippales aviaires (H5N1 et H9N2) (156). Un délai de traitement plus long est

nécessaire pour les souris infectées par le virus hautement pathogène A/Vietnam/1203/04 (H5N1) (316).

L'efficacité de l'oseltamivir chez l'homme est analysée lors de plusieurs études cliniques (revue (60)). En général, l'oseltamivir est indiqué dans le traitement des virus influenza de type A et B chez les patients à partir d'un an lorsque l'apparition des symptômes est de moins de 48 heures pour son efficacité. La dose recommandée pour le traitement est deux fois 75 mg par jour pendant 5 jours. Après administration par voie orale, l'oseltamivir est bien absorbé par le tractus gastro-intestinal, converti en son métabolite actif dans le foie, et distribué dans tout le corps. Les nausées et vomissements sont les effets secondaires les plus fréquents.

1.2.3.3. Les virus résistants aux inhibiteurs de la neuraminidase

L'émergence des virus résistants à l'INA est moins développée que celle à l'adamantane. Ces résistances sont identifiées par comparaison du changement de l'activité enzymatique et le profil génétique de la neuraminidase à partir d'un prélèvement en prétraitement et en post traitement. Les résistances dépendent du type de la mutation, un virus résistant à l'oseltamivir peut encore être sensible au zanamivir.

Au cours des années de l'utilisation d'oseltamivir dans le programme clinique, l'apparition des virus résistants a été observée chez les patients traités : 0,33 % chez les adultes, 4 % chez les enfants, donc 1,26 % en général (297). En cas de traitement suboptimal, le pourcentage d'émergence de virus résistant peut atteindre 18 %, comme l'a montré une étude réalisée avec des enfants japonais traités par l'oseltamivir contre le virus influenza de sous-type A/H3N2 (142). En outre, les mutations apparaissent principalement chez les virus influenza de type A et dépendent du sous-type. Il s'agit des mutations R292K (arginine → lysine), E119V (acide glutamique → valine) et N294S (asparagine → sérine) chez le sous-type N2. Pour le sous-type N1, c'est la substitution de l'histidine par une tyrosine en position 275 (H275Y), ou H274Y pour une numérotation N2. La mutation D198N (acide aspartique → asparagine) réduit la sensibilité du virus B à l'oseltamivir (103). Deux premiers cas de résistance à l'oseltamivir (H275Y) du virus de la grippe aviaire A/H5N1 ont été rapportés en 2005 (52). De plus, un an après l'émergence du virus responsable de la pandémie grippale 2009, plus de 200 cas de virus A (H1N1) 2009 porteur d'une mutation de résistance H275Y ont été isolés (303). L'émergence de mutations de résistance à l'issue d'un traitement avec le

zanamivir est moins observée. Seulement deux types de mutation ont été isolées de patients immunodéprimés suite à un traitement au zanamivir, les mutations R152K (chez le virus B) et Q136K (chez le virus A/H1N1) ont été isolées (101, 125).

Un programme de surveillance de la sensibilité aux inhibiteurs de la neuraminidase (The global Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Network – NISN) a été conduit depuis 1999, concernant l'émergence potentielle des résistances aux INA au fil du temps (320). Aucune mutation naturelle à l'oseltamivir n'a pas été observée dans la période avant son introduction en public (de 1996 à 1999) (180). Jusqu'en 2007, la diminution de la sensibilité des virus à l'oseltamivir était encore inférieure à 1 % (189, 246). Cependant, l'apparition des virus résistants a augmenté remarquablement dès l'année 2007. Dans la saison 2007 – 2008, environ 10 % de virus circulant aux Etats-Unis sont résistants (246), majoritairement de sous-type A (H1N1) et porteur de la mutation de résistance H275Y, de 0 % à 68 % selon les pays européens (181). Une augmentation des virus A (H1N1) résistants à l'oseltamivir a été également observée (64 % en général) en Océanie, Asie du Sud-est et Afrique (124).

1.2.3.4. Les nouveaux candidats potentiels des inhibiteurs de la neuraminidase

1.2.3.4.1 Forme dimère du zanamivir

Un composé dimérique du zanamivir, formé par un pontage entre deux molécules de zanamivir via leurs groupes hydroxyle en position 7, est en cours de développement et correspond à la deuxième génération du zanamivir. Il est capable d'inhiber la réplication des virus grippaux de type A et B *in vitro*, son activité inhibitrice est 100 fois plus élevée que celle du zanamivir (171). De plus, la faible clairance de la molécule et la persistance au niveau des poumons des souris et des rats induisent un effet antiviral protecteur de longue durée. Cela suggère la possibilité d'utiliser qu'une seule dose par semaine pour un traitement prophylactique des infections grippales.

1.2.3.4.2 Peramivir (RWJ-270201)

Parmi les nouveaux dérivés de l'INA, le peramivir est un antiviral potentiel développé par la société BioCryst Pharmaceuticals. La structure du peramivir est caractérisée par un cyclopentane avec un groupement hydrophobe en position 6 et un groupement guanidinium en

position 4 (6) (**figure 1.17f**). Il a été démontré que le peramivir est efficace vis-à-vis de plusieurs virus influenza de type A et B, ainsi que les virus influenza aviaires *in vitro* et *in vivo* (98, 254, 271). Son efficacité est comparable à celle du zanamivir et de l'oseltamivir. L'administration du peramivir à 10 mg/kg/jour par voie orale protège les souris totalement contre les virus hautement pathogènes H5N1 et H9N2. La dose de 5 à 100 mg/kg/jour de peramivir est efficace chez les furets infectés. Les premiers essais cliniques utilisant le peramivir contre les virus grippaux humains par voie orale ont montré son effet dans le traitement mais pas dans la prophylaxie (10). L'administration du peramivir par voie intraveineuse ou intramusculaire est en train d'être développée dans le but d'améliorer sa biodisponibilité (8, 317).

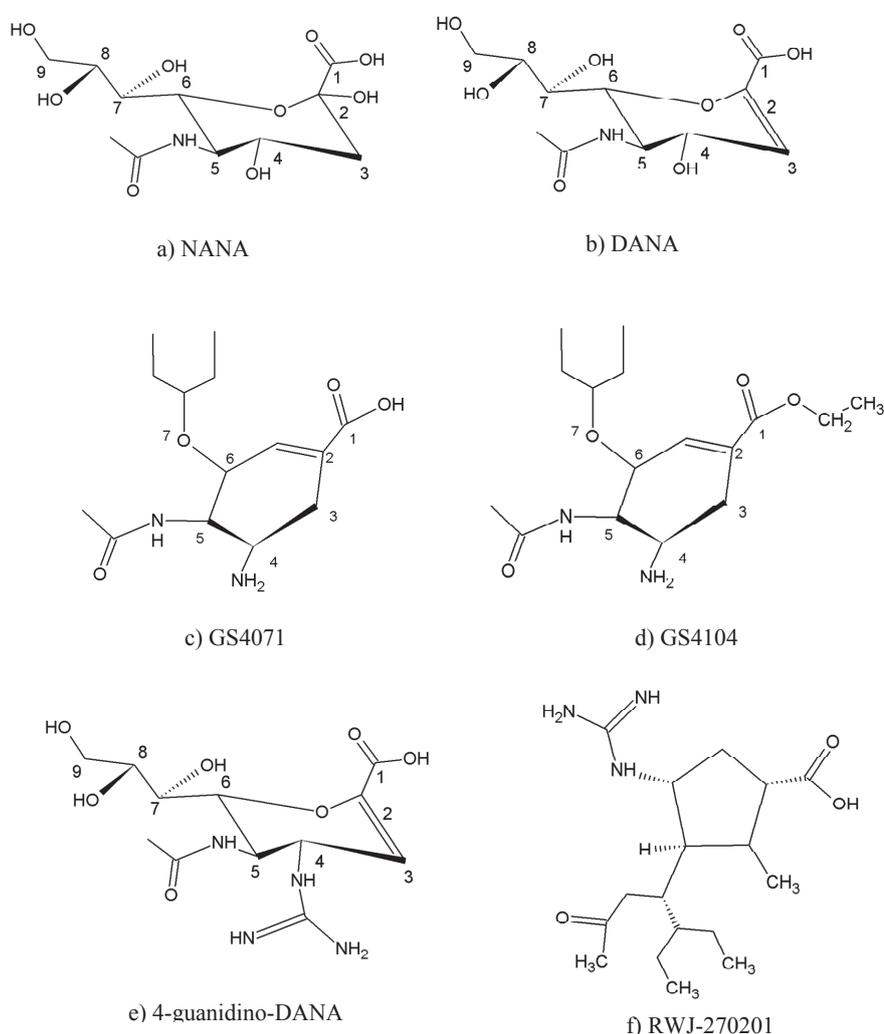


Figure 1.17 : Structure chimique de **a)** NANA (acide N-acétylneuraminique) ; **b)** DANA (acide 2-désoxy-2,3-didéhydro-N-acétylneuraminique) ; **c)** GS4071 (carboxylate d'oseltamivir) ; **d)** GS4104 (le dérivé phosphate d'oseltamivir) ; **e)** 4-guanidino-DANA (zanamivir) ; **f)** RWJ-270201 (peramivir)

I.2.3.4.3 Laninamivir

Le laninamivir (R-125489) est un nouvel inhibiteur efficace contre plusieurs sous-types A (N1 à N9) et le type B, y compris les virus résistants à l'oseltamivir que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (314). Particulièrement, la forme estérifiée, le CS-8958, l'octanonate de laninamivir, présente une longue inhibition pour une seule dose. L'administration par voie intranasale chez les souris d'une seule dose, montre une activité plus efficace du CS-8958 que celle du zanamivir et oseltamivir en plusieurs doses (148). Le CS-8958 est converti en sa forme active R-125489 dans le poumon où il peut perdurer pour long temps avec une demi-vie de 41,4 heures (147). Il est également efficace contre le virus H5N1 (143). Une dose de 20 à 40 mg par inhalation est non toxique et efficace pour réduire le temps de maladie chez les enfants infectés aux virus H1N1 résistants à l'oseltamivir (267).

De façon générale, il est suggéré que le CS-8958 fonctionne comme un inhibiteur de longue durée d'action. Des études complémentaires sont en train d'être réalisées pour confirmer les effets cliniques de cet inhibiteur.

I.3. DIVERSITE ET FONCTIONS DES GLUCIDES

Vu que notre travail s'appuie principalement sur les oligo/polysaccharides, cette partie bibliographique permettra d'avoir une vue générale sur les points qui définissent la diversité structurale et biologique de ces molécules.

Les oligo/polysaccharides sont des biomolécules appartenant à la famille des glucides, historiquement appelés hydrates de carbone ou « sucres » en terme familier. Les glucides représentent le groupe chimique le plus abondant et important des êtres vivants. Ces biomolécules sont composées d'unités monosaccharidiques, celles qui sont, donc, les constituants de base pour former un grand nombre de structures variables. Elles ont les caractéristiques suivantes : 1) l'existence d'au moins un centre asymétrique, 2) la capacité de présence soit en structure linéaire ou cyclique, 3) la capacité de former des structures polymériques par des liaisons glycosidiques, et 4) le potentiel de se lier avec de multiples molécules non glucidiques. La complexité de la structure des glucides augmentera excessivement en fonction du nombre de résidus monosaccharidiques. Un oligosaccharide est formé de 2 à 20 monosaccharides parmi lesquels se trouvent les disaccharides présents dans

notre nourriture tels que les saccharoses, les lactoses, les maltoses. Le terme « polysaccharide » concerne les polymères contenant de nombreuses unités monosaccharidiques caractérisés par des chaînes linéaires ou ramifiées.

Les glucides présentent deux rôles biologiques majeurs communs au règne animal et végétal : ils permettent le stockage énergétique (l'amidon, le glycogène), et participent à la structure de parois cellulaires (la cellulose, la chitine). D'autre part, ces sucres (surtout les oligosaccharides) en combinaison de manière covalente avec une protéine ou un lipide, forment une classe importante des glycoconjugués (glycoprotéines ou glycolipides). On a découvert que ces derniers interviennent dans de nombreuses fonctions biologiques importantes telles que la reconnaissance moléculaire et cellulaire, l'adhésion, la réponse immunitaire... Tous ces processus constituent potentiellement des approches thérapeutiques. En effet, plusieurs pathogènes, comme les virus influenza, se servent de ces glycoconjugués situées sur les membranes cellulaires comme une voie pour s'attacher et entrer dans la cellule hôte. L'observation de l'interaction glycoconjugué/virus a donné lieu au développement d'une stratégie antivirale basée sur le développement d'analogues naturels ou synthétiques des glycoconjugués, afin de bloquer l'étape précoce du cycle infectieux viral (70, 245).

I.3.1. La diversification des monosaccharides et oligosaccharides (87, 288)

La structure fondamentale commune des monosaccharides (des oses) se caractérise par une chaîne de carbone porteuse de groupes hydroxyles et de fonctions aldéhydes ou cétoniques, dont la formule de base est $(C \cdot H_2O)_n$ où $n \geq 3$.

Les monosaccharides sont classés d'une part en fonction du nombre de carbone de la molécule ; d'autre part sur la nature chimique de deux fonctions du carbonyle, les aldoses avec un groupe aldéhyde ($-CH=O$) sur le premier carbone, les cétooses avec un groupe cétone ($-C=O$) sur le deuxième carbone. La classification des monosaccharides est présentée dans le tableau ci-dessous.

| Nombre de carbones | Catégorie de nom | Représentants | |
|--------------------|------------------|----------------|------------------|
| | | aldose | cétoose |
| 3 | triose | glycéraldéhyde | dihydroxyacétone |

| | | | |
|---|---------|---|--|
| 4 | térose | érythrose, thréose | érythrulose |
| 5 | pentose | arabinose, lyxose, ribose, xylose | ribulose, xylulose |
| 6 | hexose | galactose, glucose, mannose, allose, altrose, idose, talose | fructose, psicose, sorbose, tagatose |
| 7 | heptose | mannoheptose, glucoheptose | mannoheptulose, alloheptulose, altroheptulose |

Les monosaccharides sont également classés selon leur configuration moléculaire au carbone chiral, l'isomère optique. Tous les monosaccharides possèdent au moins un carbone asymétrique, à l'exception du dihydroxyacétone (**figure 1.18**). Lorsqu'une molécule a plusieurs centres de chiralité, plusieurs configurations seront obtenues. En effet, avec n atomes de carbones, on aura $n-2$ atomes de carbone chiral pour les aldoses et $n-3$ pour les cétooses, donc 2^{n-2} ou 2^{n-3} composés isomériques peuvent être générés.

Par convention de la projection de Fischer, une configuration est définie comme L (Lévogyre) lorsque le groupe OH du carbone asymétrique (dont le numéro d'ordre est le plus grand) est placé à gauche, en revanche si ce groupe est placé à droite nous avons une configuration D (Dextrogyre). Les monosaccharides naturels appartiennent principalement à la configuration D. Deux molécules qui ne diffèrent que par la configuration d'un seul carbone sont définies comme des épimères. Le D-glucose et le D-mannose sont des épimères concernant leur carbone 2, tandis que le D-mannose et le D-galactose sont des épimères via leur carbone 4.

Toutes les classifications peuvent être combinées pour des noms comme D-aldohéxose ou D-cétotriose (**figure 1.19**).

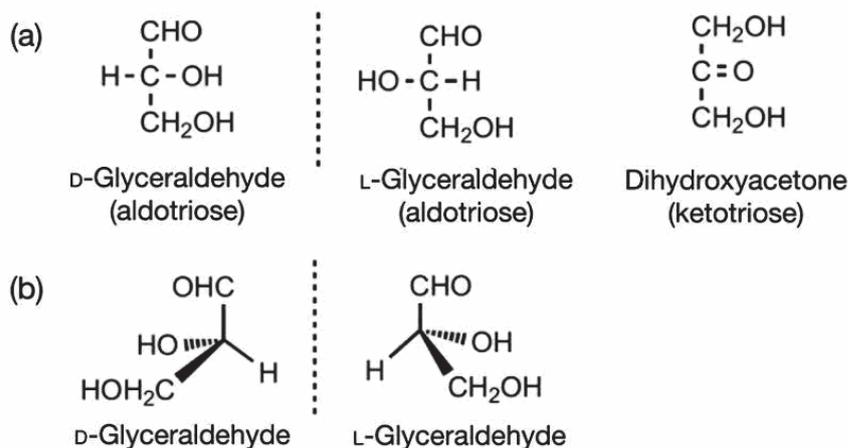


Figure 1.18 : **a)** Structures du glycéraldéhyde et du dihydroacétone dans la projection de Fisher ; **b)** D- et L-glycéraldéhyde. Source : Varki et al., 2009, *Essentials of Glycobiology* (2nd edition), chapter 2

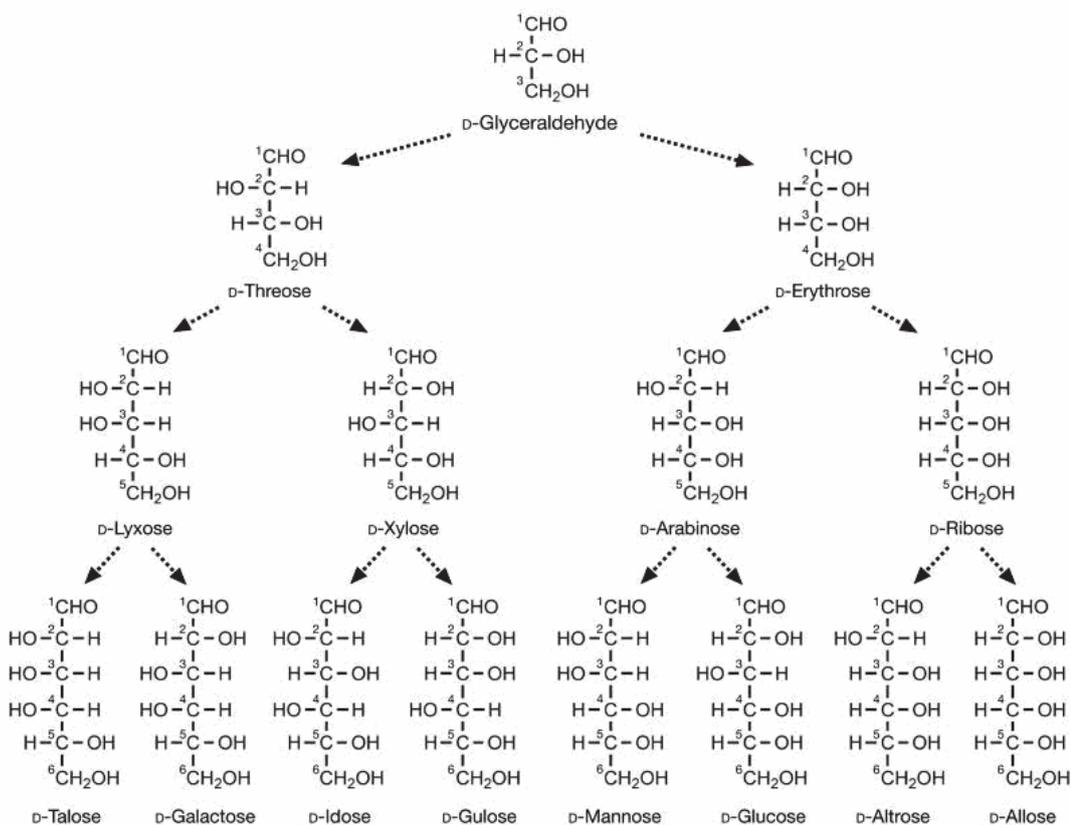


Figure 1.19 : Représentation structurale des D-aldoses. Source : Varki et al., 2009, *Essentials of Glycobiology* (2nd edition), chapter 2

En solution, les monosaccharides existent sous deux formes équilibrées, les acycliques et cycliques. La cyclisation se fait par la réaction héli-acétale (aldose) ou hémicétal (cétose) entre un alcool et le groupe carbonyle dans la même molécule. Les cycles les plus répandus dans la nature contiennent 5 atomes (furanoses) et 6 atomes (pyranoses).

La cyclisation donne à un nouveau centre chiral dans la molécule au niveau du carbone 1, entraînant deux nouvelles configurations de type α ou β , appelées des anomères (**figure 1.20**).

En général, les cétohexoses forment un cycle furanosique via le type C₂-O-C₅ et le C₂ devient asymétrique. Pour les aldohexoses, un cycle furanosique est formé via le type C₁-O-C₄, tandis qu'un cycle pyranosique est formé via le type C₁-O-C₅. Dans ce cas, le carbone 1 devient asymétrique.

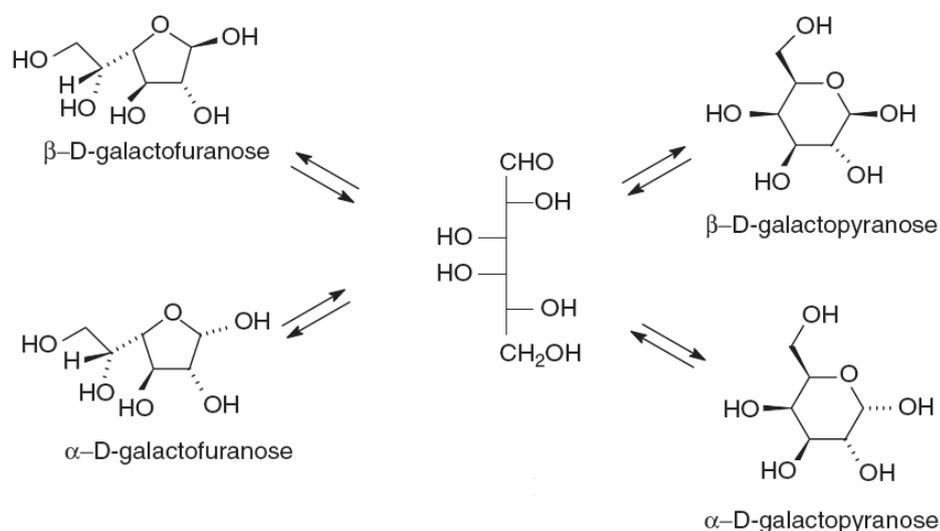


Figure 1.20 : Cyclisation schématique du D-galactose avec deux configurations d'anomère α et d'anomère β . Source : Michael L. Sinnott, 2007, *Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, chapter 1

Cependant, le nombre de conformations du cycle des monosaccharides s'accroît sous forme tridimensionnelle. Par exemple, un cycle pyranosique peut adopter 2 formes, celle de chaise (plus stable) et celle de bateau. Dans la forme chaise, deux conformations se distinguent par deux positions du carbone, 4C_1 et 1C_4 (**figure 1.21**).

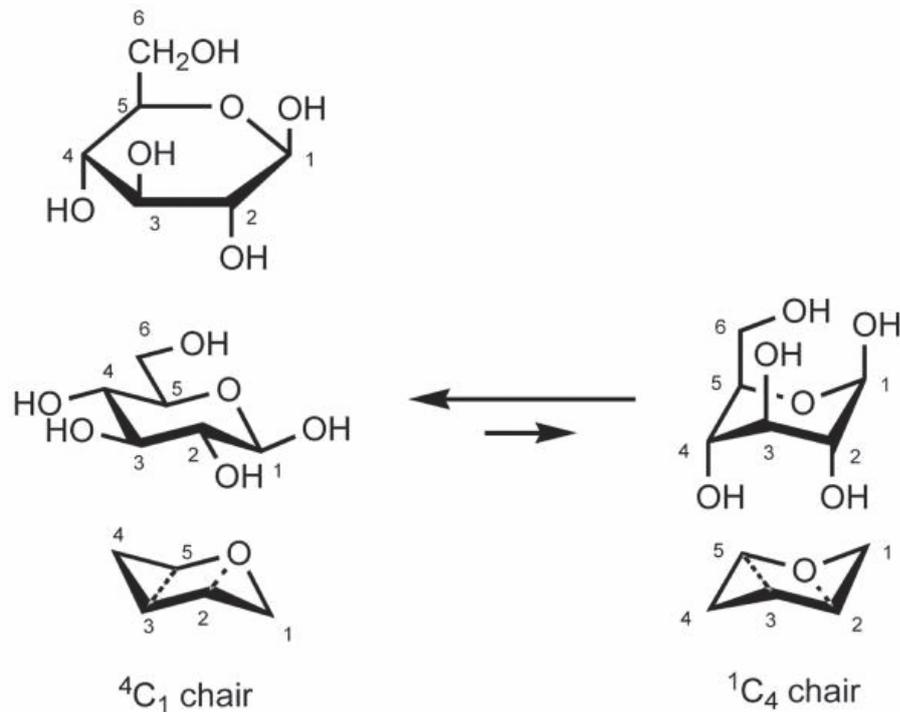


Figure 1.21 : Les conformations chaises du β -D-glucose. Source : Varki et al., 2009, *Essentials of Glycobiology (2nd edition), chapter 2*

Deux monosaccharides sont liés fondamentalement par la liaison glycosidique. En théorie, ce type de liaison peut être formé entre un carbone anomérique (en conformation α ou β) d'un monosaccharide et un groupe hydroxyle d'un deuxième monosaccharide, ou avec un autre composé hydroxyle (éthanol, sérine, thréonine, tyrosine...). De plus, la liaison glycosidique est très flexible, générant de multiples conformations qui ont de différentes orientations relatives entre deux monosaccharides. Par la formation de liaisons glycosidiques, un grand nombre d'oligo/polysaccharides de différentes structures primaires sont générés.

Il existe aussi des dérivés de sucres produits par de nombreuses réactions chimiques et enzymatiques :

- La réduction du groupe carbonyle pour se transformer en alcool (sorbitol, mannitol)
- Les dérivés déoxy (2-désoxy-D-ribose) : le groupe OH d'un alcool est remplacé par un H

- Les acides uroniques : une fonction acide ($-\text{COOH}$) remplace l'alcool primaire ($-\text{CH}_2\text{OH}$) (acide D-glucuronique, D-mannuronique, D-guluronique, D-galacturonique)
- Les dérivés aminés (D-glucosamine, D-galactosamine, N-acétylgalactosamine) : une fonction amine $-\text{NH}_2$ remplace l'un des groupes OH
- Les dérivés d'esters : les alcools primaires ($-\text{CH}_2\text{OH}$) sont estérifiés (glucose-1-phosphate, glucose-6-phosphate)
- Les dérivés de la famille des acides sialiques (acide N-acétylneuraminique) formé à partir d'un cétose complexe à 9 carbones

Les disaccharides sont les plus simples des oligosaccharides formés par deux monosaccharides via la liaison glycosidique. Les sucroses (saccharoses), maltoses, lactoses sont les disaccharides les plus répandus dans la nature (**figure 1.22**).

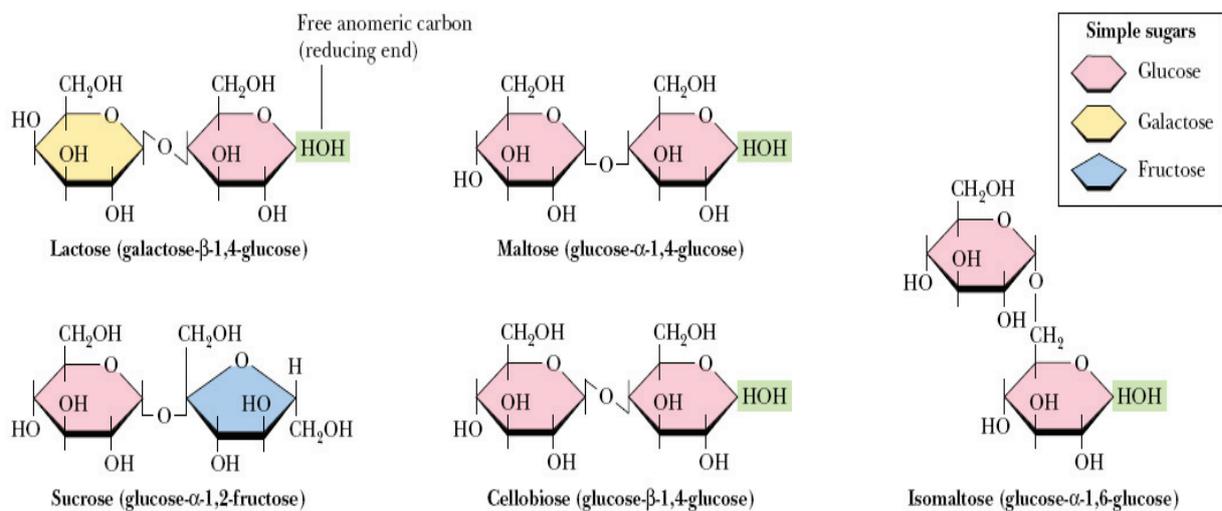


Figure 1.22 : Structures des disaccharides importants. Les conformations de type α ou β peuvent être obtenues (notées par -HOH). Le sucrose est classifié comme un sucre non réducteur puisqu'il ne contient aucun carbone anomérique libre.

Source : Garrett and Grisham, 2008, Biochemistry (87)

I.3.2. La structure diversifiée des polysaccharides

Les polysaccharides sont des polymères de 20 à plusieurs milliers de résidus monosaccharidiques. Ils peuvent comporter différentes séquences d'unités monosaccharidiques, différentes séquences de la liaison glycosidique et différents types de branches. Cela donne un haut degré de diversité pour les polysaccharides, avec subséquemment une grande diversité de relations entre la structure et la fonction.

Le terme de degré de polymérisation (DP) correspond au nombre de résidus monosaccharidiques constituant un polysaccharide.

D'un point de vue chimique, les polysaccharides peuvent être divisés en fonction de leur composition en monomères, les homopolysaccharides et les hétéropolysaccharides

- Les homopolysaccharides (polyholosides) sont constitués d'un seul type de monosaccharide
 - Les glucanes (ou dextrans) : polymères de D-glucose
 - Les galactanes : polymères de D-galactose
 - Les xylanes : polymères de D-xylose
 - Les chitosanes : polymères de D-glucosamine

Les homopolysaccharides peuvent être linéaires ou ramifiés. Par exemple, dans la classe de glucane :

- La structure linéaire se trouve chez les amyloses (enchaînement de α -(1,4)), et les celluloses (enchaînement de β -(1,4))
 - La structure ramifiée se trouve chez les amylopectines (enchaînement de α -(1,4)) et les glycogènes (enchaînement de α -(1,4))
- Les hétéropolysaccharides (hétérosides) comportent au moins deux types de monosaccharides différents, dont les séquences d'unité sont répétitives, variables dans leur taille. Ainsi, les autres groupes peuvent être présents (les groupes sulfate, phosphate, amino, acétyle). Cinq types de structure des hétéropolysaccharides sont présentés dans la **figure 1.23**.
 - Les araboxylyanes : polymères d'arabinose et de xylose

- Les galactomannanes : polymères de galactose et de mannose

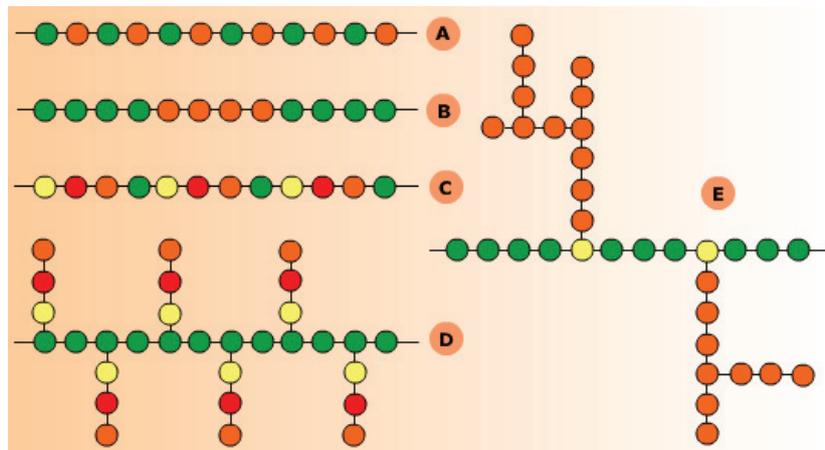


Figure 1.23 : Schémas structuraux des hétéropolysaccharides. **A)** Structure alternée **B)** Structure en blocs **C)** Structure linéaire complexe **D)** Structure ramifiée **E)** Structure interrompue ramifiée. Chaque couleur représente un résidu monosaccharidique.

(Disponible sur : www.uel.education.fr/consultation/referance/biologie/biochimie1/apprendre/chapitre3/chapitre3A/ap3a1.htm)

L'activité biologique permet la classification des polysaccharides :

- Les polysaccharides de réserve, fournisseur d'une source d'énergie pour les êtres vivants, tels que l'amidon chez les végétaux et le glycogène chez les animaux.
- Les polysaccharides de structure participant à l'architecture des structures organiques comme la paroi végétale (pectine), algale (carraghénane), bactérienne (peptidoglycane).

Par ailleurs, comme les autres macromolécules, les polysaccharides sont également définis en fonction des niveaux de structure : structure primaire, structure secondaire, structure tertiaire...

I.3.3. Les glycanes de glycoconjugués et l'infection des pathogènes

I.3.3.1. Les glycoconjugués (288)

Le terme « glycoconjugué » désigne une macromolécule contenant une partie glucidique, appelée glycane ou glycone, liée de manière covalente à une partie non glucidique (l'aglycone). Différents types de glycoconjugués peuvent être définis tels que les glycoprotéines, les glycolipides, et les protéoglycanes.

I.3.3.1.1. Les glycoprotéines

Les glycoprotéines sont composées de plusieurs glycanes liés de façon covalente à un squelette polypeptidique. Les chaînes glucidiques, formées par la succession de glycanes, sont dites liées en N ou en O selon leur site d'ancrage :

- La liaison N-glycosidique se forme entre un résidu de N-acétylglucosamine (GlcNAc) et l'azote du groupement amide de l'asparagine (Asn). La N-glycosylation est spécifique pour le motif Asn-X-Ser/Thr (X est soit une proline soit acide aspartique).
- La liaison O-glycosidique se forme entre un groupe hydroxyle d'un acide aminé (sérine, thréonine, tyrosine) et un résidu de N-acétylgalactosamine (GalNAc), ou moins courant comme le galactose (Gal), le mannose, ou le xylose.

Les structures liées en N ou en O sont très différentes. Les chaînes liées en N partagent une structure de base pentasaccharidique, constituée de deux GlcNAc et de trois mannoses, sur laquelle vient se greffer d'autres glucides. L'arborisation glucidique qui en résulte définit trois familles : le type d'oligomannose, le type complexe, et le type hybride (**figure 1.24**).

Les chaînes liées en O, sont plus courtes et plus variables que celles en N. A partir d'un motif commun Gal β (1,3)GalNAc, on peut obtenir une grande diversité de structure comme observée pour les mucines (**figure 1.25**), qui se trouvent dans le mucus excrété et la surface cellulaire (276).

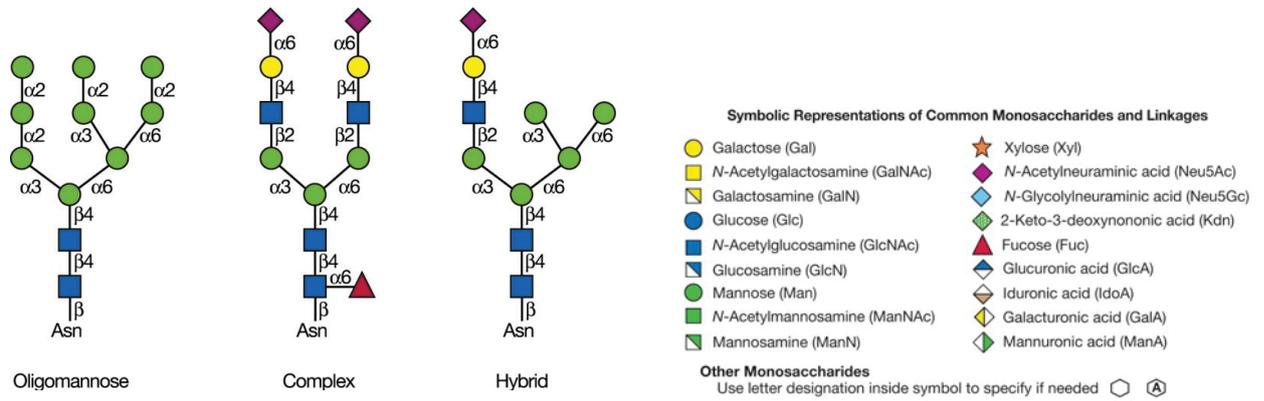


Figure 1.24 : Trois classes des types de N-glycanes. Chacune comporte une séquence de type $Man_3GlcNAc_2Asn$ en commun.

Source : Varki et al., 2009, *Essentials of Glycobiology* (2nd edition), chapter 8

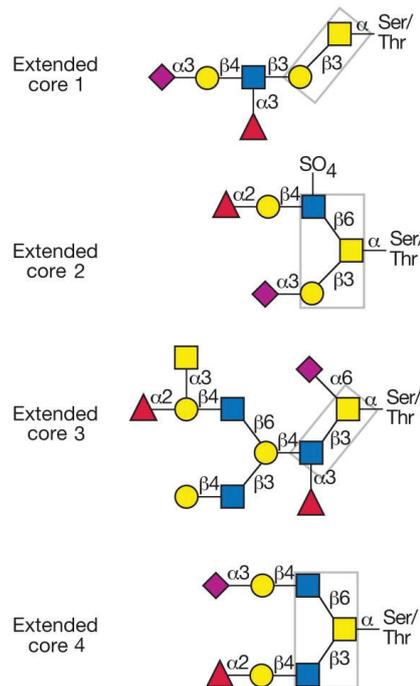


Figure 1.25 : Les structures de type O-GalNAc, dont celles des mucines du système respiratoire (les structures 1, 2, 4) et celles des mucines du système colique (la structure 3).

Source : Varki et al., 2009, *Essentials of Glycobiology* (2nd edition), chapter 9

1.3.3.1.2. Les protéoglycanes

Les protéoglycanes sont un groupe de glycoconjugué comportant un ou plusieurs enchaînements de glycoaminoglycanes (GAG). Ces derniers sont des polysaccharides linéaires composés d'unités disaccharidiques répétitives. Ce motif comporte un hexosamine (GlcNAc ou GalNAc) et un acide uronique (acide glucuronique (GlcA) ou iduronique (IdoA)) ou un galactose. La liaison entre la chaîne de GAG et le polypeptide se forme via un motif de trisaccharide (-Gal-Gal-Xyl-) avec un groupe hydroxyl de la sérine. En plus des chaînes GAG, les protéoglycanes peuvent présenter des glycanes de type O- ou N-glycanes. Les GAG constitutifs des protéoglycanes sont classés selon la structure du motif répétitif et portent souvent des noms qui rappellent leur origine tissulaire :

- Les héparanes sulfates (HS) et les héparines : $\text{GlcA}\beta(1,4)\text{GlcNAc}\alpha(1,4)$
- Les chondroïtines sulfates (CS) : $\text{GlcA}\beta(1,3)\text{GalNAc}\beta(1,4)$
- Les dermatanes sulfates (DS) : $\text{IdoA}\beta(1,3)\text{GalNAc}\beta(1,4)$
- Les kératanes sulfates (KS) : $\text{Gal}\beta(1,4)\text{GalNAc}\beta(1,3)$
- Les hyaluronan : $\text{GlcA}\beta(1,3)\text{GlcNAc}\beta(1,4)$

Les protéoglycanes se trouvent plus largement soit à la surface des cellules soit dans les matrices extracellulaires en particulier ceux des tissus conjonctifs (**figure 1.26**).

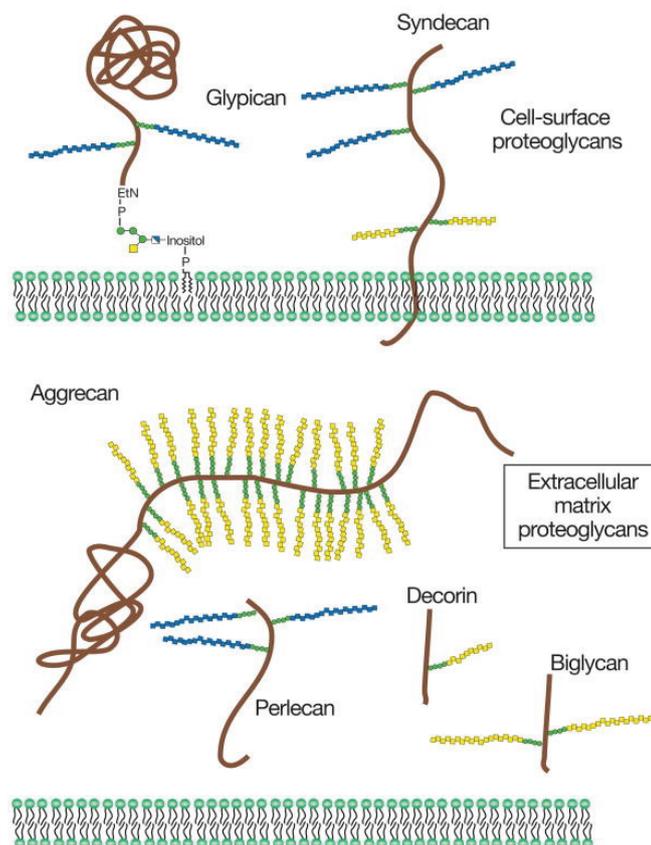


Figure 1.26 : Les structures de différentes classes de protéoglycanes (le noyau protéique est en brun, les chaînes de GAG sont en bleu, le CS/DS est en jaune)

Source : Varki et al., 2009, *Essentials of Glycobiology* (2nd edition), chapter 16

1.3.3.1.3. Les glycolipides

Les glycolipides sont des glycoconjugués composés d'une partie glucidique liée à une partie hydrophobe. Les glycosphingolipides (GSL), les glycolipides contenant des sphingosines, se répartissent plus largement chez les animaux. De nombreuses structures de GSL dépendent de différentes caractéristiques tels que la composition/la taille de glycanes, l'état de saturation et le degré d'hydrolysatation des chaînes d'acides gras. Les GSL peuvent être divisées en trois groupes, en fonction de leur charge : le groupe neutre, le groupe acide, et le groupe basique. En outre, les GSL sont également regroupés en fonction de la structure centrale (lacto-, gala/neolacto-, ganglio-, globo-series) (**figure 1.27**). Les gangliosides sont des glycolipides acides portant les chaînes oligosaccharidiques terminées par des résidus d'acides sialiques.

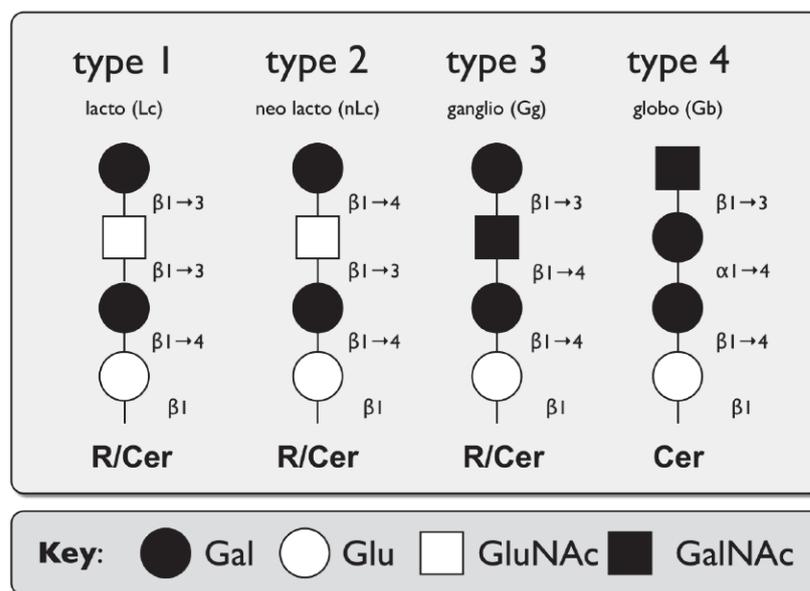


Figure 1.27 : Les structures centrales différentes des glycosphingolipides (Cer : céramide, R : résidu). Source : Stefan Taube, 2010, *Viruses* (274)

Les glycanes de glycoconjugué jouent plusieurs rôles importants dans le système biologique, dont deux catégories majoritaires peuvent être soulignés (82). La première se base sur leurs propriétés de structure et de modulation. La deuxième est impliquée dans la reconnaissance moléculaire, dont la self-reconnaissance des glycanes d'un même organisme ou la reconnaissance des glycanes de différents organismes.

1.3.3.2. Rôle des glycoconjugués dans la pathologie microbienne

Les glycoconjugués sont des constituants d'une couche de glycocalyx, appelée « manteau sucré », à la face externe des cellules eucaryotes (**figure 1.28**). Cette couche est la première barrière de la cellule hôte que les pathogènes doivent passer. L'interaction entre les protéines de surface des pathogènes (lectines, toxines, adhésines) et les glycanes de glycoconjugué est reconnue comme une première étape importante pour démarrer le processus d'infection. Parmi les nombreux glycoconjugués de surface, les glycoprotéines et les glycolipides en particuliers ceux qui portent des acides sialiques en position terminale, et les protéoglycans sont fréquemment reconnus par plusieurs pathogènes (126, 205). Ces structures sont ainsi exploitées dans de multiples stratégies d'infection par des pathogènes (12).

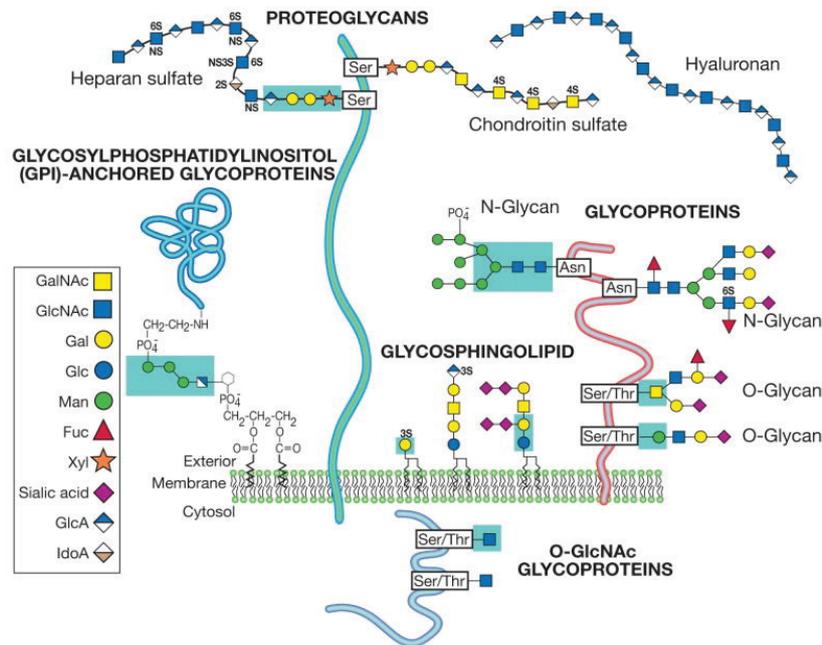


Figure 1.28 : Différentes classes de glycanes des glycoconjugués membranaires

Source : Varki et al., 2009, *Essentials of Glycobiology* (2nd edition), chapter 1

I.3.3.2.1. Rôles des protéoglycane dans l'étape d'entrée et dans la pathogénéicité des pathogènes

Implication des protéoglycane dans l'attachement virale et l'internalisation

Les protéoglycane de la surface membranaire, en particulier ceux qui portent des structures d'héparane sulfate (HSPG) sont reconnus par plusieurs familles de virus comme une voie pour le démarrage de l'infection. Les structures de GAG dans cette interaction peuvent être utilisées en tant que facteur d'attachement pour faciliter l'interaction entre le virus et le récepteur spécifique. Ce type d'interaction a été observé pour le virus herpès simplex de type 1 et 2 (HSV-1,2). Il a été démontré que deux glycoprotéines de surface, gB et gC, du virus HSV sont capables de reconnaître les structures HSPG de surface cellulaire (152). Cette interaction facilite un second attachement dans lequel la protéine gD du virus se lie à un récepteur cellulaire (le facteur de nécrose TNF, les membres de la superfamille des immunoglobulines) pour l'internalisation (259). De manière intéressante, la protéine gD peut interagir avec un site modifié de l'héparane sulfate, connu sous forme de 3-O-sulfate, comme un récepteur pour entrer dans la cellule. Une région riche en lysine de la protéine gB (HSV-1) semble nécessaire pour la liaison de cette dernière sur l'héparane sulfate ou l'héparine (152). Des études avec l'héparane sulfate et l'héparine par dépolymérisation et désulfatation montrent que l'interaction avec la protéine gC dépend de la position des groupes sulfates avec une meilleure interaction pour le motif de disaccharide-sulfate en position 2-O- et 6-O- (73).

Dans le cas des virus de l'immunodéficience humaine (HIV), des études ont démontré que ces virus peuvent utiliser les HSPG comme facteur d'attachement, le CD4 comme récepteur, le CXCR4 et CCR5 comme corécepteurs (21, 188). Le facteur d'attachement HSPG du virus HIV peut être de type syndécane (242). Il a été démontré que le domaine V3 chargé positivement situé sur la protéine gp120, protéine de surface du virus, sert d'intermédiaire pour l'interaction entre cette protéine et l'héparane sulfate (230). La glycoprotéine gp120 est également responsable de l'attachement au récepteur et co-récepteur.

Plusieurs bactéries tels que *Listeria monocytogenes*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Borrelia burgdorferi* ou même les parasites incluant les *Plasmodium spp.* et *Leishmania spp.* exploitent également les HSPG afin d'augmenter la capacité d'attachement et d'internalisation dans la cellule hôte (revue (12)).

Implication des protéoglycanes dans l'internalisation du facteur de virulence

La protéine Tat (86-102 acides aminés) du virus HIV est un facteur de transcription qui est excrétée par les cellules infectées. Elle permet d'augmenter l'efficacité de transcription de l'ADN du virus HIV. Les Tat circulants peuvent être absorbés et internalisés dans les cellules non infectées. Elles agissent comme une toxine en induisant la mort cellulaire, la neurotoxicité, la suppression immunitaire, le développement de SIDA-Kaposi's sarcoma...(199) La protéine Tat présente une capacité à se lier aux HSPG et héparines via un domaine commun composé de multiples résidus basiques (38). Ces interactions permettent le stockage de la protéine Tat et sa mobilisation dans les matrices extracellulaires. Il a été démontré que les HSPG sont des récepteurs cellulaires nécessaires pour l'internalisation de cette protéine (281). L'étude d'interaction au niveau moléculaire entre Tat/héparine indique que le degré et la distribution des groupes sulfates de l'héparine ont une influence importante sur l'interaction Tat/héparine (236). Une forte affinité de Tat/héparine a besoin de sites sulfatés en positions telles que 2-O, 6-O, et N-. Il apparaît que ces groupes sulfatés se lient sur les résidus chargés positivement dans le domaine basique de la protéine Tat. De plus, cette interaction est également affectée par la taille de l'héparine, dont une chaîne constituée d'au moins six résidus saccharidiques (237). Ces données démontrent que les caractères structurels et la force électrostatique permet d'établir une interaction optimale entre Tat/héparine, soulignant le liant des protéoglycanes avec les facteurs de virulence des pathogènes.

Implication des protéoglycanes dans la dissémination des pathogènes

Les cellules dendritiques (CD) apparaissent comme une des premières cibles du virus HIV, et ainsi comme un intermédiaire pour la transmission de l'infection aux lymphocytes T CD4. Il a été démontré que le récepteur de type C-lectine, appelé DC-SIGN, joue un rôle important dans la transmission du virus HIV. Cependant, l'impact d'une famille de HSPG à la surface des cellules CD, le syndécane-3, a été mis en évidence dans cette transmission (54). Ces glycanes fonctionnent comme un récepteur d'attachement du virus HIV, permettant de stabiliser le virus capturé, facilitant l'infection du virus aux CD et entraînant sa transmission aux cellules T. En outre, la dissémination du virus HIV peut résulter d'une interaction entre la protéine Tat et les HSPG. En effet, la protéine Tat, sous forme de dimer, interagit à la fois avec les HSPG à la surface des épithéliums et des lymphoïdes, induisant la formation d'un complexe HSPG/Tat-Tat/HSPG (284). La formation de ce complexe facilite l'adhésion des

lymphoïdes aux cellules épithéliales et entraîne l'événement d'extravasation durant la période d'infection du virus HIV.

Implication des protéoglycanes dans l'échappement des pathogènes de la défense de l'hôte

Les peptides antimicrobiens (AMP) tels que les défensines et les cathelicidines sont de petites protéines chargées positivement (150). Ces peptides sont impliqués dans la défense contre plusieurs pathogènes comme les bactéries à gram positif et gram négatif, les champignons, les protozoaires, et certains virus (HSV, vaccinavirus...). Le mécanisme d'action des AMP s'appuie principalement sur leur capacité à déstabiliser la structure membranaire des pathogènes, entraînant une fuite du contenant cellulaire. En général, les AMP cationiques sont attirés par la charge négative des polysaccharides situés sur la surface membranaire des pathogènes. Cependant, afin d'obtenir un pouvoir de résistance à l'attaque des AMP, les pathogènes développent eux même plusieurs mécanismes. De façon intéressante, certains pathogènes dégradent les protéoglycanes cellulaires par leur protéase excrétée. Cette action permet la libération de fragments GAG de charge négative qui ensuite aident à neutraliser l'effet des AMP. Ce mécanisme est identifié chez les pathogènes bactériens comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, et *Streptococcus pyogenes* (210, 243).

1.3.3.2.2. Implication des sialyloligosaccharides dans la spécificité de récepteur, le spectre d'hôte et le tropisme du pathogène

Les acides sialiques (SA) constituent une famille de monosaccharides de 9 carbones dérivés de l'acide neuraminique, dont les acides N-acétylneuraminiques sont les plus dominants chez les cellules humaines. Les récepteurs contenant les sialyloligosaccharides de types de liaison SA α (2,6)Gal et SA α (2,3)Gal sont les cibles majeures de multiples pathogènes. Différentes familles de virus exploitent les structures des glycoconjugués sialylés pour leur processus d'infection telles que les *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Adenoviridae*, *Coronaviridae*, *Reoviridae*, *Piconaviridae*, ...

La spécificité de récepteur définie par la reconnaissance des variétés d'acide sialique et la liaison entre l'acide sialique et le galactose voisin est beaucoup plus étudiée chez les virus influenza de la famille des *Orthomyxoviridae* (voir paragraphe I.1.4.1.2 pour les virus de

type A et B). Ce caractère spécifique peut en partie déterminer la barrière d'espèce. De plus la distribution de ces structures chez les cellules d'hôte participe à la détermination du tropisme tissulaire du virus. En général, chez l'homme l'infection due aux virus grippaux est principalement via le tractus respiratoire. Cependant, il a été remarqué que parmi les trois virus aviaires hautement pathogène qui ont infecté l'homme (H5N1, H9N2, H7N7), seul le sous-type H7N7 est capable de relier à un récepteur sialylé avec la liaison de type $\alpha(2,3)$ au niveau oculaire (175). De plus certains variants du virus H5N1 ont montré leur capacité à reconnaître et se lier avec l'acide sialique de type $\alpha(2,3)$ et aussi $\alpha(2,6)$ (84). Cependant, jusqu'à présent ce type de virus aviaire hautement pathogène n'a pas encore acquis une capacité pour pouvoir se transmettre efficacement d'homme à homme. Ceci montre que la reconnaissance de récepteur du virus peut être reliée à une structure spécifique en plus des deux types de liaison entre acide sialique et le galactose voisin.

Il a été démontré que la succession des monosaccharides au-delà du galactose dans la chaîne d'oligosaccharide a aussi une influence sur l'affinité de liaison de l'hémagglutinine du virus aux récepteurs. En effet, les virus humains (non adapté à l'œuf) de type A (H1N1 et H3N2) et B ont une plus forte affinité à la structure de type Neu5Ac $\alpha(2,6)$ Gal $\beta(1,4)$ GlcNAc que à celle de type Neu5Ac $\alpha(2,3)$ Gal $\beta(1,4)$ Glc (85, 186). D'après l'étude de Gambaryan *et al.*, 2005, les virus aviaires isolés de différentes espèces reconnaissent un motif préférentiel spécifique à chacun (83). Les virus isolés chez des mouettes se lient préférentiellement à la structure de Neu5Ac $\alpha(2,3)$ Gal $\beta(1,4)$ GlcNAc avec un résidu de fucose situé en position 3 du résidu GlcNAc, tandis qu'une structure similaire qui possède un groupe sulfonique (-SO₃H) en position 6 du résidu GlcNAc est reconnue par les virus isolés chez des poulets, ceux des canards reconnaissent préférentiellement la structure Neu5Ac $\alpha(2,3)$ Gal $\beta(1,3)$ GalNAc. Récemment la conformation structurelle du glycane a également été prise en compte comme facteur important dans la détermination de la spécificité d'hôte (**figure 1.29**) (243, 290). Les virus aviaires et porcins reconnaissent la conformation conique formée par une chaîne de sialylogoligosaccharide de taille courte (di/tri saccharides) avec la liaison de type $\alpha(2,3)$ ou $\alpha(2,6)$. Quant aux virus humains, ils reconnaissent la conformation sous forme d'un parapluie. Cette conformation est générée uniquement par un glycane terminal en $\alpha(2,6)$ et de taille longue avec un motif de type SA $\alpha(2,6)$ [Gal $\beta(1,4)$ GlcNAc $\beta(1,3)$]₂-. Cela indique que la reconnaissance des glycanes de structure et de conformation spécifique est cruciale pour que les virus puissent infecter d'une façon efficace et soient adaptés à l'hôte.

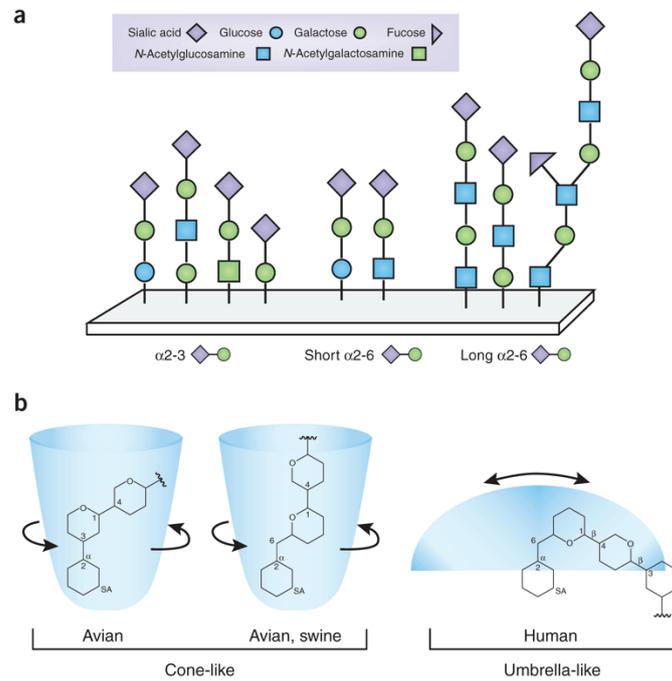


Figure 1.29 : **a)** Représentation des glycanes dans une puce ; **b)** Les conformations formées par les sialylolygosaccharides terminés par la liaison $\alpha(2,3)$ et $\alpha(2,6)$ avec des glycanes de tailles différentes. Source : Carole Bewley, 2008, *Nature Biotech* (24)

I.3.4. Les polysaccharides naturels d'intérêt

La majeure partie des glucides est produite par la photosynthèse. Les algues et les végétaux supérieurs sont des sources d'intérêt pour l'exploitation des polysaccharides à échelle industrielle, particulièrement des polysaccharides de la paroi. Les pectines, alginate, carraghénanes et agars sont les polysaccharides de l'algue et du végétal les plus utilisés dans de nombreux produits de l'industrie agroalimentaire, cosmétique, pharmaceutique. Grâce à leur propriété de haute affinité et de rétention d'eau, à la capacité de former des gels et de capturer des métaux, ils sont employés en tant qu'agents gélifiants, épaississants, stabilisants. D'un autre côté, plusieurs activités biologiques telles que les activités antithrombines, antioxydantes, ou antivirales ont été également découvertes chez les polysaccharides d'origine naturelle (algues, végétaux supérieurs, bactéries, mammifères, fungi)... Cependant, il est difficile de caractériser des structures hétérogènes et complexes des polysaccharides. La

compréhension de la relation entre les structures et les domaines d'activité biologique est, donc, indispensable pour le développement des molécules thérapeutiques.

1.3.4.1. Les polysaccharides sulfatés

Les polysaccharides sulfatés ont une capacité d'inhibition potentielle d'un large spectre de virus tels que le virus herpès simplex (HSV), le virus de l'immunodéficience humaine (HIV), le virus de la dengue (DENV), le virus respiratoire syncytial (VRS), le virus influenza.

Il a été démontré que la présence de groupements sulfates dans la structure des sucres a une influence sur leur activité antivirale, en raison sans doute d'une forte interaction électrostatique avec les cibles virales. Certains caractères de sulfatation sont rapportés, tels que le degré de sulfatation, la distribution des groupes sulfatés, la position spécifique, *etc.* (90).

- En effet, les molécules porteuses de nombreux groupes sulfatés peuvent acquérir plus d'activité. Pour les polysaccharides d'origine marine, une représentation de 35 à 60 groupes sulfates pour une structure d'une centaine de résidus de sucre a été associée à une bonne activité antivirale.
- Cependant le degré de sulfatation n'est pas le seul critère permettant d'expliquer l'activité antivirale d'une molécule, puisque deux molécules de même degré de sulfatation ne présentent pas forcément la même activité antivirale. La distribution des groupes sulfates de façon à former des régions hautement chargées est également un critère favorisant l'émergence d'une activité antivirale. Ce critère est comme pour le degré de sulfatation dépendant de l'origine des sucres.
- Enfin, la position spécifique des groupes sulfates participe aussi à l'activité des molécules, à côté du degré de sulfatation, comme c'est le cas des chondroïtines sulfatés. On remarque que le fractionnement comporte des unités disaccharidiques de type E, dont les groupes sulfates se situent en carbone 4 et 6 est ce qui présente une bonne activité anti-herpès (20). Quant aux fractionnements de type A, B, C, et D, ils présentent une très faible ou aucune activité. Pour ces derniers, les groupes sulfates sont en positions C₄ (type A), C₂ et C₄ (type B), C₆ (type C), C₂ et C₆ (type D) (**figure 1.30**).

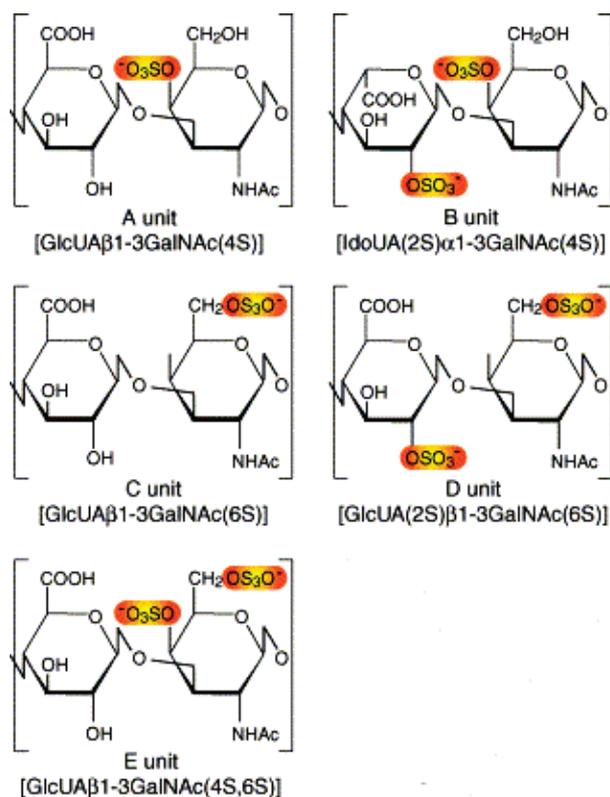


Figure 1.30 : Les 5 types disaccharidiques de chondroïtines sulfatés

Soucre : Sugahara et al., 2003, *Curr Opin Struct Biol* (266)

Par ailleurs, la propriété biologique des polysaccharides n'est pas simplement dépendante des caractéristiques des groupements sulfates mais aussi des structures spécifiques des molécules. Une relation entre ces éléments a été beaucoup étudiée chez le polysaccharide sulfaté d'héparine.

L'héparine fait partie d'un groupe de polysaccharides sulfatés d'origine mammifère, les glycosaminoglycanes. Ces polysaccharides se trouvent en abondance au niveau des matrices extracellulaires et à la surface de nombreuses cellules. De nombreuses activités biologiques sont associées à ces structures dont le rôle de récepteur pour plusieurs microorganismes (11, 260). L'héparine est utilisée depuis longtemps en tant que substance anticoagulante. Sa capacité antigrippale a été également identifiée (121). L'héparine se caractérise par une structure linéaire, non ramifiée, composée des unités saccharidiques, l'acide uronique et le D-glucosamine. Généralement, une structure typique d'héparine contient trois groupements sulfates, un en position C₂ de l'acide uronique et deux en positions C₃ et/ou C₆ (200). De plus, le nitrogène de la glucosamine pourrait être sulfaté, acétylé.

L'activité anticoagulante résulte d'une interaction entre l'héparine et l'antithrombine AT-III. Cette réaction induit un changement de conformation de l'AT-III qui est directement impliquée dans l'inhibition de la coagulation causée par le facteur Xa et la thrombine. Un domaine pentasaccharidique de l'héparine, dont 4 groupes sulfates, a été identifié comme étant responsable de la liaison avec la protéine AT-III (**figure 1.31**). Cependant, une chaîne de 14 à 20 saccharides est nécessaire pour accélérer l'interaction entre la molécule AT-III et la thrombine.

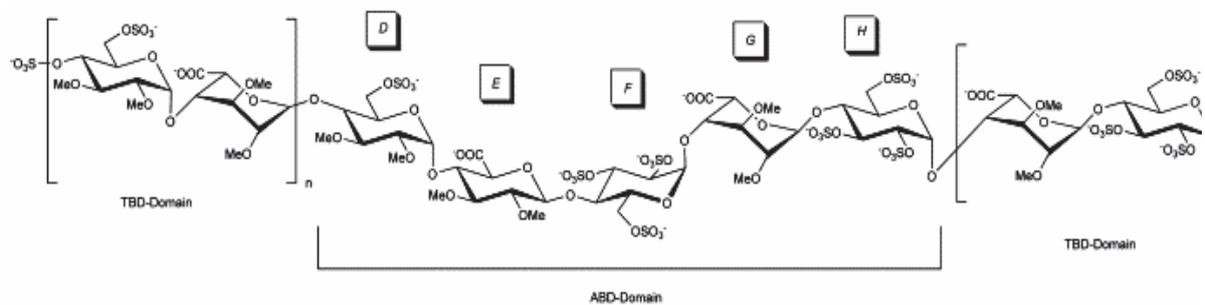


Figure 1.31 : La structure de l'héparine contenant un domaine lié à l'antithrombine AT-III (ADB) et des domaines liés à la thrombine (TBD). Source : Noti and Seeberger, 2005, *Chem & Biol* (200)

Les algues représentent une source d'une grande quantité et diversité de polysaccharides actifs. Les polysaccharides sulfatés sont généralement isolés de l'algue rouge (carraghénanes, galactanes, xylomannanes), de l'algue brune (fucanes, galactofucanes), et de l'algue verte (ulvanes). Certains polysaccharides sulfatés présentant de l'activité antigrippale ont été rapportés.

- Le spirulane calcium (Ca-SP) est un polysaccharide sulfaté isolé de la microalgue *Spirulina platensis*. Ce polysaccharide présente une capacité inhibitrice contre plusieurs virus enveloppés, incluant le virus influenza de type A (115). L'étude de son mode d'action suggère que la molécule Ca-SP interfère avec l'étape d'adsorption et de pénétration du virus. Ce polysaccharide se compose de rhamnose, ribose, mannose, fructose, galactose, xylose, glucose, acide glucuronique, acide galacturonique, sulfate et calcium.
- Les galactanes sulfatés de l'algue rouge *Aghardhiella tenera* présentent une activité inhibitrice vis-à-vis des virus influenza de type A et B (309). Ce

polysaccharide est composé des unités de galactose. Les carraghénanes sont des polysaccharides génériques de type galactane et sont beaucoup plus étudiés pour leur activité antivirale (94, 99, 105). Récemment, un produit de carraghénane a été développé et commercialisé, sous le nom Coldamaris, pour la prévention des symptômes de rhume par voie nasale (62).

- Un polysaccharide sulfaté de 220 kD, dit naviculan, extrait d'une microalgue marine *Navicula directa* présente une activité inhibitrice aux virus HSV de type 1 et 2, et virus influenza de type A (154). Ce polysaccharide se caractérise par une structure complexe composée de fucose, xylose, galactose, mannose, et du rhamnose.

Concernant les polysaccharides sulfatés d'origine bactérienne, les dextranses sont les plus connus pour leur activité antivirale depuis longtemps. Ces polysaccharides sont composés des chaînes de α -(1,6)-glucose et des branches latérales de type de liaison de α -(1,3) ou α -(1,4). Ils sont capables d'inhiber plusieurs virus enveloppés, dont les virus grippaux de type A (121). Il a été démontré que les dextranses bloquent le processus de fusion du virus influenza (166-167, 223). De plus, deux fractionnements de polysaccharide sulfaté, dérivés de la bactérie marine, *Pseudomonas* WAK-1, présentent un effet vis-à-vis uniquement du virus de type A (178). Cette bactérie est isolée de l'algue brune *Undaria pinnatifida*.

1.3.4.2. Les polysaccharides pectiques

Les pectines sont des hétéropolysaccharides complexes de structure et de fonction présent dans les parois cellulaires des plantes (les végétaux supérieurs, les gymnospermes, les ptéridophytes, les bryophytes, certaines espèces de l'algue verte). D'une part ces polysaccharides contribuent à l'adhésion des cellules. D'autre part, ils jouent plusieurs rôles dans le développement, la morphologie, la croissance, et la défense des plantes (227). Il a été démontré que les pectines ont de multiples effets positifs sur la santé humaine, comme stimulant de la réponse du système immunitaire, la diminution de cancer de la prostate, et du cholestérol (127, 130).

La structure des pectines est riche en acide α -(1,4)-D-galacturonique (70 %). Il s'agit de trois type de polysaccharides pectiques : les homogalacturonanes, les galacturonanes substitués (les xylogalacturonanes, les apiogalacturonanes, les rhamnogalacturonanes II) et les

rhamnogalacturonanes I. Le rapport de ces polysaccharides est variable d'une espèce à l'autre, cependant les homogalacturonanes sont les plus abondants. Les domaines structuraux des pectines sont générés par ces différents polysaccharides pectiques liés de façon covalente.

- Les homogalacturonanes (HG) sont des homopolymères linéaires composés d'unités d'acide α -(1,4)-D-galacturonique (GalA) partiellement méthylés et acétylés. En général, une chaîne d'homogalacturonane comporte environ de 100 résidus de GalA.
- Les rhamnogalacturonanes II (RG-II) sont constitués d'un squelette de 8 unités de GalA au minimum, avec des branches composées de multiples de types d'oses et de types de liaisons.
- Les xylogalacturonanes se caractérisent par un substituant de xylose en position O-3 de certains résidus de GalA. Dans la structure des apiogalacturonanes, le squelette de galacturonane est substitué par les apiofuranoses en position O-2 ou O-3.
- Les rhamnogalacturonanes I (RG-I) représentent de 20 – 35 % de pectine. Ils contiennent une structure répétitive de disaccharides, $[4)\text{-}\alpha\text{-D-GalA-(1,2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhamnose-(1-4)\text{-}\alpha\text{-D-GalA-(1,2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhamnose-(1,)]}_n$. De 20 à 80 % des résidus de rhamnose ont des chaînes latérales constituées des arabinogalactanes de type AG-I ou AG-II.
 - AG-I : un squelette de β -(1,4)-galactane et des chaînes latérales d'arabinane liés en position C₃ du galactose
 - AG-II : un squelette de galactane, de type de liaison (1,3) ou encore (1,6), avec des points de branches d'arabinane en position 1, 3, 6.

Les **figures 1.32, 1.33 et 1.34** présentent certaines structures chimiques des constituants polysaccharidiques, des régions structurelles, et la structure primaire des pectines.

Une vue d'ensemble de la relation entre l'activité et la structure des pectines de différentes espèces montre que la majorité des polysaccharides actifs contiennent un squelette de rhamnogalacturonane I. Cette structure est liée fréquemment avec les chaînes d'arabinogalactane de type II ou avec celles de type I dans certains cas (257).

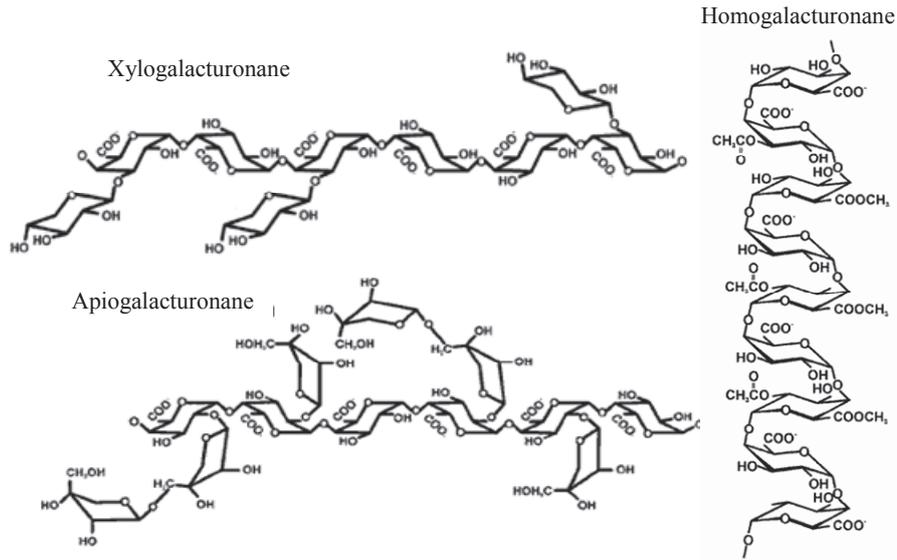


Figure 1.32 : Structure chimique des homogalacturonanes, des xylogalacturonanes, des apiogalacturonanes. Disponible sur : www.crc.edu/~mao/galact/gala.htm

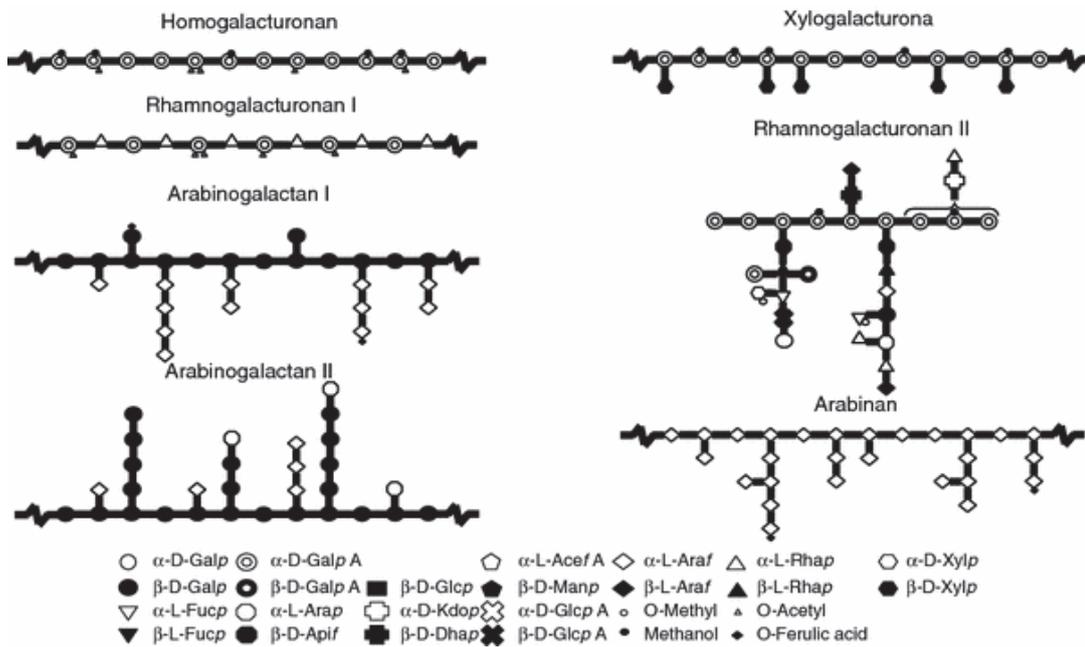


Figure 1.33 : Représentation schématique des éléments structuraux de la pectine

Source : Voragen et al., 2009, Struct Chem (293)

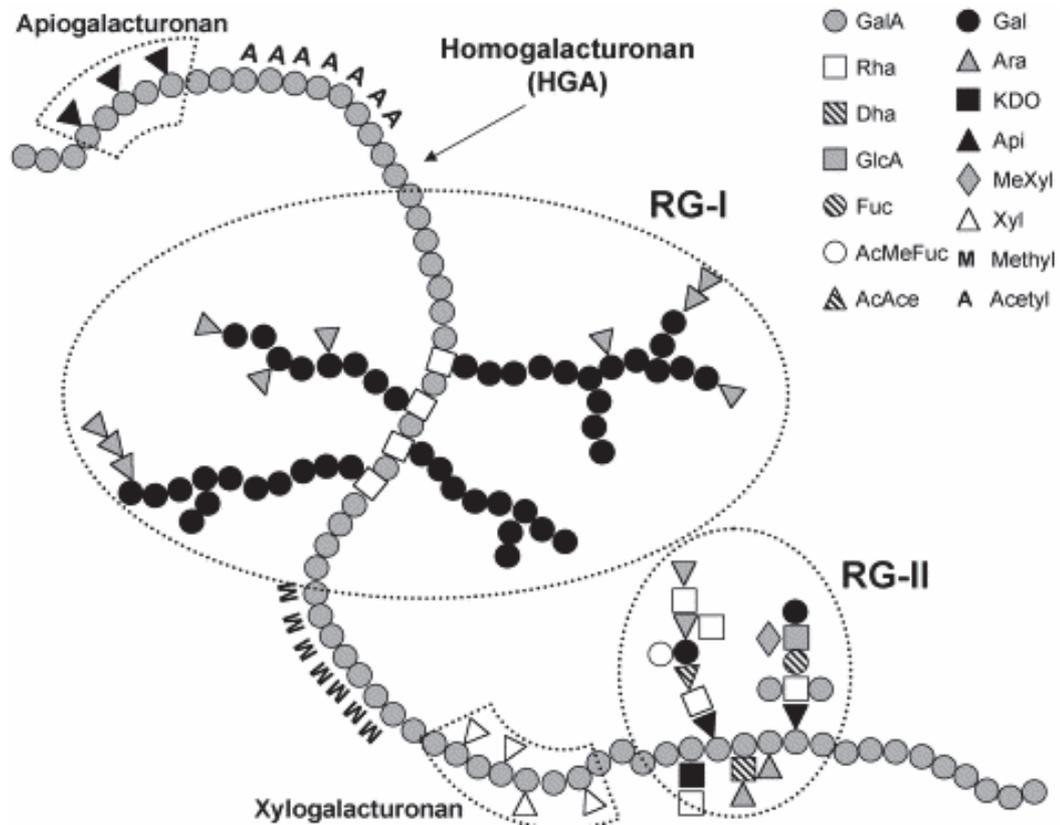


Figure 1.34 : Modèle de la structure primaire de la pectine

GalA : acide galacturonique, *Rha* : rhamnose, *Fuc* : fucose, *Api* : apiose, *AceA* : acide acerique, *Gal* : galactose, *Ara* : arabinose, *Xyl* : xylose, *GlcA* : acide glucuronique, *KDO* : acide ketodeoxymannoctulopyranosylonique, *Dha* : acide deoxyxyoheptulopyranosylarique

Source : Pérez et al., 2003, Biochimie (214)

CHAPITRE II.

MATERIELS ET METHODES

II.1. MATERIELS

II.1.1. La banque des polysaccharides et oligosaccharides

Une banque de sucre complexe (objectif de 300 composés) doit être constituée par les deux sociétés ELICITYL et KALYS. Les constituants de la banque proviennent de matières premières naturelles, principalement à partir d'algues et de plantes aquatiques et terrestres. Dans cette étude, 245 polysaccharides et oligosaccharides ont été fournis et testés. Les composés (codés en numéro) et leur caractère sont représentés dans le **tableau 2.1**.

Vingt familles de sucres ont été extraites à partir d'une biosource de 26 matières premières. Les molécules sont neutres ou se caractérisent par une charge négative en portant des groupes sulfates, ou des groupes carboxylates.

La production des molécules est un processus industrialisable et reproductible, optimisé par les deux sociétés partenaires. En général, ce processus se compose des étapes suivantes :

- Les matières premières sont recueillies et broyées pour l'extraction en phase liquide.
- L'extraction sera réalisée par des traitements enzymatiques et/ou chimiques.
- La dépolymérisation et purification seront effectuées par des techniques telles que l'ultrafiltration, la chromatographie liquide basse pression, la chromatographie sous haute pression.
- La pureté de chaque oligosaccharide est vérifiée par chromatographie d'échange anionique à haute pression.

Tableau 2.1 : Liste des molécules testées

| | Famille de sucres | Source | | Charge | Échantillons |
|----|--------------------------|----------------------------------|----------------------------|---------|---|
| 1 | Alginate | <i>Laminaria japonica</i> | algue brune | chargé | 29, 34 → 46, 56 → 62, 73, 74, 183 → 190 |
| | | <i>Chorda filum</i> | | | 92, 93, 163, 222 → 227, 230, 231, 232 |
| | | <i>Fucus vesiculosus</i> | | | 23, 220, 221, 228, 229 |
| | | <i>Durvillea antarctica</i> | | | 104 |
| | | <i>Ascophyllum nodosum</i> | | | 106 |
| 2 | Amidon | | | neutre | 197, 198, 199, 200 |
| 3 | Apiogalacturonane | <i>Zostera marina</i> | plante aquatique | chargé | 30, 31, 82, 83, 99, 134 → 139, 158 → 161, 246, 247, 248 |
| 4 | Aarabinogalactane | <i>Codium fragile</i> | algue verte | sulfaté | 33, 79, 80, 81, 98, 107 → 112, 141, 152 → 157, 206, 237 → 242 |
| 5 | Carraghénane | <i>Agardhiella tenera</i> | algue rouge | sulfaté | 164, 165, 166 |
| 6 | Cellulose | Linter coton | | neutre | 191 |
| 7 | Dextrane | <i>Leucostoc spp.</i> | bactérie | neutre | 28 |
| 8 | Fucane | <i>Fucus vesiculosus</i> | algue brune | sulfaté | 21, 22, 55, 149, 150, 208, 209, 219 |
| | | <i>Chorda filum</i> | | | 90, 91, 148, 210, 211, 214 → 216 |
| | | <i>Ascophyllum nodosum</i> | | | 105, 119, 120, 121, 212, 213, 218 |
| | | <i>Durvillea antarctica</i> | | | 103, 116, 117, 118, 217 |
| 9 | Galactofucane | <i>Undaria pinnatifida</i> | algue brune | sulfaté | 20, 54, 113, 114, 115, 140, 151 |
| 10 | Galactomannane | Guar | végétal supérieur | neutre | 71, 72, 201 → 205 |
| | | Tara | | | 75, 76 |
| 11 | Glucomannane | Konjac | végétal sup | neutre | 24 → 27, 67 → 70, 174 → 182 |
| 12 | Hétéroglycane sulfaté | <i>Caulerpa racemosa</i> | plante aquatique | sulfaté | 32, 162, 233 → 236 |
| 13 | Isolichenane | <i>Cetraria islandica</i> | lichen | neutre | 63 → 66, 127 → 130, 132, 133 |
| 14 | Spirulane | <i>Spirulina platensis</i> | cyanobactérie (microalgue) | sulfaté | 86 → 89, 122 → 125 |
| 15 | Ulvane | <i>Ulva armoricana</i> | algue verte | sulfaté | 14, 16 → 19, 53, 77, 78, 94, 95, 100, 101, 102, 142 → 147, 243, 244, 245, 168 |
| | | <i>Enteromorpha intestinalis</i> | | | 144 |
| 16 | Xanthane | <i>Xanthomonas campestris</i> | bactérie | neutre | 192 → 196 |
| 17 | Xylane sulfaté | <i>Palmaria palmata</i> | algue rouge | sulfaté | 96, 97 |
| 18 | Xyloglucane | <i>pomace</i> | végétal sup | neutre | 1 → 13, 15, 47 → 52, 126 |
| 19 | Xylomannane sulfaté | <i>Nothogenia fastigiata</i> | algue rouge | sulfaté | 167 |
| 20 | Glycans & Galacto-oligos | lait maternel | | neutre | 169 → 173, 207 |

II.1.2. Les lignées cellulaires

Toutes les études ont été réalisées sur une lignée continue de rein de chien, Madin Darby Canine Kidney (MDCK - ATCC, CCL34). Les cellules sont maintenues en milieu sans sérum UltraMDCK (Lonza, BE12-749Q) supplémenté de L-glutamine à 2mM (Lonza, BE17-605E), de pénicilline (200 Unités/ml) et streptomycine (200 µg/ml) (Lonza, DE17-602E). Les cellules, à raison de 4×10^6 , sont ensemencées sous un volume de 75 ml de milieu UltraMDCK en flacon de 75 cm² (FALCON), puis incubées à 37°C, sous 5 % de CO₂ pendant 72 à 96 heures.

Pour les tests biologiques de cette étude, les cellules sont ensemencées à raison de 10^4 cellules sous un volume de 200 µl de milieu par puits d'une microplaque de 96 puits.

II.1.3. Les virus

Différentes souches de virus grippal sont présentées dans le **tableau 2.2**, dont 8 souches du type A et 1 souche du type B.

- Parmi les virus de type A, il y a 3 souches de sous-type H3N2, 4 souches de sous-type H1N1, 1 souche H3NA–.
- Trois souches se caractérisent par une mutation au niveau de la protéine NA (H275Y, R292K) ou HA (D222G). Les mutations H275Y et R292K conduisent à la résistance à l'oseltamivir.

Trois souches saisonnières adaptées sur les cellules MDCK ont été fournies par le réseau des GROG (Groupes Régionaux d'Observation de la Grippe).

Trois souches responsables de la pandémie 2009 ont été isolées chez les prélèvements cliniques.

Le virus recombinant RGH3N2 a été obtenu par la technique de génétique inverse. Ses glycoprotéines de surface proviennent de la souche A/Lyon-CHU/26430/03 (H3NA–) pour l'hémagglutinine, et de la souche A/Moscou/10/99 (H3N2) pour la neuraminidase. Sur un fond génétique provenant de la souche A/Moscou/10/99 (H3N2), la mutation R292K présente sur la NA de ce recombinant a été générée par la technique de mutagenèse dirigée.

Toutes les souches dans cette étude sont produites par culture sur cellules MDCK.

Tableau 2.2 : Liste des souches virales testées

| Type | Sous-type | Souche | Caractère |
|-------|---------------------|--|------------------------|
| A | H3N2 | A/Brisbane/10/07 | Souche saisonnière |
| | | RGH3N2 (A/Lyon-CHU/26430/03 (H3) x A/Moscow/10/99 (N2)) | Souche recombinante |
| | | RGH3N2 (R292K) | Souche recombinante |
| | H1N1 | A/Solomon Island/03/06 | Souche saisonnière |
| | | A/Lyon/969/09 | Souche pandémique 2009 |
| | | A/Lyon-CHU/48-425/09 (H275Y) | |
| | | A/St-Etienne/1691/09 (D222G) | |
| H3NA- | A/Lyon-CHU/26430/03 | | |
| B | | B/Florida/4/06 | Souche saisonnière |

II.2. METHODES

II.2.1. Production de virus

La production de virus est réalisée sur les cellules MDCK, en utilisant le milieu sans sérum EMEM (Lonza, BE12-125F) complété avec L-glutamine à 2mM (Lonza, BE17-605E), pénicilline (200 Unités/ml) et streptomycine (200 µg/ml) (Lonza, DE17-602E), et de la trypsine à 1 µg/ml (Sigma, T6763). Les cellules cultivées par flacon de 175 cm² sont préalablement lavées une fois avec 10 ml de milieu EMEM sans trypsine. Ensuite, le virus est inoculé à une dose infectieuse par cellule (MOI) de 10⁻⁴ sous un volume de 10 ml. Après une heure de contact à 34°C sous 5 % de CO₂, le volume d'infection est enlevé. Les cellules, à la suite, sont lavées deux fois et remplacées par 50 ml de milieu EMEM avec trypsine. Le flacon des cellules infectées est incubé à 34°C sous 5 % de CO₂ jusqu'à l'apparition de l'effet cytopathique du virus (ECP). Le surnageant de culture est récolté puis centrifugé 5 minutes à 3000 rpm. Les aliquotes du surnageant sont conservés à – 80°C.

II.2.2. Test de cytotoxicité au rouge neutre

La toxicité des composés est évaluée sur les cellules MDCK en phase de croissance ou à confluence. Trois dilutions de composé à la concentration finale de 250 µg/ml, 25 µg/ml, 2,5

µg/ml dans le milieu de culture sont utilisées pour le traitement des cellules. Chaque concentration est déposée à raison de 3 cupules. Le témoin négatif, à raison de 6 cupules, est réalisé par addition de 200 µl de milieu. Après 48 heures d'incubation à 37°C, sous 5 % de CO₂, la viabilité cellulaire est révélée par une méthode au rouge neutre.

Principe de la méthode au rouge neutre :

Le rouge neutre est un colorant capable de diffuser dans les membranes cellulaires et s'incorporer dans les lysosomes des cellules vivantes.

Notre méthode se base sur une procédure développée pour les virus influenza par l'équipe de Smee et *al.* (254-255). En détail, le surnageant de chaque cupule est éliminé, puis les cellules sont lavées et remplies par 200 µl de tampon phosphate salin (PBS). Ensuite, la solution de rouge neutre à 0,15 % (Sigma, N-2889) est déposée à raison de 50 µl par puits. La plaque est incubée 2 heures à 34°C 5 % CO₂. Après ce temps de contact, 2 rinçages successifs avec 200 µl de PBS sont effectués. La solution d'extraction (tampon citrate/éthanol) est répartie à raison de 100 µl par puits. La plaque est mise sous agitation pendant 10 minutes. La quantité de rouge neutre incorporée dans les cellules est mesurée par spectrophotométrie à 550 et 405 nm.

Le taux de rouge neutre est proportionnel à la quantité des cellules viables. Le pourcentage de viabilité cellulaire est calculé selon la formule :

$$\% \text{ de viabilité (A)} = \frac{\text{DO moyenne des puits traités}}{\text{DO moyenne des puits témoins}} \times 100$$

$$\% \text{ de mortalité (toxicité)} = 100 - A$$

II.2.3. Titrage du pouvoir infectieux du virus

Cette technique permet de déterminer le titre du virus en termes de dose infectieuse 50 % en culture de cellule (CCID₅₀) par unité de volume.

Le test est réalisé dans une microplaque à 96 cupules recouvertes par un tapis de cellules MDCK. Les virus sont dilués de raison 10 dans un milieu EMEM (supplémenté de L-glutamine, pénicilline, streptomycine, et trypsine). Avant l'inoculation, les cellules sont préalablement lavées une fois par du milieu EMEM sans trypsine. Chaque dilution virale est déposée dans 4 cupules à raison de 50 µl par cupule. Le volume de chaque cupule est

complété à 200 µl du milieu. Le témoin négatif (200 µl du milieu) permet de vérifier l'absence d'effet cytopathique des cellules non infectées.

La plaque infectée est incubée à 34°C, sous 5 % CO₂ pendant 48 heures. La présence de virus est examinée par la lecture de l'effet cytopathique à la microscopie, et confirmée par la mise en évidence de l'activité hémagglutinante du virus dans le surnageant.

Le titre infectieux est déterminé par l'inverse de la dernière dilution de virus pour laquelle il y a hémagglutination dans 50 % des cupules, soit au moins deux cupules sur quatre. Il est calculé selon la méthode statistique de Reed et Muench et exprimé en CCID₅₀/50 µl (le nombre de doses infectieuses 50 % en culture de cellule contenue par unité de volume) (225).

II.2.4. Essai de neutralisation de la multiplication virale

Cette technique permet de déterminer la capacité neutralisante du composé sur la base des cellules MDCK infectées par le virus influenza.

II.2.4.1. Criblage des composés

Le virus est dilué en milieu EMEM complétement + trypsine pour obtenir les doses infectieuses de 10, 30, et 100 CCID₅₀/50 µl.

Trois concentrations du composé (1 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml) sont préparés dans le milieu EMEM + trypsine.

Chaque dilution du composé est mise en contact avec un volume égal d'une dose virale, soit 9 mélanges au total. Ces derniers sont incubés à 34°C sous 5 % CO₂, pendant 30 minutes. Après, 100 µl de ces mélanges sont inoculés dans les cupules d'une plaque à 96 puits, dont le milieu de culture est remplacé par 100 µl de milieu EMEM d'infection sur les cellules préalablement lavées. Les concentrations finales du composé sont obtenues à raison de 250 µg/ml, 25 µg/ml, 2,5 µg/ml. Le plan de dépôt des mélanges est illustré dans la **figure 2.1**. Chaque mélange est déposé à raison de 4 cupules.

Sur chaque plaque, deux témoins sont réalisés :

- Les témoins cellules (témoins négatifs, TN) (200 µl de milieu EMEM + trypsine) pour vérifier l'absence d'effet cytopathique des cellules MDCK non infectées.

- Les témoins virus (témoins positifs, TP) afin de vérifier le nombre de CCID50/50 µl effectivement introduit dans le test (par l'addition d'un volume égal de virus et de milieu).

Après 48 heures d'incubation, l'activité neutralisante est examinée par la lecture de l'effet cytopathique suivi par le contrôle de l'hémagglutinine virale dans le surnageant (voir paragraphe II.2.5.1). De plus, l'effet inhibiteur du composé est mis en évidence et analysé par la détection de l'activité neuraminidasique dans le surnageant (voir paragraphe II.2.6.1)

Les résultats se traduisent par le pourcentage de l'inhibition de l'activité de l'enzyme NA, selon la formule :

$$\% \text{ de l'activité NA (B)} = \frac{(\text{RFU moyenne des puits traités}) - (\text{RFU moyenne des puits de TN})}{(\text{RFU moyenne des puits de TP}) - (\text{RFU moyenne des puits de TN})} \times 100$$

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 - B$$

Les valeurs de trois concentrations testées permettent d'estimer l'intervalle de la concentration d'inhibiteur capable de réduire 50 % de l'activité NA (CI50).

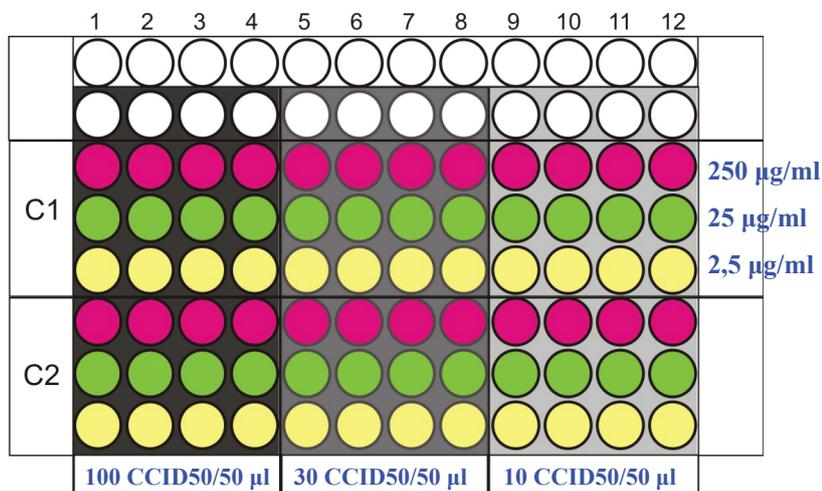


Figure 2.1 : Plan de plaque pour l'essai de neutralisation (C1 : composé 1, C2 : composé 2)

II.2.4.2. Evaluation de l'effet inhibiteur des molécules actives

La procédure de ce test est similaire à celle du criblage, à l'exception de quelques points suivants :

- Une seule dose virale à 30 CCID₅₀/50 µl est utilisée
- En plus de la méthode de détection de l'activité neuraminidasique, l'effet inhibiteur du composé est mis en évidence également par les deux méthodes suivantes :
 - 1) Détermination de la viabilité cellulaire par méthode au rouge neutre (voir paragraphe II.2.2)
 - 2) Détermination du titre du pouvoir infectieux des virus produits (voir paragraphe II.2.3)
- Dans le test incluant l'oseltamivir comme un inhibiteur de référence, cette molécule est utilisée aux concentrations finales de 40 µg/ml, 4 µg/ml, et 0,4 µg/ml.

II.2.5. Test d'hémagglutination et dosage de l'activité hémagglutinante

II.2.5.1. Test d'hémagglutination

La présence du virus dans le surnageant de culture est mise en évidence par une réaction basée sur la capacité des hémagglutinines de s'attacher au récepteur sur la surface des érythrocytes, entraînant la formation d'un réseau de globule rouge.

Dans cette étude, les globules rouges de cobaye sont utilisés à une concentration de 0,8 % dans le tampon SALK.

La réaction d'hémagglutination est réalisée en microplaque de 96 cupules à fonds coniques. Les surnageants sont répartis sous un volume de 50 µl dans toutes les cupules déjà recouvertes par 50 µl de tampon SALK. La solution de globule rouge est ensuite ajoutée à raison de 50 µl. La plaque est incubée pendant 1 heure à température ambiante.

Une réaction positive (présence de virus) se traduit par l'agglutination des hématies dans la cupule. Une réaction négative se traduit par la sédimentation des hématies qui couleront en inclinant la plaque.

II.2.5.2. Dosage de l'activité hémagglutinante

Cette technique permet de déterminer le titre hémagglutinant du virus. Les étapes similaires à celles du test d'hémagglutination sont réalisées. Cependant les virus dans le surnageant de culture sont dilués en séries de raison 2 avec le tampon SALK. Le titre hémagglutinant correspond à l'inverse de la dernière dilution montrant une hémagglutination (HAU/50 μ l).

II.2.6. Test fluorimétrie de l'activité neuraminidasique

Ce test se base sur la capacité de l'enzyme NA à hydrolyser un substrat fluorescent de 4-methylumbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminic (MUN) en libérant l'acide N-acetylneuraminique et le produit fluorescent 4-methylumbelliférol (4-Mu) (**figure 2.2**). L'intensité de fluorescence est mesurée avec une longueur d'onde d'excitation à 355 nm et une longueur d'onde d'émission à 460 nm au moyen d'un fluorimètre (Fluostar optima – BMG).

Le substrat MUN (Sigma, M-8639) est utilisé à une concentration de 100 μ M dans un tampon MES constitué d'acide 2-(N-morpholino)ethanesulfonic, sel de sodium, (Sigma, M-5057), 32,5 mM, pH 5,8 et de CaCl₂ 4 mM (Sigma, C-4901). La réaction est stoppée par l'addition du tampon glycine (Sigma, G-8898) 50 mM, pH 10,4.

La procédure standard des tests neuraminidasiques a été optimisée par Ferraris et *al.*, 2005 (72).

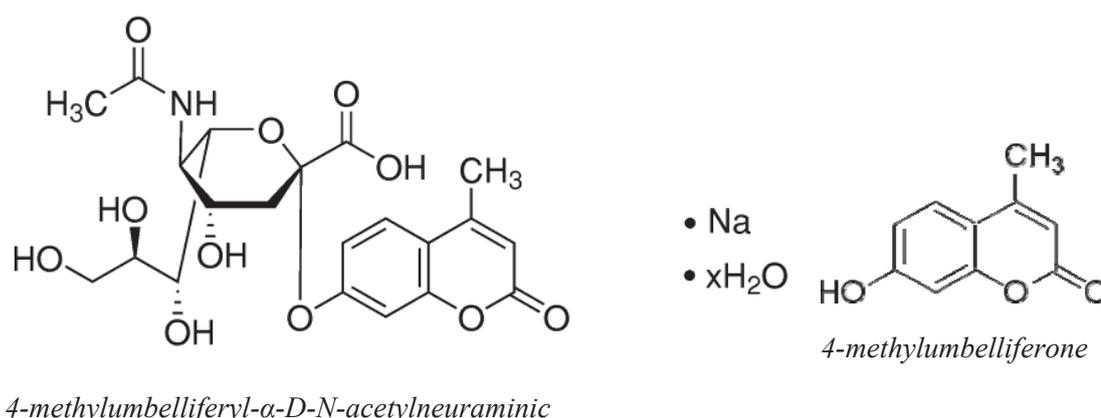


Figure 2.2 : Structure chimique du substrat MUN (4-methylumbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminic) et du produit fluorescent (4-methylumbelliférol). Disponible sur : www.sigmaaldrich.com

II.2.6.1. Détection de l'activité de la NA du virus dans le surnageant de culture

Cette méthode est appliquée dans le test de neutralisation pour mettre en évidence le niveau de multiplication virale reflété par l'activité neuraminidasique.

Un volume de 25 µl de surnageant dans chaque cupule est transféré à une autre plaque qui est déjà recouverte par 25 µl de tampon MES. L'incubation avec 50 µl du substrat MUN, donc 50 µM en concentration finale, se poursuit pour une heure à 37°C. La solution de glycine est répartie sous un volume de 150 µl afin d'arrêter la réaction. L'activité neuraminidasique est mesurée fluorimétriquement comme indiqué en dessus. La valeur de la fluorescence mesurée est exprimée en RFU (unité de fluorescence relative).

II.2.6.2. Inhibition de l'activité neuraminidasique

Cette technique est utilisée pour tester l'influence directe des inhibiteurs sur l'activité neuraminidasique.

Afin d'obtenir une activité homogène des molécules NA, tous les virus sont d'abord ajustés à une dose permettant de libérer 10 nmol/h/ml de 4-Mu selon une courbe standard. Ensuite, la suspension virale est pré-incubée avec une gamme de concentration d'inhibiteur (0,00001 µg/ml à 100 µg/ml) pendant 30 minutes à 37°C. Les étapes suivantes (l'incubation avec le substrat et la révélation) sont réalisées comme indiqué dans le paragraphe II.2.6.1. La concentration d'inhibiteur capable de bloquer 50 % de l'activité NA (CI50) est calculée par l'analyse de régression non linéaire avec l'aide du programme Sigmaplot.

II.2.7. Essai de neutralisation de la multiplication virale au cours du temps

Afin d'identifier les étapes de réplication visées par l'inhibiteur, l'essai de neutralisation est mené en fonction de quatre périodes d'infection du virus :

- La période de pré-adsorption : -3 à -1 h
- La période d'adsorption : -1 à 0 h
- La période de pénétration : 0 à 1 h
- La période de post-infection : 1 à 48 h

Cet essai est réalisé en plaque de 96 puits. Chaque modalité est réalisée en quadruplicat.

Le milieu EMEM complet additionné de 1 µg/ml de trypsine est utilisé comme milieu d'infection.

Le tampon PBS est utilisé pour le lavage. Après chaque étape de lavage (2 fois), les cellules sont recouvertes par du milieu frais. Le volume final est complété à 200 µl.

Toutes les périodes d'incubation sont effectuées à 34°C, sous 5 % CO₂, à l'exception de la condition de l'absorption qui est sous une température de 4°C pour avoir une infection synchronique.

Les témoins cellules (témoins négatifs) s'obtiennent par l'addition de 200 µl de milieu, pour vérifier l'absence d'effet cytopathique des cellules MDCK non infectées.

La révélation est réalisée par la lecture de l'effet cytopathique suivi par le contrôle de l'hémagglutinine virale et par la détection de l'activité neuraminidasique dans le surnageant. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité neuraminidasique par rapport à celle du témoin virus dans la modalité de contrôle.

L'inhibiteur à une concentration finale de 62,5 µg/ml (pour le cas de la molécule 152) est testé vis-à-vis d'une dose virale de 30 CCID₅₀/50 µl selon cinq modalités décrites ci-dessous.

- Modalité 1 : les cellules MDCK sont exposées à l'inhibiteur pendant 2 heures durant la période de pré-adsorption. La solution de l'inhibiteur est éliminée à la suite par 2 lavages. Le virus est alors inoculé, après 1 heure à 4°C (afin de permettre l'absorption du virus), l'inoculum est enlevé. Les cellules sont lavées avant l'addition de milieu frais. Les cellules sont alors incubées à 34°C pendant 1 heure afin de permettre la pénétration des virus. Un dernier lavage cellulaire est alors réalisé avant l'incubation des cellules à 34°C durant 48 heures.
- Modalité 2 : les virus sont mis en contact avec l'inhibiteur à volume égal durant 30 minutes à 34°C. Ce mélange est alors déposé sur les cellules durant 1 heure à 4°C afin de permettre l'absorption virale. Après élimination de l'inoculum, les cellules sont traitées comme dans la modalité 1 pour les étapes de pénétration et de répllication.

- Modalité 3 : cette modalité a la même procédure que celle de la modalité 2, à l'exception de l'étape de prétraitement. Les virus et l'inhibiteur sont introduits simultanément dans les cupules au début de la période d'adsorption.
- Modalité 4 : le virus est inoculé à raison de 200 µl par puits, puis incubé 1 heure à 4°C. Après cette étape d'absorption, l'inoculum est enlevé et remplacé par du milieu additionné d'inhibiteur (à la concentration finale de 62,5 µg/ml). Après 1 heure d'incubation à 34°C, le surnageant est éliminé. Ensuite, les cellules sont lavées et recouvertes par du milieu frais. Les plaques sont alors incubées 48 heures à 34°C, sous 5 % CO₂.
- Modalité 5 : l'inhibiteur est incubé uniquement dans la période de post-infection (1 – 48 h)
- Modalité de contrôle : l'efficacité d'infection du virus introduit dans le test est vérifiée par cette modalité, avec la procédure similaire (de -1 à 48 h) en l'absence de l'inhibiteur.

II.2.8. Détermination de l'affinité du virus/sucre

L'étude de l'interaction entre l'inhibiteur et les particules virales se base sur une méthode ELISA modifiée (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Le composé est immobilisé sur un support solide suivi par l'introduction d'une suspension de virus. La révélation est réalisée en utilisant un anticorps anti-NP (la nucléoprotéine) et un autre anticorps anti-immunoglobuline de souris conjugué à l'enzyme peroxydase. La réaction entre cette enzyme et un substrat spécifique va générer la coloration mesurée quantitativement à l'aide d'un spectromètre. La présence d'une coloration indique que le composé se fixe sur les virus. Plus la coloration est intense, plus grande est la capacité de capture du composé aux virus.

II.2.8.1. Immobilisation du composé de sucre

La méthode d'immobilisation permet de fixer le composé de sucre sur un support solide. Dans la première étape, la fétuine (Sigma, F-2379) est utilisée pour tester le système

d'immobilisation. La fétuine est une protéine capable de se fixer aux virus influenza grâce à sa structure oligosialylée (**figure 2.3**), portant des liaisons $\alpha(2,3)$ et $\alpha(2,6)$ (7).

Nous avons choisi de travailler avec des plaques Maxisorp (Nunc, 442404) à 96 cupules, dont la surface en polystyrène chargé présente une grande affinité aux molécules contenant des groupes polaires ou hydrophiles.

La procédure d'immobilisation pour le composé ou la fétuine est décrite ci-dessous :

- Un volume de 100 μl du composé dilué à raison de 10 $\mu\text{g/ml}$ dans le tampon DPBS (contenant CaCl_2 1 mM et MgCl_2 1mM) (Gibco, 14040) est déposé dans chaque puits. L'incubation de la plaque est réalisée à 4°C, en atmosphère humide, pour toute la nuit.
- Trois lavages sont réalisés par 200 μl de tampon PBS contenant 0,1 % de Tween 20 (PBS-Tween). Les sites non occupés sont bloqués par l'addition d'une solution de saturation (Roche, 11112589001) à raison de 200 μl par puits. L'incubation se fait à température ambiante sous agitation pendant 1 heure. La plaque est ensuite lavée 3 fois avec du tampon PBS-Tween.

Une dose virale de 256 à 512 UHA/50 μl est utilisée pour tester leur interaction avec les molécules. Le virus est dilué selon des dilutions sériées de raison 2 en tampon PBS-BSA (PBS contenant 1 % de BSA (Sigma, A0336)). 50 μl de chaque dilution sont déposés par puits, le volume est complété à 100 μl avec du PBS-BSA.

Après une incubation de 2 heures à 37°C, la plaque est lavée 3 fois avec le tampon PBS-Tween, et ensuite incubée avec 50 μl d'anticorps anti-NP (1/1000 dans le tampon PBS-BSA) pendant 30 minutes à 37°C. La plaque est ensuite lavée 3 fois avec du PBS-Tween.

Le conjugué (anticorps de chèvre) anti-IgG de souris marqué à la peroxydase, est dilué au 1/1000 dans du PBS-Tween. 50 μl sont ajoutés dans chaque puits, la plaque est ensuite incubée pendant 30 minutes à 37°C. Après l'incubation, la plaque est lavée 6 fois avec le tampon PBS-Tween.

100 μl de la solution d'ABTS (sel d'ammonium de l'acide azino-di-éthyl-di-3-éthyl-benzothizoline-6-sulfonique, Roche) à raison de 1mg/ml est disposé dans chaque puits, suivi par une agitation à l'obscurité pendant 30 minutes.

La lecture est effectuée au moyen d'un lecteur de plaque à la longueur d'onde de 405 nm.

L'intensité de la coloration verte générée par la réaction (peroxydase – ABTS) est proportionnelle à la quantité de peroxydase, donc à la quantité de virus capturé par le composé fixé dans chaque puits.

Le témoin négatif est réalisé par la même procédure, sans addition de la suspension virale.

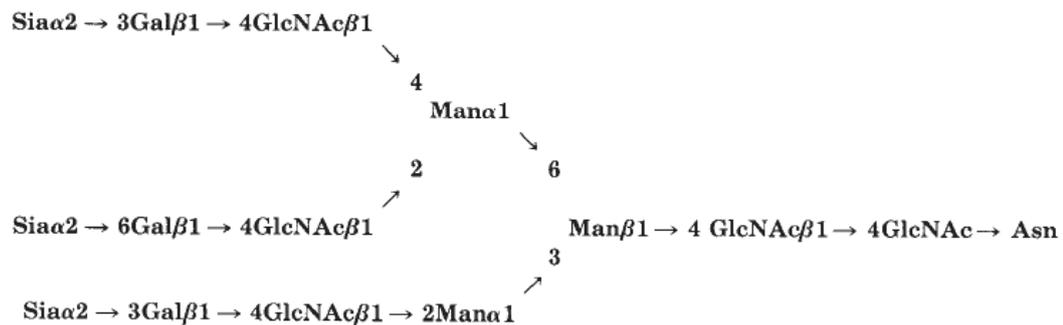


Figure 2.3 : Structure de l'oligosaccharide de la fétuine d'après Baenziger et Fiete, 1979 (7)

II.2.8.2. Essai de compétition entre la fétuine et le composé de sucre

La fétuine à raison de 10 µg/ml dans le tampon DPBS est immobilisé dans la plaque Maxisorp comme la procédure décrite en II.2.8.1.

La préparation de virus et de composé de sucre est réalisée suivant les étapes ci-dessous :

- Le composé est dilué 2 fois dans le tampon PBS-BSA (allant de 5 µg/ml à 0,0393 µg/ml), sous un volume de 25 µl.
- Le virus est utilisé à une dose qui donne une absorbance de 1,0 DO correspondant au test d'interaction avec la fétuine, sous un volume de 50 µl.
- Le virus et le composé sont mis en contact à 37°C pendant 30 minutes.

Ensuite, le mélange de virus/composé est déposé dans les cupules sous un volume de 75 µl. Le volume est complété à 100 µl avec 25 µl de PBS-BSA. L'incubation se poursuit

pendant 2 heures à 37°C. Les étapes suivantes (l'incubation avec l'anticorps et la révélation) sont similaires à celles décrites dans le paragraphe II.2.8.1.

Deux témoins sont réalisés :

- Le témoin négatif : le tampon PBS-BSA remplace la suspension virale (en présence ou absence de composé de sucre).
- Le témoin positif : la suspension virale en l'absence de composé testé.

Le pourcentage de compétition est calculé selon la formule :

$$\% \text{ de fixation avec fétuine (C)} = \frac{\text{DO du composé à tester} - \text{DO du témoin négatif}}{\text{DO du témoin positif} - \text{DO du témoin négatif}} \times 100$$

$$\% \text{ de compétition} = 100 - C$$

CHAPITRE III.

CRIBLAGE DES MOLECULES CAPABLES DE NEUTRALISATION DE L'INFECTION VIRALE

RESULTATS

Afin de mettre en évidence des molécules avec une activité antivirale, une banque de 245 oligo/polysaccharides a été mise à disposition pour le criblage de molécules actives. Une vue d'ensemble des composés fournis est rapportée dans le **tableau 3.1**. Il reprend la répartition des composés en fonction de l'origine (en majorité à partir d'algues), et des caractères (famille de sucres, charge) de ces dernières. Ces 245 composés sont donc classés dans trois groupes identifiés en fonction de la charge électrostatique, et 20 familles de sucres.

L'identification de la propriété antivirale des molécules est basée sur la mise en évidence de la capacité à neutraliser l'infection d'une lignée cellulaire permissive aux virus influenza (MDCK). La présence ou l'absence de virus dans le surnageant de culture est révélée par la détection de l'activité enzymatique de la neuraminidase du virus influenza.

Afin de mettre en évidence une activité antivirale à large spectre, des représentants des deux types A et B de virus influenza responsables d'épidémies ont été sélectionnés. Les virus A/Brisbane/10/2007 (H3N2) et B/Florida/4/2006 ont donc été choisis. Ces derniers ont été inclus dans les compositions vaccinales de 2007 à 2009. Ils représentent d'un point vu antigénique, les virus circulant durant ces deux saisons hivernales.

Trois concentrations de chaque composé ont été testées vis-à-vis de trois doses virales, soit les concentrations finales de 250 µg/ml, 25 µg/ml, 2,5 µg/ml vis-à-vis de 100 CCID₅₀/50 µl, 30 CCID₅₀/50 µl, 10 CCID₅₀/50 µl. L'augmentation de la dose virale permet de choisir les candidats les plus efficaces. Un premier criblage des molécules est validé en fonction des résultats de neutralisation obtenus pour une dose virale de 10 CCID₅₀/50 µl. Un choix plus restrictif est ensuite réalisé en fonction des résultats d'inhibition obtenus avec les doses supérieures, 30 et 100 CCID₅₀/50 µl.

Toutes les molécules testées ont été regroupées en fonction du pourcentage de leurs capacités d'inhibition (I). Il s'agit de trois groupes :

- Groupe 1 : $I \leq 10\%$
- Groupe 2 : $10\% < I < 50\%$
- Groupe 3 : $I \geq 50\%$

Le groupe 1 correspond à des molécules sans activité antivirale ou avec une activité inférieure ou égale à 10 %, le groupe 2 correspond à des molécules dont l'activité inhibitrice varie entre 10 et 50 %, et enfin le groupe 3 dont l'activité inhibitrice est supérieure ou égale à 50 %.

La robustesse des procédés de production et de purification des molécules sélectionnées par la confirmation des résultats à partir d'un nouveau lot sera évaluée.

Le mécanisme d'action des molécules sélectionnées sur la base des critères cités ci-dessus, sera affiné par la réalisation de différentes méthodes *in vitro*. Des tests de production *in vivo* pourront être menés en fonction du mécanisme d'action décrit.

La présentation des résultats des composés sera réalisée en fonction de la charge électrostatique et de la famille de sucres. Dans notre études, les composés testés sont répartis parmi les 20 familles de sucres, dont 9 familles sulfatées, 2 familles chargées, 9 familles neutres.

III.1. LES FAMILLES SULFATEES

III.1.1. Les arabinogalactanes

Les 25 molécules de la famille des arabinogalactanes ont été extraites de l'algue verte, *Chodium fragile*. Parmi ces molécules :

- Sept sont des polysaccharides, 9 sont des polysaccharides séparés, 9 sont des oligosaccharides.
- Les polysaccharides 33 et 98 sont issus du même procédé d'extraction et représentent donc deux lots d'une même préparation.
- Les polysaccharides, 79, 80, 81, 156, 157, sont issus du fractionnement des molécules 33 et 98.
- Les oligosaccharides, 107, 108, 152, 153, 154, 155, sont issus du polysaccharide 109.
- Les oligosaccharides, 110, 111, 112 sont issus de la molécule 141.

Les résultats sont présentés en fonction du sous-type considéré (**tableaux 3.2 et 3.3**). Parmi les 25 molécules, 5 ne présentent aucune capacité d'inhibition vis-à-vis des deux

sous-types, 15 présentent une activité d'inhibition vis-à-vis du type A et 21 présentent une activité vis-à-vis du type B.

- **Vis-à-vis du virus influenza de type A :**

- La molécule 152 (oligosaccharide) présente une activité supérieure à 50 % pour deux doses virales de 10 et de 30 CCID₅₀/50 µl, permettant d'estimer des valeurs de CI₅₀ de moins de 2,5 µg/ml. La concentration permettant d'inhiber 50 % de la réplication virale comprise entre 25 et 250 µg/ml pour une dose virale de 100 CCID₅₀/50 µl.
- Pour la molécule 80, la CI₅₀ varie de 2,5 – 25 µg/ml pour une dose virale de 10 CCID₅₀/50 µl à 25 – 250 µg/ml pour des doses virales de 30 et de 100 CCID₅₀/50 µl.
- Parmi les molécules dont l'activité persiste en présence de 100 CCID₅₀/50 µl, les molécules 157, 81, 98, 109 présentent une activité uniquement pour une concentration de 250 µg/ml quelque soit la dose virale. La molécule 33 reproduit les résultats obtenus avec la molécule 98, malgré un effet toxique, en présence de 250 µg/ml de molécule.
- Les molécules 156 et 153 présentent une CI₅₀ comprise entre 2,5 – 25 µg/ml voire 25 – 250 µg/ml vis-à-vis des deux doses virales de 10 CCID₅₀/50 µl et de 30 CCID₅₀/50 µl.
- Les molécules 141, 110, 238, 242, 79, et 107 se caractérisent par une faible activité. Seule la molécule 141 présente une CI₅₀ de 50 % à 250 µg/ml pour une dose virale de 10 CCID₅₀/50 µl. Quant aux autres molécules, une inhibition de l'ordre de 10 à 20 % est observable uniquement pour une dose virale de 10 CCID₅₀/50 µl.

- **Vis-à-vis du virus influenza de type B :**

- Neuf molécules (152, 242, 237, 238, 239, 240, 98, 33, 79) ont présenté une activité supérieure à 50 % pour tous les trois concentrations vis-à-vis des trois doses virales. Ainsi, nous pouvons estimer que leurs valeurs de CI₅₀ sont inférieures à 2,5 µg/ml.
- L'activité des deux molécules 109 et 141 est comparable à celle des molécules ci-dessus. Cependant, cette activité est diminuée à moins de 50 % à la concentration de 2,5 µg/ml vis-à-vis de la dose de 100 CCID₅₀/50 µl.

L'activité des molécules 156, 80, 153, 157, 241, 81, 110, 111, 112, 107 est diminuée graduellement en fonction des doses virales et des doses antivirales.

- **Toxicité cellulaire** : Dix molécules ont montré un effet toxique significatif sur les cellules en phase de croissance. Les molécules 33 (11 %), 98 (13 %), 81 (15 %), 109 (14 %), 112 (10 %) ont présenté un effet toxique pour une concentration d'utilisation de 250 µg/ml. Les molécules 237 (46 %, 27 %), 238 (46 %, 33 %), 239 (30 %, 22 %), 240 (26 %, 13 %), 242 (50 %, 31 %) ont présenté un effet toxique à 250 µg/ml et à 25 µg/ml.

Tableau 3.2 : Activité inhibitrice (%) des molécules de la famille des arabinogalactanes vis-à-vis du virus de type A

| Type de virus | A/Brisbane/10/2007 | | | | | | | | |
|------------------------------|--------------------|---------|----------|---------------|---------|----------|---------------|---------|----------|
| Dose virale | 100CCID50/50µl | | | 30CCID50/50µl | | | 10CCID50/50µl | | |
| Dose antivirale Molécules | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml |
| 152 | 99.3 | 33.0 | 9.8 | 100.0 | 66.3 | 52.2 | 99.9 | 84.2 | 61.2 |
| 80 | 100.0 | 21.6 | 0.0 | 100.2 | 42.5 | 0.0 | 100.2 | 74.2 | 0.0 |
| 157 | 94.2 | 0.0 | 0.0 | 89.8 | 0.0 | 0.0 | 100.0 | 11.0 | 0.0 |
| 81 | 69.1 | 9.8 | 1.5 | 81.5 | 8.0 | 0.0 | 86.7 | 9.3 | 0.0 |
| 98 | 14.4 | 0.0 | 4.3 | 51.9 | 14.7 | 10.8 | 76.8 | 15.8 | 5.8 |
| 109 | 15.1 | 0.0 | 0.0 | 29.5 | 4.7 | 0.0 | 53.0 | 0.7 | 0.0 |
| 156 | 7.8 | 0.1 | 0.0 | 65.0 | 45.5 | 19.9 | 79.6 | 70.5 | 46.1 |
| 153 | 3.9 | 0.0 | 0.0 | 49.9 | 4.5 | 0.0 | 74.8 | 25.8 | 0.0 |
| 107 | 6.1 | 0.6 | 0.4 | 12.7 | 0.0 | 0.0 | 16.8 | 0.0 | 0.0 |
| 33 | | 11.9 | 7.6 | | 32.0 | 5.5 | | 34.4 | 7.0 |
| 141 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 9.8 | 0.0 | 0.0 | 55.4 | 12.5 | 0.0 |
| 79 | 6.9 | 0.0 | 0.0 | 11.0 | 4.5 | 4.3 | 25.9 | 11.0 | 7.3 |
| 110 | 7.5 | 3.6 | 0.0 | 6.5 | 0.0 | 0.0 | 10.5 | 0.0 | 0.0 |
| 238 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 10.6 | 0.0 | 0.0 |
| 242 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 11.5 | 0.0 | 0.0 |
| 112 | 5.0 | 2.6 | 3.9 | 9.7 | 5.0 | 3.9 | 9.5 | 11.6 | 0.0 |
| 239 | 18.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 8.7 | 0.0 | 0.0 |
| 111 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 3.6 | 4.7 | 3.6 |
| 206 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 3.1 | 2.1 |
| 237 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 2.3 | 0.0 | 0.0 |
| 240 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 241 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 154 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 155 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 108 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.8 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |

 Les valeurs inhibitrices correspondent au groupe 3

 Non déterminé

 Les valeurs inhibitrices correspondent au groupe 2

 Les valeurs toxiques (≥10 %)

Tableau 3.3 : Activité inhibitrice (%) des molécules de la famille des arabinogalactanes vis-à-vis du virus de type B

| Type de virus | B/Florida/4/06 | | | | | | | | |
|------------------------------|----------------|---------|----------|---------------|---------|----------|---------------|---------|----------|
| Dose virale | 100CCID50/50µl | | | 30CCID50/50µl | | | 10CCID50/50µl | | |
| Dose antivirale Molécules | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml |
| 152 | 98.5 | 98.0 | 78.0 | 100.0 | 99.4 | 96.9 | 100.0 | 100.0 | 93.5 |
| 242 | 99.0 | 96.5 | 82.1 | 100.0 | 98.7 | 97.1 | 100.0 | 99.9 | 99.1 |
| 237 | 98.9 | 96.1 | 75.3 | 99.9 | 99.2 | 94.4 | 100.0 | 100.0 | 97.6 |
| 238 | 98.3 | 97.1 | 76.6 | 99.5 | 98.7 | 97.3 | 99.6 | 99.9 | 97.9 |
| 239 | 99.0 | 98.2 | 78.3 | 99.8 | 99.4 | 91.7 | 100.0 | 99.9 | 99.0 |
| 240 | 98.2 | 96.7 | 76.5 | 98.3 | 99.2 | 93.7 | 99.8 | 99.5 | 99.2 |
| 98 | 95.4 | 90.7 | 77.9 | 99.2 | 97.9 | 94.5 | 99.8 | 99.3 | 97.3 |
| 33 | 92.3 | 89.4 | 57.9 | 97.7 | 96.8 | 89.5 | 98.6 | 98.5 | 96.5 |
| 79 | 87.0 | 83.8 | 53.1 | 97.1 | 94.2 | 82.7 | 98.7 | 98.9 | 96.9 |
| 109 | 86.8 | 78.5 | 26.2 | 96.1 | 93.5 | 61.9 | 98.7 | 96.8 | 89.9 |
| 141 | 81.0 | 73.5 | 24.4 | 94.0 | 92.9 | 82.7 | 96.9 | 96.4 | 90.4 |
| 156 | 88.2 | 89.2 | 8.9 | 98.2 | 97.8 | 71.5 | 99.7 | 99.6 | 87.9 |
| 80 | 97.0 | 88.7 | 0.0 | 99.4 | 96.5 | 0.0 | 100.0 | 98.5 | 46.3 |
| 153 | 66.6 | 13.2 | 0.0 | 97.6 | 54.4 | 2.0 | 99.5 | 91.8 | 57.1 |
| 157 | 92.4 | 0.0 | 0.0 | 99.1 | 19.2 | 0.0 | 99.9 | 52.3 | 0.0 |
| 241 | 91.1 | 3.90 | 0.0 | 95.8 | 43.5 | 0.0 | 97.5 | 74.2 | 0.0 |
| 81 | 87.2 | 1.0 | 6.7 | 98.6 | 4.6 | 6.8 | 99.6 | 0.0 | 1.8 |
| 110 | 2.8 | 0.0 | 0.0 | 39.2 | 16.6 | 0.0 | 69.0 | 35.7 | 10.6 |
| 111 | 1.2 | 0.0 | 0.0 | 14.6 | 5.7 | 0.0 | 76.8 | 36.9 | 0.0 |
| 112 | 8.6 | 3.1 | 0.9 | 23.7 | 3.8 | 0.2 | 72.5 | 0.0 | 7.7 |
| 107 | 2.6 | 0.0 | 0.0 | 6.4 | 0.0 | 0.0 | 25.6 | 0.0 | 0.0 |
| 108 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 154 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 155 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 206 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |

 Les valeurs inhibitrices correspondent au groupe 3

 Les valeurs inhibitrices correspondent au groupe 2

 Les valeurs toxiques (≥10 %)

Note synthèse :

La relation entre l'activité antivirale, la toxicité et les propriétés des arabinogalactanes est présentée dans le schéma 3.1.

Schéma 3.1 : La relation de l'activité antivirale et des propriétés des arabinogalactanes

| Polysaccharides | | Polysaccharides séparés | | Oligosaccharides |
|-----------------|---|--------------------------|---|----------------------|
| | | | | |
| | | <u>79</u> (>2000 kDa) | | |
| | | <u>80</u> (100-2000 kDa) | | |
| <u>33, 98</u> | → | <u>81</u> (<100 kDa) | | |
| | | <u>156</u> (>300 kDa) | | 108 (<3 kDa) |
| | | <u>157</u> (<300 kDa) | | <u>107</u> (>3 kDa) |
| | | | | <u>152</u> (>10 kDa) |
| <u>109</u> | → | | → | <u>153</u> (>10 kDa) |
| | | | | 154 (>10 kDa) |
| | | | | 155 (>10 kDa) |
| <u>237</u> | | | | |
| <u>238</u> | | | | <u>110</u> (>10 kDa) |
| <u>239</u> | | <u>141</u> | → | <u>111</u> (3-4 kDa) |
| 206 | | | | <u>112</u> (<3 kDa) |
| | | <u>240</u> (>2000 kDa) | | |
| | | <u>241</u> (<2000 kDa) | | |
| | | <u>242</u> (>2000 kDa) | | |

Les molécules actives vis-à-vis du virus B sont en vert ; Les molécules actives vis-à-vis des deux virus sont en rose ; Les molécules soulignées sont toxiques (≥10 %).

- Le virus de type B est plus sensible aux molécules testées que le virus de type A.
- Parmi les 21 molécules actives vis-à-vis du virus B, seules 15 ont également une activité inhibitrice vis-à-vis du virus A.
- Les polysaccharides 33 et 98 présentent une activité inhibitrice vis-à-vis des deux souches. Il est à noter que la molécule 98 correspond à un nouveau lot et montre la robustesse d'obtention de ce polysaccharide. Les molécules dérivées par séparation mécanique des molécules 33 et 98 présentent une efficacité accrue vis-à-vis du type A, mais inférieure vis-à-vis du virus B à l'exception de la molécule 79 qui possède un haute poids moléculaire de plus de 2000 kDa.

- Les oligosaccharides 110, 111, 112 qui dérivent de la molécule 141, se caractérisent par une « perte » d'activité ou une activité diminuée, particulièrement pour les oligosaccharides de faible taille, < 3kDa (112) et 3 – 4 kDa (111).
- Le fractionnement des oligosaccharides issus du polysaccharide 109, dont l'activité est faible a permis l'obtention de 6 oligosaccharides. Parmi ces 6 oligosaccharides, les molécules 152, 153 présentent une forte activité inhibitrice.
- Parmi les molécules respectant les critères de sélection, les molécules suivantes ont été choisies comme les candidats de cette famille de sucres :
 - Vis-à-vis du virus de type A : **152, 80, 157**
 - Vis-à-vis du virus de type B : **152, 79, 141, 98** (moins de 25 µg/ml)
 - Vis-à-vis de deux virus : **152, 80, 157**

III.1.2. Les fucanes

Vingt-huit molécules de la famille des fucanes ont été extraites de quatre espèces de l'algue brune : *Ascophillum nosodium*, *Fucus vesiculosus*, *Durvillea antarctica*, *Chorda filum*.

Parmi les molécules :

- Vingt molécules sont des polysaccharides, 3 molécules sont des polysaccharides séparés (119, 120, 121), 2 molécules sont des oligosaccharides (218, 219), 3 molécules sont des oligosaccharides purifiés (214, 215, 216).
- Les polysaccharides 21, 22, et 55 sont issus du même procédé d'extraction.
- Les polysaccharides séparés (119, 120, 121) et l'oligosaccharide 218 sont issus de la molécule 105.
- Les oligosaccharides 214, 215, 216 sont issus de la molécule 148.

L'activité de ces 28 molécules vis-à-vis des deux virus d'épreuve est rapportée dans les **tableaux 3.4 et 3.5**.

- **Vis-à-vis du virus de type A :**
 - Parmi les sucres issus de l'espèce d'*A. nosodium*, le virus A est sensible à la molécule 212 pour les 3 doses virales testées. La dernière concentration

active avec 30 et 100 CCID₅₀/50 µl est de 25 µg/ml tandis qu'elle diminue à 2,5 µg/ml avec 10 CCID₅₀/50 µl.

Bien qu'issus du polysaccharide 105 qui ne présente pas d'activité, la molécule 218 présente une CI₅₀ comprise entre 25 et 250 µg/ml vis-à-vis des 3 doses virales.

- Le virus de type A est sensible à l'ensemble des molécules de l'espèce *F. vesiculosus*, à l'exception de la molécule 209. Les molécules d'intérêts sont au nombre de 5 (208, 22, 21, 149, 219). Une action inhibitrice est observée jusqu'à une concentration de 25 µg/ml voire 2,5 µg/ml pour la molécule 149 en présence de 10 CCID₅₀/50 µl. Cependant, l'augmentation de la dose virale réduit l'efficacité des autres molécules à une concentration de 250 µg/ml à l'exception de la molécule 208, dont l'activité observable à 25 µg/ml quelle que soit la dose virale utilisée.
- Pour les molécules de l'espèce de *D. antartica*, seules deux molécules 103 et 217 ont montré un effet inhibiteur pour une concentration à 250 µg/ml vis-à-vis des trois doses virales.
- Les molécules extraites de l'espèce de *C. filum* n'ont aucune activité vis-à-vis de ce virus.
- **Vis-à-vis du virus de type B :**
 - Pour les molécules de l'espèce d'*A. nosodium*, 4 molécules (212, 105, 213, 218) ont présenté une activité correspondante au groupe 3 vis-à-vis des trois doses virales. L'activité de la molécule 212 est la plus efficace, ses valeurs de CI₅₀ sont environ à 2,5 µg/ml sur deux doses de 30 et de 10 CCID₅₀/50 µl. Pourtant elle perd son effet à 2,5 µg/ml vis-à-vis de la dose de 100 CCID₅₀/50 µl. Pour les molécules 105 et 213, une concentration de 2,5 – 25 µg/ml est nécessaire afin de réduire 50 % de la réplication virale. La molécule 218 est la moins efficace vis-à-vis des deux doses de 100 CCID₅₀/50 µl et de 30 CCID₅₀/50 µl.
 - Toutes les molécules de l'espèce de *F. vesiculosus* ont présenté une activité inhibitrice vis-à-vis de la souche de type B. L'activité des molécules 149, 208, 150, 209, et 21 est efficace jusqu'à 25 µg/ml pour la dose de 100 CCID₅₀/50 µl, et jusqu'à 2,5 µg/ml pour les doses de 30 CCID₅₀/50 µl et de 10 CCID₅₀/50 µl. Bien que l'activité de la molécule 55 soit moins

efficace pour une concentration à 250 µg/ml sur la dose de 100 CCID50/50 µl, sa valeur de CI50 est égale à celle de la molécule 208. L'activité des molécules 150, 209, 21 est observable entre 25 et 250 µg/ml pour la dose de 100 CCID50/50 µl. A la suite de ces dernières, les molécules 22 et 219 perdent graduellement leur activité à 25 µg/ml et à 2,5 µg/ml pour la dose de 100 CCID50/50 µl et de 30 CCID50/50 µl.

- Pour l'espèce de *D. antartica*, la molécule 103 a montré une capacité inhibitrice supérieure à 50 % à 250 µg/ml vis-à-vis des trois doses virales. De plus, son activité est persistante à 25 µg/ml pour la dose de 30 CCID50/50 µl et jusqu'à 2,5 µg/ml pour la dose de 10 CCID50/50 µl. L'activité des autres molécules 116, 117, 118 est réduite, cependant la molécule 117 est encore efficace jusqu'à 2,5 µg/ml sur la dose de 10 CCID50/50 µl.
- Pour les molécules actives de l'espèce de *C. filum*, la molécule 210 possèdent des valeurs de CI50 comprises entre 250 µg/ml (100 CCID50/50 µl), 25 µg/ml (30 CCID50/50 µl), et 2,5 µg/ml (10 CCID50/50 µl). L'activité des molécules 90, 91, 211, et 148 est moins efficace vis-à-vis des deux doses virales de 100 CCID50/50 µl et de 30 CCID50/50 µl. Toutes ces dernières ont présenté une activité de plus de 50 % pour toutes les concentrations vis-à-vis de la dose virale de 10 CCID50/50 µl.
- **Toxicité cellulaire** : la molécule 91 présente un effet toxique significatif (13 %) sur les cellules en phase de croissance à 250 µg/ml

Tableau 3.4 : Activité inhibitrice (%) des molécules de la famille des fucanes vis-à-vis du virus de type A

| Source | Type de virus | A/Brisbane/10/2007 | | | | | | | | |
|----------------------------|------------------------------|--------------------|---------|----------|---------------|---------|----------|---------------|---------|----------|
| | Dose virale | 100CCID50/50µl | | | 30CCID50/50µl | | | 10CCID50/50µl | | |
| | Dose antivirale Molécules | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml |
| <i>Ascophillum nodosum</i> | 212 | 87.4 | 69.0 | 0.0 | 99.7 | 99.1 | 0.0 | 99.9 | 94.7 | 12.9 |
| | 218 | 60.2 | 0.0 | 0.0 | 82.9 | 0.0 | 0.0 | 91.3 | 25.3 | 13.5 |
| | 213 | 84.9 | 0.0 | 0.0 | 96.5 | 0.0 | 0.0 | 99.7 | 7.6 | 0.0 |
| | 119 | 5.7 | 0.8 | 0.0 | 0.0 | 2.7 | 0.0 | 18.5 | 6.6 | 0.0 |
| | 105 | 6.5 | 0.0 | 0.0 | 12.3 | 0.0 | 0.0 | 6.3 | 0.0 | 0.0 |
| | 120 | 2.6 | 2.9 | 2.2 | 3.6 | 4.0 | 1.6 | 8.4 | 12.6 | 6.7 |
| | 121 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |

| | | | | | | | | | | |
|----------------------|-----|------|------|-----|-------|------|-----|-------|------|------|
| Fucus vesiculosus | 208 | 91.9 | 31.4 | 0.0 | 98.7 | 67.7 | 0.0 | 99.9 | 71.1 | 5.6 |
| | 22 | 50.3 | 2.2 | 0.0 | 81.6 | 4.6 | 0.0 | 93.2 | 12.4 | 0.0 |
| | 21 | 94.3 | 4.6 | 0.0 | 98.1 | 3.3 | 0.5 | 98.4 | 0.0 | 0.0 |
| | 149 | 10.8 | 0.0 | 0.0 | 58.9 | 4.0 | 1.8 | 73.3 | 42.0 | 13.6 |
| | 219 | 36.6 | 0.0 | 0.0 | 47.2 | 0.0 | 0.0 | 67.2 | 20.7 | 0.0 |
| | 55 | 3.2 | 0.0 | 0.0 | 26.5 | 4.2 | 0.0 | 39.9 | 22.0 | 0.0 |
| | 150 | 11.0 | 1.5 | 0.0 | 11.9 | 2.9 | 3.3 | 29.6 | 6.9 | 31.1 |
| | 209 | 0.00 | 0.0 | 0.0 | 2.21 | 0.0 | 0.0 | 10.1 | 5.8 | 0.0 |
| Durvillea antarctica | 103 | 99.0 | 0.9 | 3.8 | 100.0 | 2.5 | 0.0 | 100.0 | 7.3 | 3.6 |
| | 217 | 40.2 | 0.0 | 0.0 | 64.5 | 0.0 | 0.0 | 79.4 | 0.00 | 1.10 |
| | 116 | 2.6 | 0.0 | 1.6 | 3.7 | 0.0 | 2.6 | 3.4 | 10.2 | 0.0 |
| | 117 | 2.3 | 0.0 | 0.0 | 6.9 | 0.6 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 118 | 8.7 | 1.7 | 3.3 | 0.8 | 0.1 | 0.0 | 15.2 | 1.9 | 0.0 |
| Chorda filum | 90 | 3.0 | 0.0 | 0.3 | 0.0 | 0.4 | 0.0 | 0.0 | 4.0 | 0.0 |
| | 91 | 1.8 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 5.6 | 0.0 |
| | 148 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 2.8 | 6.6 | 3.3 |
| | 210 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 9.3 | 5.9 | 2.9 |
| | 211 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 214 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 215 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 2.9 | 4.4 | 0.0 |
| | 216 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |

 Les valeurs inhibitrices correspondent au groupe 3

 Les valeurs inhibitrices correspondent au groupe 2

 Les valeurs toxiques ($\geq 10\%$)

Tableau 3.5 : Activité inhibitrice (%) des molécules de la famille des fucanes vis-à-vis du virus de type B

| Source | Type de virus | B/Florida/4/06 | | | | | | | | |
|----------------------|-----------------|----------------|---------|----------|---------------|---------|----------|---------------|---------|----------|
| | Dose virale | 100CCID50/50µl | | | 30CCID50/50µl | | | 10CCID50/50µl | | |
| | Dose antivirale | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml |
| | Molécules | | | | | | | | | |
| Ascophillum nodosum | 212 | 96.6 | 62.3 | 0.0 | 99.8 | 93.3 | 46.9 | 99.9 | 95.3 | 66.0 |
| | 105 | 82.9 | 50.6 | 0.0 | 97.4 | 80.7 | 0.0 | 98.6 | 94.3 | 15.1 |
| | 213 | 92.9 | 64.9 | 0.0 | 99.4 | 87.9 | 10.1 | 99.8 | 86.4 | 5.0 |
| | 218 | 41.0 | 0.0 | 0.0 | 94.2 | 17.2 | 0.0 | 97.7 | 54.4 | 0.0 |
| | 119 | 0.0 | 0.0 | 5.6 | 0.4 | 3.6 | 3.1 | 7.8 | 0.0 | 5.9 |
| | 120 | 4.4 | 7.6 | 5.1 | 0.4 | 2.6 | 4.4 | 3.6 | 0.0 | 3.1 |
| | 121 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 7.2 | 0.0 | 0.0 |
| Fucus vesiculosus | 149 | 92.4 | 61.6 | 1.3 | 99.6 | 75.7 | 52.6 | 100.0 | 95.2 | 70.8 |
| | 208 | 93.2 | 50.1 | 0.0 | 99.0 | 85.0 | 18.1 | 100.0 | 91.7 | 39.2 |
| | 55 | 74.0 | 47.0 | 14.9 | 94.5 | 83.4 | 60.5 | 97.7 | 91.9 | 72.5 |
| | 150 | 74.6 | 30.1 | 0.0 | 98.2 | 64.2 | 40.7 | 98.3 | 90.0 | 68.1 |
| | 209 | 75.7 | 39.4 | 0.0 | 97.5 | 65.9 | 12.9 | 99.4 | 93.7 | 35.2 |
| | 21 | 98.9 | 14.0 | 0.0 | 99.0 | 42.3 | 18.1 | 99.0 | 74.0 | 69.4 |
| | 22 | 43.6 | 7.7 | 0.0 | 87.0 | 32.7 | 2.2 | 80.0 | 70.7 | 27.8 |
| | 219 | 34.2 | 0.0 | 0.0 | 75.8 | 20.0 | 0.0 | 89.0 | 66.7 | 24.1 |
| Durvillea antarctica | 103 | 91.0 | 0.4 | 0.0 | 99.4 | 20.7 | 0.0 | 99.6 | 57.0 | 20.8 |
| | 116 | 25.7 | 0.0 | 1.3 | 67.7 | 0.0 | 5.5 | 87.4 | 0.0 | 0.0 |

| | | | | | | | | | | |
|--------------|-----|------|------|-----|------|------|------|------|------|------|
| | 117 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 32.4 | 27.9 | 0.0 | 87.8 | 37.6 | 11.3 |
| | 118 | 1.3 | 0.0 | 8.9 | 5.6 | 0.3 | 7.1 | 16.9 | 0.0 | 1.1 |
| | 217 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 5.8 | 0.0 | 0.0 |
| Chorda filum | 210 | 67.8 | 0.0 | 0.0 | 96.8 | 45.8 | 22.4 | 99.5 | 72.6 | 55.4 |
| | 90 | 25.1 | 23.3 | 1.1 | 72.5 | 59.7 | 35.7 | 87.0 | 93.2 | 63.7 |
| | 91 | 20.7 | 13.9 | 0.0 | 39.9 | 31.1 | 13.3 | 84.8 | 71.4 | 51.6 |
| | 211 | 3.4 | 3.0 | 0.0 | 50.5 | 37.9 | 45.9 | 74.4 | 67.3 | 69.7 |
| | 148 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 17.4 | 39.2 | 40.8 | 53.2 | 58.0 | 65.9 |
| | 214 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 36.1 | 18.0 | 29.6 |
| | 215 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 4.3 | 0.0 |
| | 216 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |

 Les valeurs inhibitrices correspondent au groupe 3

 Les valeurs inhibitrices correspondent au groupe 2

 Les valeurs toxiques ($\geq 10\%$)

Note synthèse :

La relation entre l'activité antivirale, la toxicité et les propriétés des molécules est présentée dans le **schéma 3.2**.

- Les molécules actives se répartissent parmi les 4 espèces d'algues utilisées.
- Le virus de type B est plus sensible aux molécules testées que le virus de type A.
- Les molécules possédant une capacité d'inhibition aussi bien vis-à-vis de la souche de type A que de type B sont au nombre de 11. Elles se répartissent au sein des espèces, *A. nosodium*, *F. vesiculosus*, *D. antartica*.
- Aucune des molécules issues de *C. filum* n'exerce une activité vis-à-vis du virus A.
- L'essai de robustesse de la procédure d'extraction montre un résultat homogène, parmi les 3 molécules issues d'une même procédure : 21, 22, 55.
- Les procédures de séparation (119, 120, 121) ou d'hydrolyse (218) n'ont pas permis d'isoler un principe plus actif que la molécule 105, polysaccharide d'origine. Il en est de même pour les oligosaccharides issus de la molécule 148. Cependant, dans le cas du virus A, l'oligosaccharide 218 présente une activité inhibitrice alors que la molécule 105 n'a aucune activité. Pour les oligosaccharides d'origine de la molécule 148, leurs activités sont diminuées partiellement ou complètement vis-à-vis de la souche virale de type B.
- En tenant compte de l'activité inhibitrice et de l'effet toxique, les molécules suivantes ont été choisies comme les candidats de cette famille de sucres :

- Vis-à-vis du virus de type A : **212, 208, 103, 149**
- Vis-à-vis du virus de type B : **212, 149, 55, 103, 210**
- Vis-à-vis des deux virus : **212, 103, 149**

Schéma 3.2 : La relation de l'activité antivirale et des propriétés des fucanes

| | Polysaccharides | Polysaccharides séparés | Oligosaccharides | Oligosaccharides purifiés |
|-----------------------|-----------------------|-------------------------|----------------------|---------------------------|
| <i>A. nodosum</i> | 105 | | 218 (>10 kDa) | |
| | | 119 (>10 kDa) | | |
| | 212 | 120 (3-10 kDa) | | |
| | 213 | 121 (<3 kDa) | | |
| <i>F. vesiculosus</i> | 21, 22, 55 | | 219 (>10 kDa) | |
| | 149 | | | |
| | 150 | | | |
| | 208 | | | |
| <i>D. antarctica</i> | 103 | | | |
| | 116 (>10 kDa) | | | |
| | 117 (3-10 kDa) | | | |
| | 118 (<3 kDa) | | | |
| | 217 (>10 kDa) | | | |
| <i>C. filum</i> | 148 | | | 214 (>10 kDa) |
| | 90 | | | 215 (>10 kDa) |
| | 91 | | | 216 (3-10 kDa) |
| | 210 | | | |

Les molécules actives vis-à-vis du virus A sont en jaune ; Les molécules actives vis-à-vis du virus B sont en vert ; Les molécules actives vis-à-vis des deux virus sont en rose ; Les molécules soulignées sont toxiques ($\geq 10\%$).

III.1.3. Les galactofucanes

Sept molécules de la famille des galactofucanes ont été extraites de l'algue brune *Undaria pinnatifida*. Parmi ces molécules, les molécules 20, 54, 151 sont des polysaccharides issus du même procédé d'extraction. Les oligosaccharides 113, 114, 115 sont issus de la fragmentation du quatrième polysaccharide, 140.

L'activité de ces 7 molécules vis-à-vis des deux souches virales de type A et de type B est présentée dans les **tableaux 3.6** et **3.7**.

- La reproduction des résultats obtenus avec la molécule 20, avec les molécules 54 et 151 montre la robustesse de la technique d'extraction employée. Les valeurs CI50 nécessaires à inhiber 50 % de la réplication du virus B varient de moins de 2,5 µg/ml de 2,5 – 25 µg/ml voire de 25 – 250 µg/ml en fonction de la dose virale. Vis-à-vis du virus A, une concentration plus haute, voire supérieure à 250 µg/ml en fonction de la dose virale utilisée, est nécessaire pour l'obtention d'une inhibition de 50 % de réplication virale. L'activité des molécules 54 et 20 est généralement moins forte que celle de la molécule 151.
- Les oligosaccharides 113, 114, 115 hydrolysés à partir de la molécule 140 ont permis l'obtention d'une activité antivirale pour ces derniers vis-à-vis du virus A. Cependant, cette activité est faible, seulement 10 à 30 % pour une concentration de 250 µg/ml vis-à-vis des doses virales de 10 CCID50/50 µl et de 30 CCID50/50 µl. Vis-à-vis du virus B, une valeur de CI50 comprise entre moins de 2,5 µg/ml voire entre 25 et 250 µg/ml en fonction de la dose virale a été obtenue pour le polysaccharide 140. Les oligosaccharides issus de ce polysaccharide présentent une activité diminuée (113 et 115) ou une perte d'activité (114).

Toxicité cellulaire : Aucune molécule n'a montré un effet toxique de plus de 10 % sur les cellules.

Tableau 3.6 : : Activité inhibitrice (%) des molécules de la famille des galactofucanes vis-à-vis du virus de type A

| Type de virus | A/Brisbane/10/2007 | | | | | | | | |
|------------------------------|--------------------|---------|----------|---------------|---------|----------|---------------|---------|----------|
| Dose virale | 100CCID50/50µl | | | 30CCID50/50µl | | | 10CCID50/50µl | | |
| Dose antivirale Molécules | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml |
| 151 | 99.8 | 1.6 | 0.0 | 100.0 | 65.7 | 0.0 | 100.0 | 63.4 | 5.9 |
| 20 | 23.4 | 1.2 | 0.6 | 59.4 | 6.1 | 2.3 | 80.2 | 43.7 | 3.0 |

| | | | | | | | | | |
|-----|------|-----|-----|------|------|-----|------|------|------|
| 54 | 14.3 | 5.4 | 2.2 | 25.9 | 11.9 | 2.0 | 82.2 | 22.9 | 23.8 |
| 115 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 18.9 | 0.2 | 0.0 | 34.6 | 7.8 | 3.5 |
| 113 | 7.9 | 0.0 | 5.2 | 12.0 | 0.8 | 7.0 | 20.0 | 8.1 | 12.8 |
| 114 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 3.2 | 0.0 | 0.0 | 11.9 | 0.0 | 0.0 |
| 140 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 3.9 | 0.0 | 0.0 |

Tableau 3.7 : Activité inhibitrice (%) des molécules de la famille des galactofucanes vis-à-vis du virus de type B

| Type de virus | B/Florida/4/06 | | | | | | | | |
|------------------------------|----------------|---------|----------|---------------|---------|----------|---------------|---------|----------|
| Dose virale | 100CCID50/50µl | | | 30CCID50/50µl | | | 10CCID50/50µl | | |
| Dose antivirale Molécules | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml |
| 151 | 98.4 | 57.4 | 0.0 | 100.0 | 94.7 | 33.9 | 100.0 | 98.5 | 80.6 |
| 54 | 78.8 | 25.8 | 5.6 | 95.3 | 66.1 | 8.4 | 98.1 | 78.8 | 34.0 |
| 20 | 51.7 | 1.0 | 0.0 | 94.1 | 28.2 | 0.0 | 94.1 | 55.0 | 29.4 |
| 140 | 40.4 | 0.0 | 0.0 | 83.9 | 0.0 | 0.0 | 97.9 | 33.0 | 17.2 |
| 113 | 84.0 | 0.0 | 14.7 | 95.1 | 0.0 | 3.2 | 99.3 | 0.0 | 2.5 |
| 115 | 65.9 | 0.0 | 9.2 | 82.8 | 0.0 | 2.1 | 94.9 | 6.9 | 0.0 |
| 114 | 9.0 | 8.8 | 4.6 | 0.0 | 6.8 | 2.5 | 4.0 | 0.0 | 0.0 |

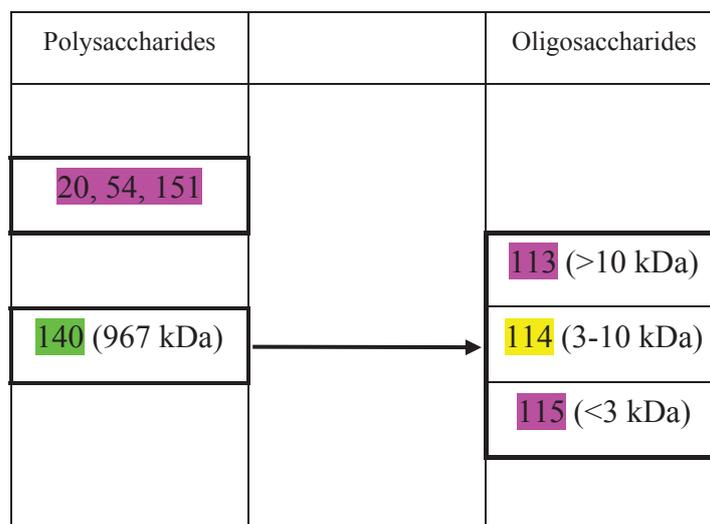
Les valeurs inhibitrices correspondent au groupe 3

Les valeurs inhibitrices correspondent au groupe 2

Note de synthèse :

La relation entre l'activité antivirale, la toxicité et les propriétés des molécules est présentée dans le schéma 3.3.

Schéma 3.3 : La relation de l'activité antivirale et des propriétés des galactofucanes



Les molécules actives vis-à-vis du virus A sont en jaune ; Les molécules actives vis-à-vis du virus B sont en vert ; Les molécules actives vis-à-vis des deux virus sont en rose.

- La souche de type B est plus sensible aux molécules testées que la souche de type A.
- Les molécules possédant une activité simultanée vis-à-vis des deux souches de type A et de type B sont au nombre de 5, et correspondent aux molécules 151, 20, 54, 115, 113.
- Parmi les trois molécules extraites de la même procédure (20, 54 et 151), les molécules 20 et 54 présentent une activité moins efficace que celle de la molécule 151 vis-à-vis des deux souches virales.
- Les oligosaccharides obtenus par séparation du polysaccharide 140 ont montré une activité moyenne vis-à-vis de la souche de type A, tandis qu'une perte d'activité comparativement à la molécule d'origine 140 a été observée vis-à-vis du virus de type B.
- Les molécules suivantes ont été choisies comme les candidats de cette famille de sucres :
 - Vis-à-vis du virus de type A : **151**
 - Vis-à-vis du virus de type B : **151, 140**
 - Vis-à-vis des deux virus : **151**

III.1.4. Les hétéroglycanes sulfatés

Six molécules de la famille des hétéroglycanes sulfatés ont été extraites de la plante aquatique, *Caulerpa racemosa*. Parmi ces molécules, 4 molécules sont des polysaccharides (32, 162, 233, 234), 2 molécules sont des oligosaccharides (235, 236) issus de la molécule 162.

L'activité de ces 6 molécules vis-à-vis des deux souches virales de type A et de type B est présentée dans les **tableaux 3.8** et **3.9**.

- Le polysaccharide 162 est le seul à présenter une action vis-à-vis du virus A. Cependant, une concentration comprise entre 2,5 et 250 µg/ml est nécessaire pour neutraliser la réplication virale à faible dose (10 CCID₅₀/50 µl). L'augmentation de la quantité virale réduit la capacité d'inhibition de la molécule.

- Le virus de type B est sensible vis-à-vis des polysaccharides 233, 234, 235 avec une CI50 inférieure à 2,5 µg/ml quelle que soit la concentration en virus utilisée. L'activité de la molécule 162 diminue graduellement en fonction de la dose virale, dont la valeur de CI50 est comprise entre 2,5 – 25 µg/ml et 25 – 250 µg/ml. Les molécules 236 et 32 présentent une faible activité de l'ordre de 10 à 20 % uniquement à 250 µg/ml pour la dose virale de 10 CCID50/50 µl.
- Concernant la toxicité cellulaire, deux molécules ont montré un effet toxique significatif à 250 µg/ml sur les cellules en phase de croissance : 233 (16 %) et 234 (21 %)

Tableau 3.8 : Activité inhibitrice (%) des molécules de la famille des hétéroglycanes sulfatés vis-à-vis du virus de type A

| Type de virus | A/Brisbane/10/2007 | | | | | | | | |
|------------------------------|--------------------|---------|----------|---------------|---------|----------|---------------|---------|----------|
| Dose virale | 100CCID50/50µl | | | 30CCID50/50µl | | | 10CCID50/50µl | | |
| Dose antivirale Molécules | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml |
| 162 | 2.0 | 18.8 | 0.0 | 46.1 | 46.7 | 20.7 | 72.1 | 73.2 | 16.4 |
| 233 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 234 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 235 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 236 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 32 | | 0.0 | 0.0 | | 1.0 | 0.0 | | 4.4 | 0.1 |

 Les valeurs inhibitrices correspondent au groupe 3

 Non déterminé

 Les valeurs inhibitrices correspondent au groupe 2

 Les valeurs toxiques (≥ 10 %)

Tableau 3.9 : Activité inhibitrice (%) des molécules de la famille des hétéroglycanes sulfatés vis-à-vis du virus de type B

| Type de virus | B/Florida/4/06 | | | | | | | | |
|------------------------------|----------------|---------|----------|---------------|---------|----------|---------------|---------|----------|
| Dose virale | 100CCID50/50µl | | | 30CCID50/50µl | | | 10CCID50/50µl | | |
| Dose antivirale Molécules | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml |
| 233 | 98.2 | 98.1 | 75.9 | 99.6 | 99.6 | 96.8 | 99.8 | 99.8 | 95.6 |
| 234 | 93.6 | 93.1 | 55.9 | 99.1 | 98.7 | 85.9 | 99.8 | 99.0 | 87.5 |
| 235 | 97.1 | 93.9 | 58.0 | 99.5 | 97.7 | 91.3 | 100.0 | 99.9 | 96.2 |
| 162 | 60.0 | 5.0 | 0.5 | 82.3 | 41.0 | 0.0 | 93.7 | 72.1 | 5.7 |
| 236 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 17.9 | 0.0 | 0.0 |
| 32 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 23.6 | 0.0 | 0.0 |

 Les valeurs inhibitrices correspondent au groupe 3

 Les valeurs inhibitrices correspondent au groupe 2

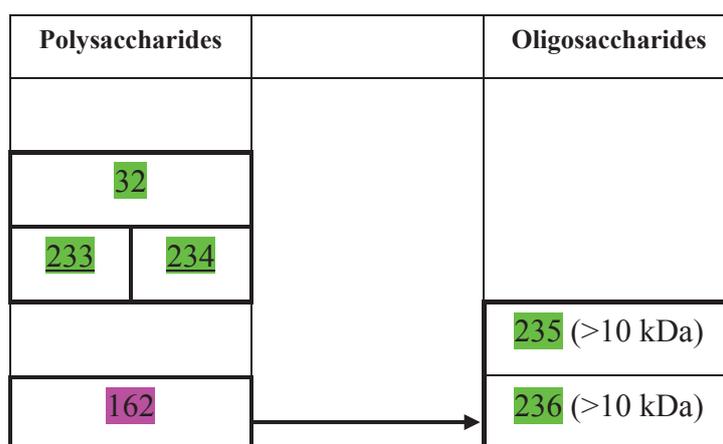
 Les valeurs toxiques (≥ 10 %)

Note de synthèse :

La relation entre l'activité antivirale, la toxicité et les propriétés des molécules est présentée dans le **schéma 3.4**.

- La souche de type B est plus sensible aux hétéroglycanes sulfatés que la souche de type A.
- La molécule 162 est la seule possédant une capacité d'inhibition aussi bien vis-à-vis des deux souches de type A et de type B.
- Deux oligosaccharides 235 et 236 issus de la molécule 162 perdent l'activité observée de la molécule parentale vis-à-vis de la souche de type A. Cependant, vis-à-vis de la souche de type B, l'activité de l'oligosaccharide 235 est plus élevée que celle du polysaccharide 162, tandis que l'activité du oligosaccharide 236 est inférieure.
- En combinaison avec la toxicité, les molécules suivantes ont été choisies comme les candidats de cette famille de sucres :
 - Vis-à-vis du virus de type A : **162**
 - Vis-à-vis du virus de type B : **235, 233** (moins de 25 µg/ml)
 - Vis-à-vis des deux virus : **162**

Schéma 3.4 : La relation de l'activité antivirale et des propriétés des hétéroglycanes sulfatés



Les molécules actives vis-à-vis du virus B sont en vert ; Les molécules actives vis-à-vis des deux virus sont en rose ; Les molécules soulignées sont toxiques ($\geq 10\%$).

III.1.5. Les spirulanes

Huit molécules de la famille des spirulanes ont été extraites des cyanobactéries, *Spirulina platensis*. Toutes ces molécules sont des polysaccharides séparés.

L'activité de ces 8 molécules vis-à-vis des deux souches virales de type A et de type B est présentée aux **tableaux 3.10** et **3.11**.

- Vis-à-vis du virus de type A, ces polysaccharides ne présentent aucune activité supérieure à 50 %, quelle que soit la dose virale employée.
- Bien que l'on observe une inhibition plus de 50 % vis-à-vis du virus B cette concentration se limite à 250 µg/ml.
- Concernant la toxicité cellulaire, 5 molécules ont montré un effet toxique significatif à 250 µg/ml sur les cellules en phase de croissance : 86 (48 %), 87 (30 %), 88 (10 %), 89 (30 %), 124 (13 %).

Note de synthèse :

- Globalement, les molécules testées ont montré une plus forte activité inhibitrice vis-à-vis de la souche de type B que de la souche de type A.
- Les molécules 89, 86, 87, 88 possèdent une action double vis-à-vis des deux souches de type A et de type B.
- En tenant compte des différentes activités inhibitrices et de la toxicité, les molécules suivantes ont été choisies comme les candidats de cette famille de sucres
 - Vis-à-vis du virus de type A : **aucune molécule**
 - Vis-à-vis du virus de type B : **122**
 - Vis-à-vis des deux virus : **aucune molécule**

Tableau 3.10 : Activité inhibitrice (%) des molécules de la famille des spirulanes vis-à-vis du virus de type A

| Type de virus | A/Brisbane/10/2007 | | | | | | | | |
|------------------------------|--------------------|---------|----------|---------------|---------|----------|---------------|---------|----------|
| Dose virale | 100CCID50/50µl | | | 30CCID50/50µl | | | 10CCID50/50µl | | |
| Dose antivirale Molécules | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml |
| 89 | 22.0 | 2.8 | 0.0 | 24.6 | 4.0 | 0.0 | 27.4 | 9.3 | 0.0 |
| 86 | 13.5 | 2.9 | 0.0 | 14.8 | 2.8 | 0.0 | 27.3 | 5.7 | 0.3 |
| 87 | 8.3 | 0.0 | 0.0 | 18.7 | 0.0 | 0.0 | 28.6 | 0.0 | 1.1 |

| | | | | | | | | | |
|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|
| 88 | 10.1 | 0.0 | 0.0 | 16.5 | 0.0 | 0.0 | 28.2 | 0.0 | 0.0 |
| 122 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 123 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 124 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 125 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |

Tableau 3.11 : Activité inhibitrice (%) des molécules de la famille des spirulanes vis-à-vis du virus de type B

| Type de virus | B/Florida/4/06 | | | | | | | | | |
|---------------|-----------------|----------|---------|---------------|----------|---------|---------------|----------|---------|----------|
| | 100CCID50/50µl | | | 30CCID50/50µl | | | 10CCID50/50µl | | | |
| | Dose antivirale | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml |
| Molécules | | | | | | | | | | |
| 122 | 45.4 | 0.0 | 0.0 | 85.9 | 1.3 | 0.0 | 86.6 | 48.6 | 0.0 | |
| 89 | 41.6 | 0.0 | 0.0 | 95.0 | 0.0 | 1.9 | 94.7 | 42.6 | 0.0 | |
| 88 | 49.4 | 0.0 | 0.0 | 79.6 | 0.0 | 0.0 | 94.2 | 0.0 | 0.0 | |
| 86 | 47.6 | 4.2 | 0.0 | 73.2 | 4.0 | 0.0 | 91.4 | 3.0 | 0.0 | |
| 87 | 29.2 | 0.0 | 3.2 | 63.4 | 0.0 | 0.0 | 89.6 | 1.9 | 1.5 | |
| 124 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 13.9 | 0.0 | 0.0 | 79.9 | 32.0 | 0.0 | |
| 125 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 31.9 | 0.0 | 0.0 | |
| 123 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 14.9 | 0.0 | 0.0 | |

Les valeurs inhibitrices correspondent au groupe 3

Les valeurs inhibitrices correspondent au groupe 2

Les valeurs toxiques (≥ 10 %)

III.1.6. Les carraghénanes – les xylanes sulfatés – les xylomannanes sulfatés – les ulvanes

L'activité de ces molécules est présentée aux **tableaux 3.12** et **3.13**

- **Les carraghénanes**

- Trois polysaccharides de la famille des carraghénanes (164, 165, 166) d'origine de l'algue rouge d'*Agardhiella tenera* ont été extraits.
- Ces molécules présentent une activité neutralisante vis-à-vis du virus B, dont la CI50 est encore comprise entre 25 et 250 µg/ml pour la dose virale de 100 CCID50/50 µl.
- Seul le polysaccharide 165 présente une faible activité vis-à-vis du virus A puisque ce dernier est neutralisé en présence de 25 à 250 µg/ml uniquement pour la dose virale de 10 CCID50/50 µl.

- Des effets toxiques très faibles (< 5 %) sont observés pour ces trois molécules.
- Pour la sélectionner des molécules représentatives :
 - Vis-à-vis du virus de type A : **165**
 - Vis-à-vis du virus de type B : **166**
 - Vis-à-vis des deux virus : **165**

- **Les xylanes sulfatés**

Deux polysaccharides de la famille des xylanes sulfatés (96, 97) ont été extraits de l'algue rouge, *Palmaria palmata*. Outre leur capacité inhibitrice vis-à-vis des deux souches virales, ces deux molécules présentent un effet toxique significatif à 250 µg/ml sur les cellules en phase de croissance. En effet, il s'agit de 24 % pour la molécule 96 et 21 % pour la molécule 97. En raison de cette forte toxicité, nous n'avons pas poursuivi l'étude de tels composés.

- **Les xylomannanes sulfatés**

- Un polysaccharide de la famille des xylomannanes (167) a été extrait en utilisant une espèce de l'algue rouge, *Nothogenia fastigiata*, comme matière première.
- Cette molécule présente une activité uniquement vis-à-vis du virus B. La concentration entre 25 et 250 µg/ml est nécessaire pour inhiber 50 % de la réplication virale.
- La faible toxicité observée avec ce polysaccharide permet de conserver la molécule **167** comme candidat vis-à-vis du virus B.

- **Les ulvanes**

- Vingt-trois molécules de la famille des ulvanes ont été extraites. L'espèce *Ulva armoricana* de l'algue verte est utilisée principalement pour l'extraction des molécules, sauf pour la molécule 144 qui obtenue à partir de

l'espèce *Enteromorpha intestinalis*. Ce groupe comporte des polysaccharides, des polysaccharides séparés, et des oligosaccharides.

- Les polysaccharides testés sont soit inactifs soit faiblement actifs aussi bien vis-à-vis du virus A que B. Les effets observés sont principalement obtenus avec une concentration virale de 10 CCID₅₀/50 µl. Néanmoins, le polysaccharide **14** a été conservé en raison de son activité vis-à-vis des virus A et B, même si 250 µg/ml est nécessaire pour obtenir plus de 50 % d'inhibition.

Tableau 3.12 : Activité inhibitrice (%) des molécules des familles des carraghénanes, des xylanes sulfatés, des xylomannanes sulfatés, des ulvanes vis-à-vis du virus de type A

| Famille de sucres | Type de virus | A/Brisbane/10/2007 | | | | | | | | |
|-----------------------|------------------------------|-----------------------------|---------|----------|----------------------------|---------|----------|----------------------------|---------|----------|
| | Dose virale | 100CCID ₅₀ /50µl | | | 30CCID ₅₀ /50µl | | | 10CCID ₅₀ /50µl | | |
| | Dose antivirale Molécules | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml |
| Carraghénanes | 165 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 14.0 | 0.0 | 0.0 | 34.4 | 43.0 | 19.6 |
| | 164 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 21.7 | 3.8 | 0.0 |
| | 166 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.6 | 0.0 | 0.0 | 19.0 | 4.2 |
| Xylanes sulfatés | 97 | 14.4 | 2.7 | 0.0 | 37.4 | 10.6 | 2.1 | 40.3 | 11.0 | 2.4 |
| | 96 | 8.9 | 0.0 | 0.0 | 8.8 | 2.5 | 0.0 | 26.1 | 9.5 | 0.0 |
| Xylomannanes sulfatés | 167 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.6 | 3.8 |
| Ulvanes | 14 | 20.7 | 0.0 | 0.0 | 54.2 | 5.6 | 0.0 | 65.1 | 16.8 | 3.0 |
| | 101 | 24.9 | 0.0 | 0.0 | 41.2 | 4.6 | 0.0 | 52.3 | 8.0 | 4.7 |
| | 16 | 6.6 | 0.0 | 0.0 | 18.1 | 6.2 | 1.5 | 16.3 | 5.0 | 0.0 |
| | 78 | 7.3 | 0.7 | 0.0 | 10.4 | 0.0 | 0.0 | 14.9 | 1.2 | 0.0 |
| | 95 | 2.8 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 11.7 | 0.0 | 0.0 |
| | 100 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 2.3 | 2.6 | 0.0 | 11.2 | 2.2 | 3.2 |
| | 17 | 1.6 | 1.0 | 1.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.3 |
| | 18 | 0.4 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 2.4 | 0.0 | 0.0 |
| | 19 | 1.5 | 0.0 | 1.0 | 1.3 | 0.0 | 2.8 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 53 | 1.2 | 3.0 | 0.0 | 4.2 | 3.0 | 0.0 | 9.8 | 9.4 | 5.0 |
| | 77 | 1.6 | 0.0 | 1.2 | 3.0 | 0.0 | 0.9 | 3.9 | 3.9 | 4.6 |
| | 94 | 4.4 | 4.6 | 0.0 | 7.5 | 0.0 | 0.0 | 8.1 | 0.0 | 0.0 |
| | 102 | 0.4 | 4.3 | 0.1 | 3.4 | 2.6 | 0.0 | 1.9 | 5.9 | 5.0 |
| | 142 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 22.2 |
| | 143 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 9.8 | 11.5 | 9.1 |
| | 144 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 145 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 146 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.3 | |
| 147 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 25.2 | |
| 168 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | |
| 243 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | |

| | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 244 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 245 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |

Tableau 3.13 : Activité inhibitrice (%) des molécules des familles des carraghénanes, des xylanes sulfatés, des xylomannanes sulfatés, des ulvanes vis-à-vis du virus de type B

| Famille de sucres | Type de virus | B/Florida/4/06 | | | | | | | | |
|-----------------------|------------------------------|----------------|---------|----------|---------------|---------|----------|---------------|---------|----------|
| | Dose virale | 100CCID50/50µl | | | 30CCID50/50µl | | | 10CCID50/50µl | | |
| | Dose antivirale Molécules | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml |
| Carraghénanes | 166 | 85.6 | 23.2 | 0.0 | 97.2 | 84.0 | 18.0 | 97.8 | 95.9 | 70.9 |
| | 164 | 90.1 | 19.9 | 0.0 | 98.3 | 72.6 | 0.0 | 97.4 | 95.6 | 49.2 |
| | 165 | 89.3 | 26.2 | 0.0 | 99.0 | 86.9 | 0.0 | 99.1 | 90.5 | 7.3 |
| Xylanes sulfatés | 96 | 11.5 | 0.0 | 0.0 | 54.5 | 0.0 | 0.0 | 69.7 | 18.3 | 0.0 |
| | 97 | 37.2 | 0.0 | 0.0 | 75.2 | 0.3 | 0.0 | 81.5 | 1.4 | 0.0 |
| Xylomannanes sulfatés | 167 | 70.9 | 0.0 | 0.0 | 95.0 | 9.3 | 0.0 | 96.5 | 50.4 | 0.0 |
| Ulvanes | 14 | 67.5 | 0.0 | 0.0 | 93.0 | 0.0 | 1.7 | 96.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 144 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 38.1 | 0.0 | 0.0 | 83.5 | 47.0 | 1.3 |
| | 145 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 5.7 | 0.0 | 0.0 | 30.3 | 10.7 | 25.1 |
| | 94 | 6.9 | 0.0 | 0.0 | 2.5 | 0.0 | 0.0 | 10.5 | 19.2 | 0.0 |
| | 243 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 10.9 | 19.3 | 0.0 |
| | 146 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 39.3 | 0.0 | 16.3 |
| | 168 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.2 | 0.0 | 0.0 | 38.5 | 0.0 | 0.0 |
| | 100 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 35.2 | 0.0 | 0.0 |
| | 78 | 0.0 | 0.0 | 0.9 | 1.9 | 0.0 | 0.0 | 30.3 | 3.4 | 0.6 |
| | 53 | 3.8 | 6.9 | 3.5 | 2.0 | 2.6 | 0.0 | 22.3 | 6.1 | 10.1 |
| | 77 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 18.7 | 1.3 | 5.2 |
| | 143 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 18.6 | 0.0 | 19.0 |
| | 102 | 0.2 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 15.8 | 4.3 | 0.0 |
| | 95 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 4.5 | 0.0 | 0.0 |
| | 101 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 2.5 | 0.0 | 0.0 |
| | 142 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 9.8 | 0.0 | 4.3 |
| | 147 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 6.6 | 0.0 | 0.0 |
| | 244 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 245 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 16 | 5.0 | 0.0 | 0.0 | 5.6 | 0.0 | 0.0 | 9.3 | 0.0 | 0.0 | |
| 17 | | | | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.6 | 0.0 | 0.0 | |
| 18 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | |
| 19 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.4 | 1.0 | |

 Les valeurs inhibitrices correspondent au groupe 3

 Non déterminé

 Les valeurs inhibitrices correspondent au groupe 2

 Les valeurs toxiques (≥ 10 %)

III.2. LES FAMILLES CHARGÉES

III.2.1. Les apiogalacturonanes

L'activité des 18 molécules de la famille des apiogalacturonanes a été mise en évidence. Ces molécules ont été extraites de la plante aquatique, *Zostera marina*. Parmi les molécules purifiées :

- 9 molécules sont des polysaccharides, 7 molécules sont des polysaccharides séparés, 2 molécules sont des oligosaccharides (247, 248).
- Les trois polysaccharides 30, 31, 99 sont issus de la même procédure d'extraction.
- Deux molécules 82, 83 sont les polysaccharides séparés provenant du groupe des molécules 30, 31, 99.

L'activité de ces 18 molécules envers les virus de type A et de type B est présentée dans les **tableaux 3.14** et **3.15**.

- **Vis-à-vis du virus de type A :**
 - Globalement, 9 molécules ont montré une activité inhibitrice.
 - Les molécules d'intérêts sont 158, 160, 161, 159, 82. A la concentration de 250 µg/ml, ces molécules montrent une inhibition plus de 50 % sur toutes les trois doses virales allant de 100 CCID₅₀/50 µl à 10 CCID₅₀/50 µl. Pour les molécules 158 et 160, une concentration de 25 µg/ml est suffisante pour induire une inhibition de plus de 50 % contrairement aux molécules 159, 161, et 82.
- **Vis-à-vis du virus de type B :**
 - A la concentration de 250 µg/ml, 50 % des molécules montrent une activité inhibitrice supérieure à 50 % vis-à-vis des trois doses virales. Ce sont des molécules 99, 246, 30, 82, 159, 158, 160, 161, 83. Parmi elles, les molécules 99, 246, 30 sont les plus efficaces puisqu'elles sont encore actives jusqu'à 25 µg/ml et 2,5 µg/ml (vis-à-vis de la dose virale de 10 CCID₅₀/50 µl). L'activité des autres diminue en fonction des doses virales.
- **Toxicité cellulaire :** 4 molécules présentent un effet toxique significatif à la concentration de 250 µg/ml sur les cellules en phase de croissance : 160 (11 %), 82 (21 %), 83 (16 %), 246 (18 %).

Tableau 3.14 : Activité inhibitrice (%) des molécules de la famille des apiogalacturonanes vis-à-vis du virus de type A

| Type de virus | A/Brisbane/10/2007 (H3N2) | | | | | | | | |
|-----------------|---------------------------|---------|----------|----------------|---------|----------|----------------|---------|----------|
| Dose virale | 100 CCID50/50µl | | | 30 CCID50/50µl | | | 10 CCID50/50µl | | |
| Dose antivirale | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml |
| Molécules | | | | | | | | | |
| 158 | 100.0 | 56.7 | 0.0 | 100.0 | 88.6 | 0.0 | 100.0 | 82.3 | 0.0 |
| 160 | 100.0 | 43.9 | 0.0 | 100.0 | 86.6 | 0.0 | 100.0 | 87.5 | 0.0 |
| 161 | 99.0 | 0.0 | 0.0 | 99.9 | 22.9 | 0.0 | 100.0 | 69.9 | 0.0 |
| 159 | 49.6 | 0.0 | 0.0 | 89.1 | 6.0 | 0.0 | 74.4 | 36.2 | 2.2 |
| 82 | 50.2 | 0.0 | 0.0 | 71.5 | 3.4 | 0.0 | 82.3 | 6.1 | 2.6 |
| 83 | 24.5 | 0.0 | 0.0 | 39.3 | 0.0 | 0.0 | 46.2 | 0.5 | 0.0 |
| 99 | 11.2 | 0.0 | 0.0 | 31.0 | 0.0 | 2.0 | 45.4 | 0.7 | 10.0 |
| 136 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 22.5 | 0.0 | 0.0 |
| 30 | | 3.6 | 0.0 | | 1.7 | 0.0 | | 46.2 | 35.7 |
| 31 | | 0.0 | 0.0 | | 0.5 | 0.0 | | 6.2 | 0.0 |
| 134 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 135 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 6.5 |
| 137 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 138 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 139 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 246 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 247 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 248 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |

Tableau 3.15 : Activité inhibitrice (%) des molécules de la famille des apiogalacturonanes vis-à-vis du virus de type B

| Type de virus | B/Florida/4/06 | | | | | | | | |
|-----------------|----------------|---------|----------|---------------|---------|----------|---------------|---------|----------|
| Dose virale | 100CCID50/50µl | | | 30CCID50/50µl | | | 10CCID50/50µl | | |
| Dose antivirale | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml |
| Molécules | | | | | | | | | |
| 99 | 94.1 | 31.7 | 0.0 | 98.5 | 65.8 | 5.5 | 99.9 | 94.4 | 56.8 |
| 246 | 87.4 | 18.8 | 0.0 | 99.1 | 74.2 | 5.3 | 97.7 | 77.0 | 24.5 |
| 30 | 84.8 | 20.1 | 0.0 | 94.6 | 58.0 | 0.0 | 97.9 | 76.8 | 31.6 |
| 82 | 95.8 | 26.8 | 0.0 | 98.9 | 71.1 | 0.0 | 99.7 | 94.2 | 0.0 |
| 159 | 77.4 | 0.9 | 0.0 | 96.5 | 55.0 | 0.0 | 97.4 | 79.5 | 0.0 |
| 158 | 91.2 | 0.0 | 0.0 | 98.5 | 18.9 | 0.0 | 98.7 | 41.1 | 0.0 |
| 160 | 85.3 | 0.0 | 0.0 | 96.6 | 14.1 | 0.0 | 96.3 | 21.2 | 0.0 |
| 161 | 81.8 | 0.0 | 0.0 | 96.9 | 0.0 | 0.0 | 98.7 | 19.0 | 0.0 |
| 83 | 92.1 | 0.0 | 0.0 | 97.3 | 0.9 | 0.0 | 98.7 | 10.3 | 0.0 |
| 134 | 45.4 | 0.0 | 0.0 | 82.5 | 0.0 | 0.0 | 92.2 | 35.0 | 0.0 |
| 135 | 20.0 | 0.0 | 0.0 | 74.3 | 0.0 | 0.0 | 98.3 | 0.0 | 0.0 |
| 31 | 10.1 | 4.2 | 0.0 | 44.0 | 12.4 | 0.0 | 81.3 | 33.0 | 0.0 |
| 247 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 28.7 | 0.0 | 0.0 | 51.7 | 0.0 | 0.0 |
| 138 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 32.2 | 0.0 | 0.0 | 74.7 | 0.0 | 0.0 |
| 139 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 37.8 | 6.9 | 0.0 | 74.3 | 0.0 | 0.0 |
| 137 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 5.0 | 0.0 | 0.0 | 71.9 | 0.0 | 0.0 |
| 136 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 31.7 | 0.0 | 0.0 |
| 248 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 19.0 | 0.0 | 0.0 |

 Les valeurs inhibitrices correspondent au groupe 3
  Non déterminé
 Les valeurs inhibitrices correspondent au groupe 2
  Les valeurs toxiques (≥ 10 %)

Note de synthèse :

La relation entre l'activité antivirale, la toxicité et les propriétés des molécules est présentée dans le **schéma 3.5**.

Schéma 3.5 : La relation de l'activité antivirale et des propriétés des apiogalacturonanes

| Polysaccharides | | Polysaccharides séparés | | Oligosaccharides purifiés |
|-----------------------------------|---|-------------------------|--|---------------------------|
| | | | | |
| 30 , 31 , 99 | → | 82 | | |
| | | 83 | | 247 (>10 kDa) |
| 139 (85 kDa) | → | | | 248 (3-10 kDa) |
| 246 | | 134 (200 kDa) | | |
| 158 159 | | 135 | | |
| 160 161 | | 136 (26 kDa) | | |
| | | 137 (70 kDa) | | |
| | | 138 (495 kDa) | | |

Les molécules actives vis-à-vis du virus B sont en vert ; Les molécules actives vis-à-vis des deux virus sont en rose ; Les molécules soulignées sont toxiques ($\geq 10\%$).

- Le virus de type B est plus sensible aux molécules testées que le virus de type A. Toutes 18 molécules testées ont une activité inhibitrice vis-à-vis du virus B, dont 9 molécules présentent une activité simultanée vis-à-vis des deux virus d'épreuve.
- Pour les trois molécules extraites de la même procédure, seules les molécules 99 et 30 présentent des activités comparables vis-à-vis du virus de type B. L'activité de la molécule 31 est diminuée ou éliminée.
- Bien que l'activité inhibitrice des deux fractions 82 et 83 (du group 30, 31, 99) soit persistante, l'effet toxique obtenu pour ces molécules réduit leurs potentiels.

- L'activité inhibitrice vis-à-vis du virus B est persistante pour l'oligosaccharide 247 hydrolysé du polysaccharide 139, tandis que celle de l'oligosaccharide 248 est diminuée.
- En combinaison de l'activité inhibitrice et de l'effet toxique, les molécules suivantes ont été choisies comme les candidats de cette famille de sucres :
 - Vis-à-vis du virus de type A : **158, 161, 159**
 - Vis-à-vis du virus de type B : **99, 158, 159**
 - Vis-à-vis de deux virus : **158, 159, 161**

III.2.2. Les alginates

L'activité des 50 molécules appartenant à la famille des alginates a été étudiée (voir annexe 1). Cinq espèces de l'algue brune ont servi à l'obtention des matières premières : *Laminaria japonica* (31/48), *Chorda filum* (12/48), *Fucus vesiculosus* (5/48), *Ascophillum nodosum* (1/48), *Durvillea antarctica* (1/48). Les 4 degrés de purification sont représentés : les polysaccharides, les oligosaccharides de mélange, les oligosaccharides séparés, les oligosaccharides purifiés.

- Vis-à-vis de la souche A, les molécules actives appartiennent à l'espèce *L. japonica*. Cependant la plupart des molécules actives sur la souche A (38 à 46) présentent un effet toxique environ 100 % à 250 µg/ml ou même à 25 µg/ml sur les cellules confluentes.
- Toutes les espèces présentent des candidats actifs vis-à-vis du virus B. Cependant seuls les 4 polysaccharides 92, 93, 106, et 163 présentent une capacité inhibitrice vis-à-vis des trois doses virales du virus B. Les molécules 92, 93, 163 possèdent des valeurs de CI50 comprises entre 25 – 250 µg/ml (100 CCID50/50 µl), et 2,5 – 25 µg/ml (30 CCID50/50 µl, et 10 CCID50/50 µl). Une concentration de 25 – 250 µg/ml est nécessaire pour la molécule 106 afin d'inhiber 50 % de la réplication en présence de trois doses virales.

En conclusion, aucune molécule est intéressante pour le virus A. Seulement 8 % des alginates testés présentent une bonne activité inhibitrice pour le virus B. Cependant la

molécule 92 est exclue pour la sélection due à son effet toxique de 44 %. Le polysaccharide **163** est un candidat de choix pour le virus B.

III.3. LES FAMILLES NEUTRES

Neuf familles de sucres non chargées, correspondant à 74 molécules, font partie de cette étude : les amidons, les galactomannanes, les glucomannanes, les isolichenans, les xyloglycanes, les celluloses, les dextrans, les xanthanes, les glycanes. L'ensemble des résultats du criblage de ces familles ont mis en évidence l'activité de certaines molécules sur les souches virales testées (voir annexe 1). Cependant la plupart de ces activités correspondent au groupe 2, où la présence d'une activité de plus de 50 % s'accompagne souvent de toxicité. Entre outre, l'absence de dissolution complètement du dextrane (28) n'a pas permis son étude. Finalement, bien que certaines molécules actives soient observées, ces groupes de sucre sont exclus de la sélection de nouveaux candidats pour la suite de l'étude.

- **Les amidons**

Les molécules 199, 200 et 197 sont des amidons actifs sur les deux souches virales. L'action des molécules 200 et 197 est principalement à 250 µg/ml vis-à-vis de la dose de 10 CCID₅₀/50 µl. La molécule 199 est plus efficace sur trois doses virales à 250 µg/ml, cependant elle présente à cette concentration à un effet toxique de 14 % sur les cellules en phase de croissance.

- **Les isolichenans**

Pour les isolichenans, des activités au groupe 2 (moins de 30 %) ont été observées pour les molécules 63, 64, et 66 sur deux doses virales de 30 et 10 CCID₅₀/50 µl, uniquement à une concentration de 250 µg/ml. La souche B est plus sensible aux molécules 63, 66, et 64 que la souche A avec une capacité d'inhibition plus de 50 % en présence de 250 µg/ml vis-à-vis de la dose de 10 CCID₅₀/50 µl. Toutefois, cette activité décroît en fonction de la dose virale. Outre ces dernières, la molécule 65 est également active sur la souche de type B, mais uniquement à 250 µg/ml pour une dose de 10 CCID₅₀/50 µl.

- **Les xyloglucances**

Seule la molécule 4 montre une activité inhibitrice de plus de 50 % à 250 µg/ml vis-à-vis des trois doses virales de la souche A. Elle a ainsi montré un effet persistant jusqu'à 25 µg/ml sur la dose de 10 CCID₅₀/50 µl. Vis-à-vis de la souche de type B, toutes les molécules actives ont présenté une faible activité.

- **Les glucomannanes**

Vis-à-vis des deux souches virales, seule la molécule 174 a montré une action double sur trois doses virales à la concentration de 250 µg/ml. Cependant un effet toxique est observé aussi bien sur cellules confluentes (15 %) que sur cellules en phase de croissance (11 %) à cette concentration de 250 µg/ml.

- **Les galactomannanes – les glycanes – les celluloses – les xanthanes**

Aucune molécule de ces familles n'a présenté l'activité inhibitrice vis-à-vis de la souche de type A. Quant à la souche de type B, seuls deux galactomannanes et trois glycanes ont montré une activité correspondante au groupe 2 sur la dose de 10 CCID₅₀/50 µl.

DISCUSSION

L'évolution permanente mais imprévisible des virus grippaux entraîne un problème de santé publique continu. Les antiviraux, primitivement considérés comme moyens complémentaires des vaccins, jouent un rôle indispensable dans le traitement curatif ou prophylactique d'une infection grippale en cas de saut antigénique (pandémie) ou de glissement antigénique (épidémie). Jusqu'à présent, quatre antiviraux ont été approuvés pour le traitement contre la grippe. Malheureusement, l'émergence des virus résistants est un phénomène inéluctable. Le développement de nouvelles classes d'antiviraux contre la grippe est donc un objectif majeur. Bien que l'élaboration de nouvelles molécules par synthèse ait permis l'obtention de molécules antivirales efficaces (zanamivir, oseltamivir), l'exploitation de molécules issues de la biodiversité représente une source importante de molécules à découvrir (131). Parmi les composés naturels actifs, il a été démontré que les molécules appartenant au groupe des glucides possèdent des activités biologiques intéressantes, dont l'activité antivirale (1).

Les glucides, également appelés hydrates de carbone, constituent un groupe de composés non seulement essentiels pour des êtres vivants mais aussi les plus abondants dans la nature (263). Les glucides sont répartis en monosaccharides, oligosaccharides et en polysaccharides. La grande diversité de monosaccharide et de liaisons osidiques permettant la formation de polysaccharides résulte en une pluralité structurale.

Vue générale de la propriété antivirale des molécules testées

Afin de différencier l'activité biologique des molécules, deux types de virus influenza ont été utilisés comme virus d'épreuve. Nous avons défini des critères de sélections basés sur la capacité des molécules à inhiber les deux virus avec une activité croissante, et une toxicité cellulaire faible voire nul. Le premier groupe correspond à des molécules dont la capacité d'inhibition est inférieure à 10 % pour l'un ou l'autre des virus d'épreuves. Le second groupe reprend des molécules dont la capacité d'inhibition est comprise entre 10 et 50 %. Enfin, le troisième groupe correspond à des molécules dont la capacité d'inhibition est supérieure à 50 %.

Les **figures 3.1** et **3.2** présentent une vue d'ensemble des résultats de criblage. Vis-à-vis du virus d'épreuve de type A, en présence d'une dose virale de 10 CCID₅₀/50 µl, les molécules de groupe 1 représentent plus de 80 % des polysaccharides testés à des concentrations en molécules comprises entre 2,5 et 25 µg/ml. Ce pourcentage diminue à 60 % lorsque la concentration est de 250 µg/ml, mettant en évidence une augmentation de

molécules de capacité biologique correspondant aux critères des groupes 2 et/ou 3. Le pourcentage de polysaccharides avec une capacité d'inhibition du groupe 1 reste majoritaire lors de l'augmentation de la dose virale mis en contact avec les molécules. Cependant, un faible % de molécules, compris entre 10 et 20 %, reste actif vis-à-vis de la souche d'épreuve de type A quelle que soit la dose virale employée et ce pour une concentration d'utilisation de 250 µg/ml.

Vis-à-vis du virus d'épreuve de type B (**figure 3.2**), en présence d'une dose virale de 10 CCID50/50 µl, le pourcentage de molécules de groupe 1 varie entre 35 et 80 %. Ce pourcentage est inversement proportionnel à la concentration en molécule utilisée. On observe cette même baisse pour les molécules de groupe 2 qui passent de 20 à 5 % et pour les molécules de groupe 3 qui passent de 40 à 5 %. Le pourcentage de molécules répondant aux critères du groupe 3 est beaucoup plus important vis-à-vis du virus d'épreuve de type B que vis-à-vis du virus d'épreuve de type A. Il est surtout intéressant de noter que le pourcentage de molécules répondant aux critères du groupe 3 reste significatif lors de l'augmentation de la dose virale mise en contact avec les trois concentrations de molécules testées. Ainsi pour une concentration de 250 µg/ml et une dose virale de 100 CCID50/50 µl, 20 % des polysaccharides testés répondent aux critères du groupe 3.

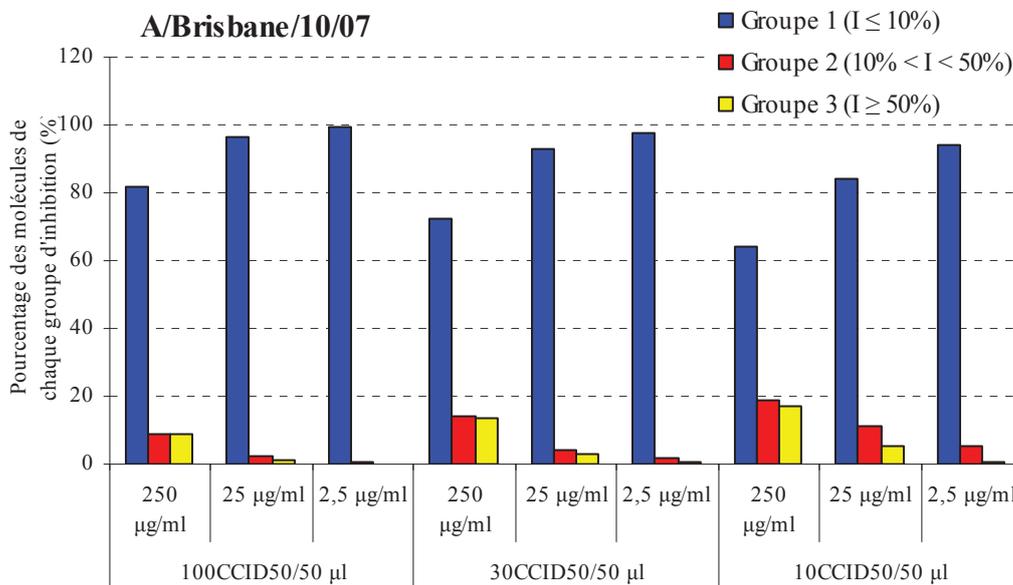


Figure 3.1 : Histogramme de la distribution des molécules actives en fonction des 3 groupes d'inhibition vis-à-vis du virus de type A

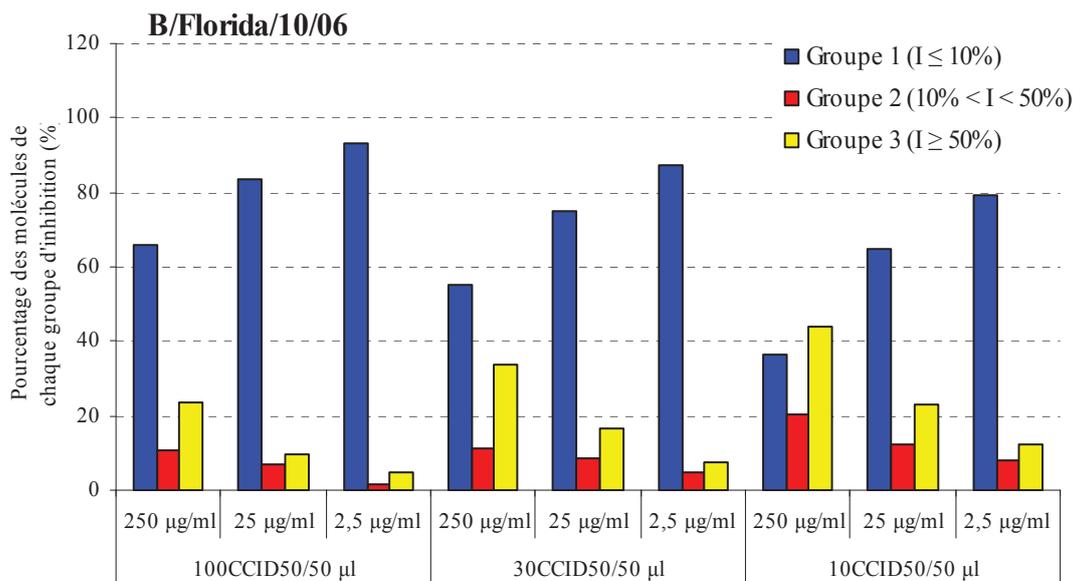


Figure 3.2 : Histogramme de la distribution des molécules actives en fonction des 3 groupes d'inhibition vis-à-vis du virus de type B

L'ensemble de ces résultats montrent que les polysaccharides testés sont plus actifs vis-à-vis du virus d'épreuve de type B que de type A. D'autre part, vis-à-vis du virus d'épreuve de type B, le pourcentage des molécules appartenant au groupe 3 est supérieur à celui du groupe 2. Ainsi parmi l'ensemble des polysaccharides testés un faible pourcentage répond aux critères de sélections établis.

Les molécules qui ont une double activité vis-à-vis des deux types de virus d'épreuves, peuvent être regroupées dans seulement 7 des 20 familles de sucres. L'ensemble de ces sucres diffèrent par leurs compositions osidiques, le taux de ramification, et la charge générale de la molécule. Les deux premiers critères sont en cours de détermination par le CERMAV, partenaire académique du consortium CARBINFEC.

Vue générale de l'activité antigrippale en fonction la propriété de la charge électrostatique, la famille d'origine et la structure des polysaccharides

La charge générale des molécules a permis un regroupement de l'ensemble des polysaccharides testés en trois groupes, les neutres, les chargés et les polysaccharides sulfatés.

Les sucres considérés comme neutres ne présentent pas d'activité antivirale puisque aucune des 74 molécules testées n'a présenté d'activité répondant aux critères de sélections établis. Outre le fait d'être neutre, ces molécules sont majoritairement des polyholosides ou hétérosides, principalement constitués d'oses tels que le glucose, le mannose, avec un taux de ramification variable en fonction de l'origine. Ces polymères sont principalement utilisés dans le monde végétal ou animal comme polymères de stockage d'énergie comme pour l'amidon, ou comme constituant de la paroi comme la cellulose.

L'ensemble des molécules possédant une activité biologique antivirale pour l'un ou l'autre des virus d'épreuves sont dites « chargés » en raison de la présence des groupements carboxylates, ou « sulfatés » en raison de la présence des groupements sulfates.

Parmi les 20 familles de sucres testées, deux peuvent être considérées comme des polysaccharides chargés, les alginates et les apiogalacturonanes. Leur charge négative est attribuée aux groupes carboxylates portés par des constituants d'acide uronique (58, 93). Il apparaît dans notre étude que la capacité biologique d'inhibition du virus influenza est principalement portée par la famille des apiogalacturonanes, puisque 9 molécules sur 18 présentent une activité. Les alginates, quant à eux, possèdent seulement 4 molécules sur 50 correspondant aux critères de sélection vis-à-vis du virus d'épreuve B.

Les apiogalacturonanes sont des constituants de polysaccharides pectiques, synthétisés par un nombre très limité de plantes. Dans notre étude, ils sont isolés de la plante aquatique *Zostera marina*. Ces polysaccharides sont caractérisés principalement par une chaîne d'acide α -(1,4)-D-galacturonique substituée par des résidus d'apioses ou d'oligoapioses. L'étude de Gloaguen et *al.* permet de développer un modèle structural de l'apiogalacturonane de l'espèce *Z. marina* (**figure 3.3**) (93). Cette étude également montre que ce polysaccharide est capable d'inhiber la prolifération, la migration, et l'invasion d'un type de cellule de carcinome épidermoïde. Ainsi, les données obtenues suggèrent que cette activité est liée à des chaînes d'apioses. De plus, l'activité immunostimulante d'un apiogalacturonane isolé de l'espèce *Lemna minor* a été identifiée (218). Donc, pour les apiogalacturonanes testés, l'activité antivirale obtenue pourrait être liée à une structure constituée des résidus acidiqes et des chaînes latérales d'apioses.

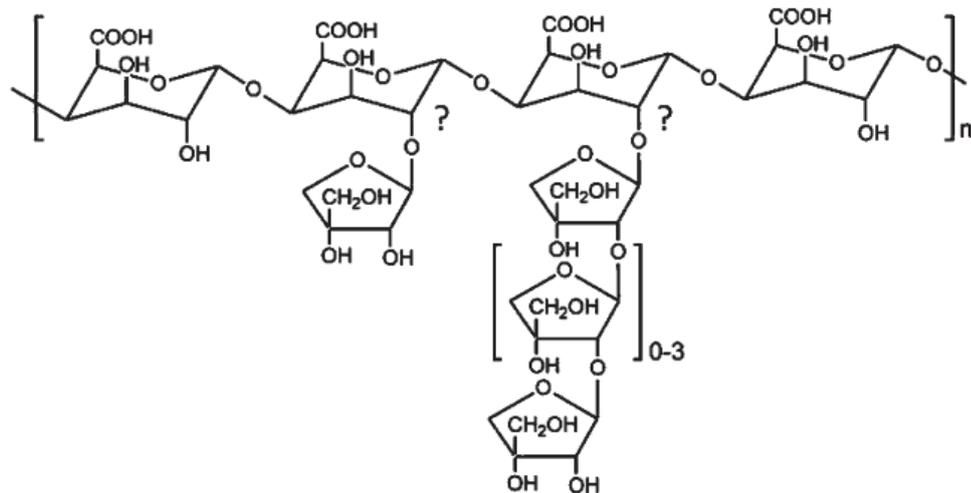


Figure 3.3 : Structure chimique d'une chaîne d'apioagalacturonane. Le type de liaisons entre les apioses et les oligoapioses, ainsi leur distribution le long du squelette ne sont pas encore caractérisés. (Source : Gloaguen et al., 2010, *J Nat Prod* (93))

Les alginate de l'algue brune, classés dans le même groupe « chargé » avec les apioagalaturonanes, pourtant ne possèdent pas d'activité antivirale correspondant aux critères de sélection vis-à-vis des deux virus testés, quel que soit le type de fractionnements testés. Il semble qu'une structure linéaire de l'alginate, constituée principalement de deux monomères, l'acide β -D-mannuronique et l'acide α -L-gulonique (**figure 3.4**), est moins favorable à l'établissement d'un domaine actif avec une activité biologique de type antiviral.

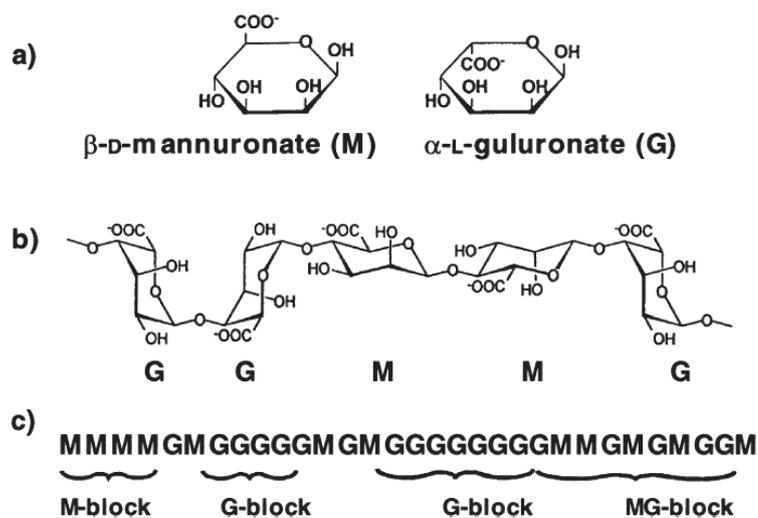


Figure 3.4 : Caractère structural de l'alginate a) monomère b) conformation d'une chaîne c) distribution des blocs acidiques. (Source : Draget et al., 2002, *Biopolymers* (58))

Les familles parmi lesquelles nous avons pu isoler le plus de candidat avec un potentiel d'inhibition important vis-à-vis de l'un ou l'autre virus d'épreuve sont caractérisés par la présence de groupements sulfates. A l'exception des xylanes sulfatés qui ont montré un fort taux de toxicité, les 8 autres familles ont présenté une capacité d'inhibition. Après sélection en fonction des critères de choix, 10 molécules ont été sélectionnées réparties dans 6 familles de sucres.

Parmi les sucres sulfatés, la famille des arabinogalactanes est la plus active puisque 15 des 25 molécules possèdent une activité vis-à-vis des deux virus d'épreuve. Les arabinogalactanes participent généralement à la structure des polysaccharides pectiques du monde végétal. Leurs structures comportent principalement un squelette composé d'unités de galactose sur lequel se situent des chaînes latérales d'arabinogalactane. Dans cette étude, les arabinogalactanes sont isolés d'une algue verte, *Codium fragile*. Cette espèce possède une paroi à l'architecture spécifique qui présente des caractéristiques communes ou non à celles des algues vertes et des plantes terrestres. La structure des arabinogalactanes de l'espèce *Codium* semble similaire à celle des arabinogalactanes de type II des plantes terrestres (**figure 3.5**). D'après Estevez et *al.*, c'est un polysaccharide acide en raison de la présence de résidus de pyruvate. De plus il se caractérise par des groupes sulfatés situés sur les unités d'arabinopyranose et de galactopyranose (71). La présence des groupes sulfatés dans la structure des arabinogalactanes testés pourrait favoriser une activité antivirale à côté de l'activité biologique déjà découverte dans les autres espèces. Il a été démontré que les arabinogalactanes extraits de l'espèce *Echinacea purpurea* (une plante médicinale) et d'une espèce de mélèze, le *Larix occidentalis*, présentent des activités antitumorales et immunostimulantes (112, 168). Nous suggérons que la structure spécifique des arabinogalactanes en association avec la présence des groupements sulfates permettent d'établir des domaines de type antiviral.

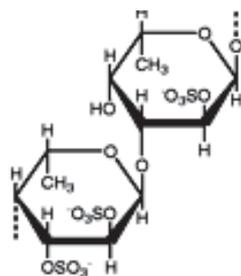
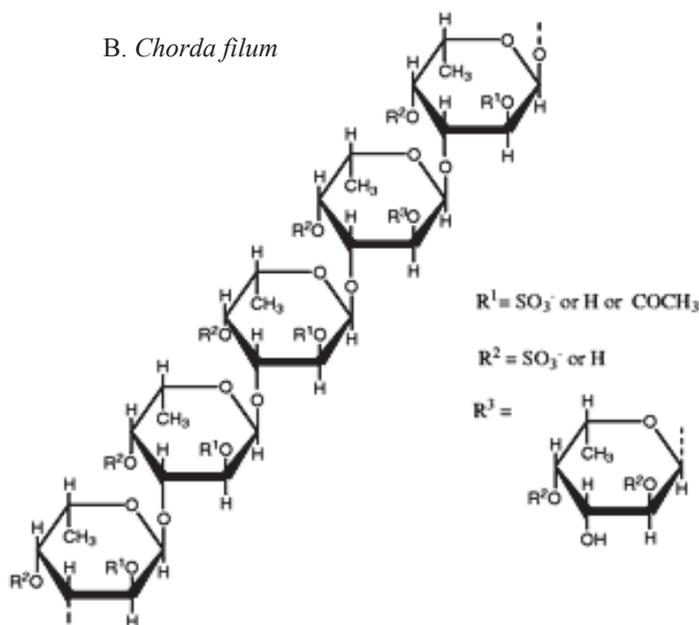
A. *Ascophyllum nodosum*/ *Fucus vesiculosus*B. *Chorda filum*

Figure 3.6 : Structures du fucane sulfaté des algues brunes. **A)** L'espèce *A. nodosum* et *F. vesiculosus* **B)** L'espèce *C. filum*. (les substituents tels que les O-acétyles, les branches sont présentes dans ces structure). Source : Berteau et Mulloy, 2003, *Glycobiology* (22)

Les galactofucanes de l'algue brune *Undaria pinnatifida*, font partie de la troisième famille de sucres sulfatée présentant une activité intéressante vis-à-vis des deux virus d'épreuve. Ce polysaccharide est un type de fucane qui contient principalement du L-fucose, D-galactose et des groupements sulfates. L'activité antiherpès des galactofucanes sulfatés de différentes espèces a été rapportée (118, 217). L'étude chez l'algue brune *Adenocytis utricularis* présente une structure hétérogène de galactofucane. A l'exception d'une structure commune avec le fucane, le domaine de galactane est également hétérogène avec une structure dominante de D-galactopyranose associée par la liaison de type (3,6). Sur cette structure, les groupements sulfates se situent principalement en position C₄. Donc, une combinaison entre la structure complexe et la sulfatation des galactofucanes peut être un avantage pour l'activité antigrippale.

Trois derniers candidats appartiennent aux familles des carraghénanes, des hétéroglycanes sulfatés et des ulvanes.

- Le carraghénane est un nom générique des polysaccharides linéaires de la famille des galactanes sulfatés, extraits des parois de l'algue rouge. Ils sont formés par la répétition régulière du motif 3-β-D-galactopyranose et 4-α-D-galactopyranose. Les carraghénanes sont répartis en différentes familles selon la position des groupements sulfates et la présence ou non d'unités 3,6-anhydrogalactose (**figure 3.7**). Les autres résidus (xylose, glucose, acide uronique) peuvent se trouver dans la structure de cette molécule.
- Les hétéroglycanes de l'algue *Caulerpa racemosa* se caractérisent par une structure ramifiée, composée des oses d'arabinose, de galactose et de xylose, avec les groupements sulfates en position C₃ d'arabinose et en C₆ de galactose (39).
- La structure chimique des ulvanes est basée sur la répétition de différentes unités disaccharidiques, constituée majoritairement de rhamnose, xylose, acide glucuronique, acide iduronique et sulfate (149).

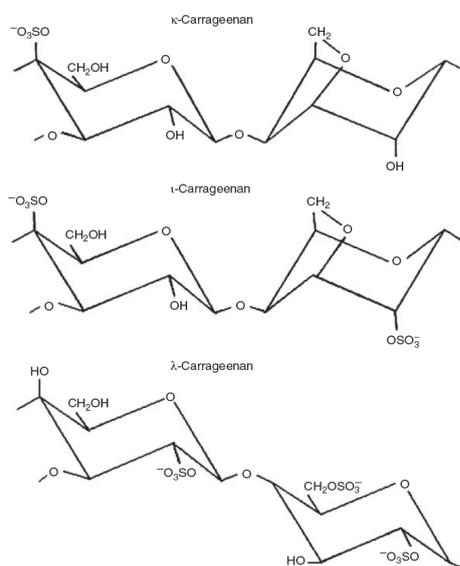


Figure 3.7 : Structure chimique des trois types de carraghénane. Source : Vazhiyil Venugopal, 2009, *Marine Products for Healthcare*, chapter 10

Aucune structure particulière de ces trois familles ne permet d'expliquer en l'état de l'activité antivirale des molécules sélectionnées.

En résumé, dans notre étude, 4 familles sont plus largement représentées en termes de nombre de polysaccharide actif : les arabinogalactanes, les apiogalacturonanes, les fucanes, les galactofucanes. Les polysaccharides avec une activité antivirale sont donc soit « chargés » soit « sulfatés », cependant aucune corrélation directe entre ce degré de charge ou de sulfatation et une activité antivirale peut en être déduite. Parallèlement, dans cette étude on peut noter que la majorité des molécules actives peuvent être considérées comme des pectines (les arabinogalactanes et les apiogalacturonanes). La pectine englobe un groupe d'hétéropolysaccharides acide avec des domaines structuraux distincts. Les pectines possèdent une hétérogénéité significative en fonction de la source végétale, des conditions d'extraction et de nombreux facteurs environnementaux. Outre l'acidité des molécules, la structure de ces dernières semble jouer un rôle important dans l'acquisition d'une activité biologique.

Parmi les molécules testées, nous avons pu évaluer la capacité inhibitrice de polysaccharides natifs, de polysaccharides séparés, d'oligosaccharides et d'oligosaccharides purifiés. Une bonne activité antivirale des apiogalacturonanes s'observe uniquement au niveau des polysaccharides natifs, cette activité diminue ou disparaît à l'état de polysaccharide séparé et d'oligosaccharide. Tandis que pour les arabinogalactanes, l'activité peut être observée aussi bien sur des polysaccharides que des oligosaccharides. Pour les fucanes, l'activité des polysaccharides et des oligosaccharides varient en fonction des espèces d'origine. Quant aux galactofucanes, les oligosaccharides hydrolysés présentent une activité soit diminuée soit augmentée en fonction du virus d'épreuve.

De façon générale, pour les sucres chargés, la polymérisation structurelle de la molécule semble donc jouer un rôle important dans l'établissement d'une activité antivirale, tandis que pour les polysaccharides sulfatés, l'activité antivirale semble résulter autant de la polymérisation que du positionnement et du degré de sulfatation de la molécule. En effet, pour ces derniers nous avons pu isoler des oligosaccharides avec une activité antivirale répondant aux critères de sélection. Parmi eux, l'oligosaccharide 152, appartenant à la famille des arabinogalactanes, présente une activité efficace vis-à-vis des deux virus de type A et B. Nous avons choisi d'étudier plus en avant la capacité inhibitrice de cet oligosaccharide en raison de son état de structure moins complexe pour la caractérisation structurelle et pour l'identification du motif d'activité antivirale.

CHAPITRE IV.

EVALUATION DE L'ACTIVITE INHIBITRICE & CARACTERISATION DES CIBLES VIRALES

RESULTATS

Le criblage des molécules issues principalement d'un réservoir algal a permis d'isoler des candidats actifs vis-à-vis des deux virus d'épreuves. La majorité des molécules actives sont des polysaccharides. Bien que l'activité puisse être reliée à un enchaînement osidique, ou au degré de ramification de la molécule, il apparaît difficile de relier une activité à un motif précis présent dans un polysaccharide. Ainsi, parmi les 6 oligosaccharides issus de l'hydrolyse du polysaccharide 109, appartenant à la famille des arabinogalactanes, seul l'oligosaccharide 152 est actif vis-à-vis des deux virus d'épreuve. Bien que cet oligosaccharide soit de grande taille (> 10 kDa), le motif actif sera plus facilement caractérisable.

Ainsi, basé sur cette possibilité nous avons décidé de mieux caractériser le mode d'action de cet oligosaccharide, d'une part, en évaluant le spectre d'activité en élargissant le panel de souches virales testées, d'autre part, en caractérisant la cible virale, ainsi que l'étape du cycle infectieux inhibée.

IV.1. EVALUATION DE LA CAPACITE DE NEUTRALISATION DE L'OLIGOSACCHARIDE 152

IV.1.1. Effet inhibiteur de l'oligosaccharide 152 vis-à-vis des gripes saisonnières de sous-type A (H3N2), A (H1N1) et de type B

L'activité neutralisante de l'oligosaccharide 152 a été évaluée pour une dose virale unique de 30 CCID₅₀/50 µl. Outre les souches A/Brisbane/10/07 (H3N2) et B/Florida/4/06, la souche A/Solomon Island/03/06 (H1N1) a été utilisée.

Parmi ces virus, la souche A/Brisbane/10/07 (H3N2) s'est avérée moins sensible à la molécule 152 (**figure 4.1A**). On observe une augmentation de la viabilité cellulaire conjointement à l'augmentation de la concentration en oligosaccharide. Une neutralisation de la réplication virale a été obtenue à la concentration de 250 µg/ml. La quantité de virus présente dans le surnageant de culture étant réduite de 30 % à cette concentration, tandis que l'on observe une baisse de 100 % par quantification de l'activité enzymatique résiduelle.

La **figure 4.1B** montre une plus forte sensibilité de la souche A/Solomon Island/03/06 (H1N1) à l'oligosaccharide 152. On observe dès 2,5 µg/ml une diminution de

35 % de la quantité de virus présente dans le surnageant de culture à 48 heures, la CI50 étant obtenue pour une concentration de 25 µg/ml. Cette diminution de la réplication virale est corrélée à une protection cellulaire. L'absence de détection de l'activité NA, conduit en l'observation d'une valeur de CI50 inférieure à 2,5 µg/ml.

Pour le virus B/Florida/4/06 (**figure 4.1C**), on observe une bonne corrélation entre la diminution du titre infectieux dans le surnageant de culture et la diminution de l'activité enzymatique. L'oligosaccharide 152 présente donc une CI50 de 25 µg/ml et de 2,5 - 25 µg/ml respectivement. Comme pour les virus A/H3N2 et A/H1N1, la présence de l'oligosaccharide 152 réduit la mortalité cellulaire associée à la réplication virale.

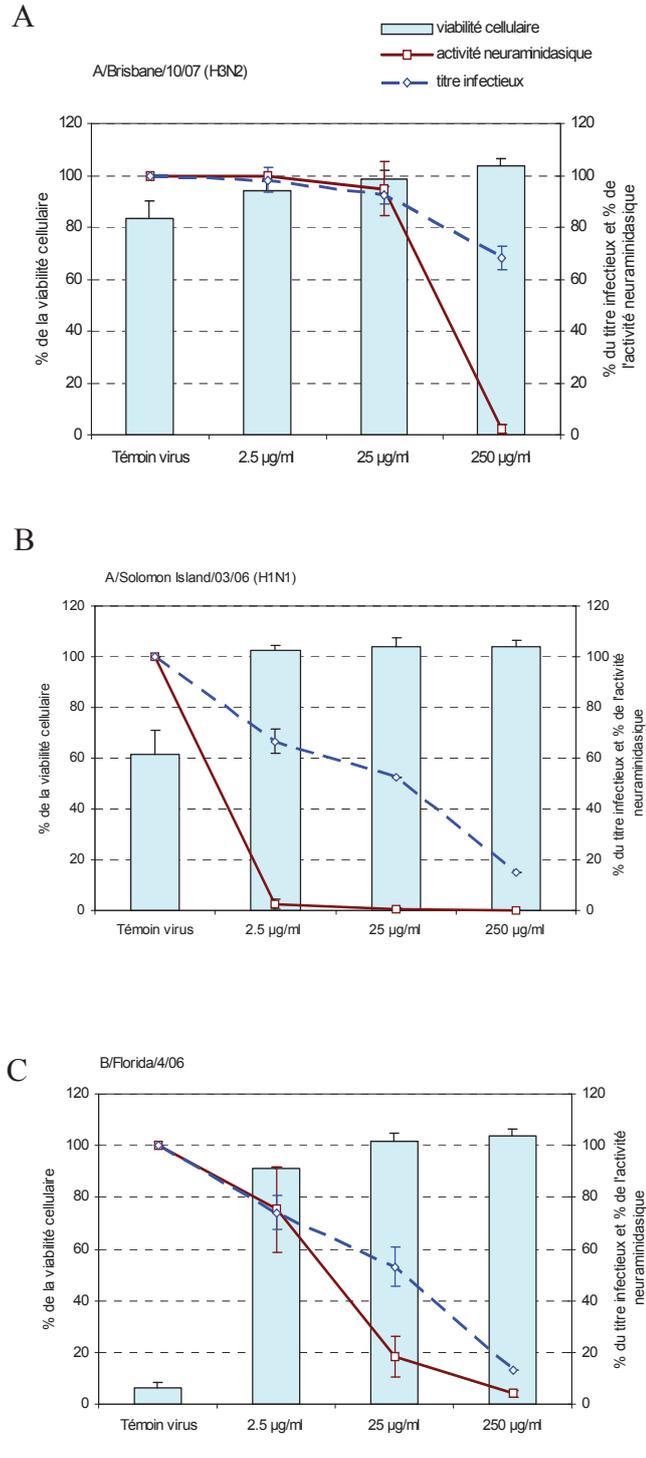
Remarque : bien que les valeurs relevées par la détection de l'activité neuraminidasique soient inférieures par rapport à celles obtenues par le titrage du pouvoir infectieux, ces deux méthodes présentent une corrélation entre les profils de réduction. Donc, la détection de l'activité neuraminidasique se révèle comme une méthode appropriée et rapide pour la mise en évidence de l'activité antigrippale. En effet, le développement d'un test antiviral à haut débit en mesurant la réplication virale par la détection de l'activité NA a été rapporté (64).

IV.1.2. Effet inhibiteur de l'oligosaccharide 152 contre les souches pandémiques A (H1N1) 2009

Trois souches A (H1N1) responsables de la pandémie 2009 ont été isolées à partir de prélèvements cliniques. Parmi elles, le virus A/Lyon/969/09 est une souche antigéniquement apparentée au virus A/California/7/09. Ce dernier est le virus prototype sélectionné pour entrer dans les compositions vaccinales contre le virus H1N1 lors de la pandémie 2009. Les deux autres sont des mutants représentatifs apparus au cours de la pandémie. Il s'agit du virus A/Lyon-CHU/48-4251/09 portant une mutation H275Y au niveau de la protéine NA, associée à la résistance à l'oseltamivir. Le deuxième mutant est le virus A/St-Etienne/1691/09, porteur d'une substitution D222G au niveau de la protéine HA.

Les résultats indiquent que la molécule 152 a une forte activité aussi bien vis-à-vis du virus A/Lyon/969/09 que de la souche résistante A/Lyon-CHU/48-4251/09 (H275Y). Leurs valeurs de CI50 sont identiques et inférieures à 2,5 µg/ml (**figure 4.1D, 4.1E**). La

présence de la mutation de résistance à l'oseltamivir H275Y ne modifie pas la sensibilité du virus par l'oligosaccharide 152. Pour le virus A/St-Etienne/1691/09, une valeur de CI50 entre 2,5 et 25 µg/ml est obtenue par détermination de l'activité neuraminidasique (**figure 4.1F**). Cependant, on observe seulement une baisse de 20 % de la production virale par détermination du titre infectieux en trois concentrations testées.



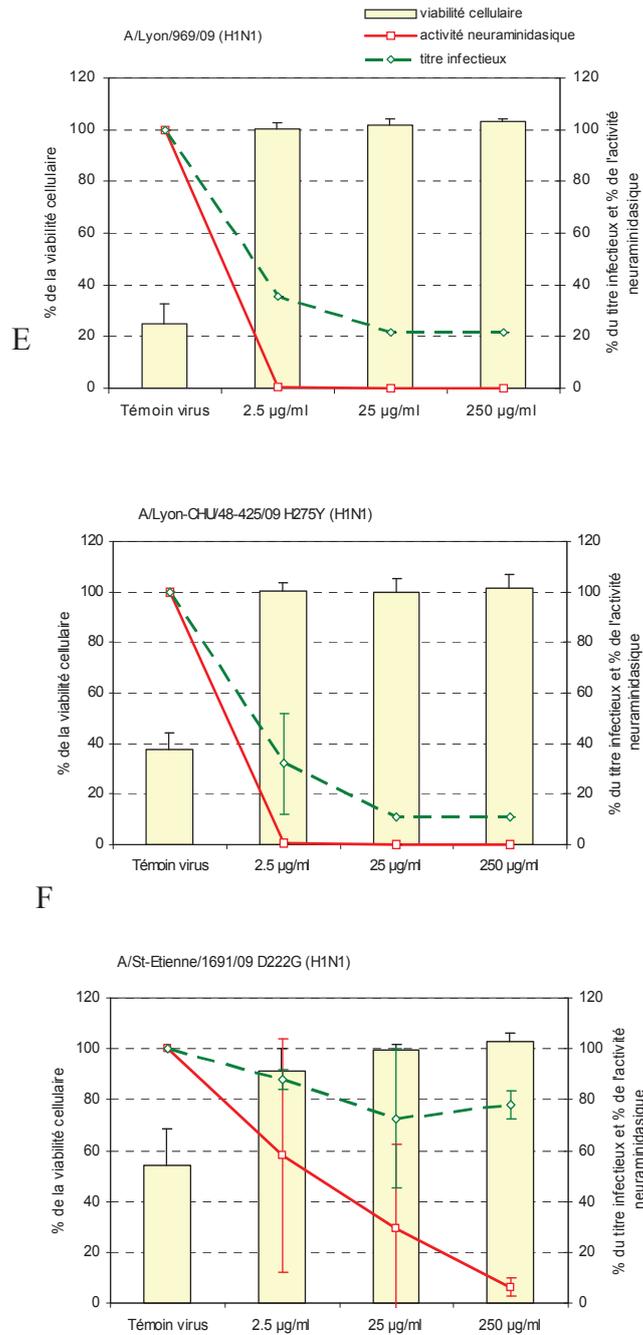


Figure 4.1 : L'activité antivirale de l'oligosaccharide 152. Les cellules MDCK sont infectées par une dose virale de 30 CCID₅₀/50 µl, en présence ou absence de la molécule 152. Après 48 heures d'incubation, les virus produits dans le surnageant sont mesurés par le titrage du pouvoir infectieux (ligne pointillée) et la détection de l'activité de l'enzyme NA (ligne pleine). La viabilité cellulaire est déterminée en utilisant le colorant rouge neutre (bar). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux témoins virus ou aux témoins cellules (pour la viabilité cellulaire). Chaque valeur est une moyenne de 4 réplicats.

IV.1.3. Effet inhibiteur de l'oligosaccharide 152 vis-à-vis de la souche parentale A (H3N2) et son mutant R292K (résistant à l'oseltamivir)

Pour confirmer l'absence de résistance croisée entre une mutation induisant une résistance à l'oseltamivir et l'oligosaccharide 152, nous avons effectué une comparaison de sensibilité entre une souche sensible et une souche résistante à l'oseltamivir. Dans ce test, le recombinant RGH3N2 A (H3N2) et son mutant RGH3N2 (R292K) obtenus par génétique inverse sont utilisés (**figure 4.2**). Ces recombinants sont constitués de la glycoprotéine HA, H3 du virus A/Lyon-CHU/26430/03 A (H3NA-) et de la glycoprotéine NA, N2 du virus A/Moscou/10/99 A (H3N2). L'oseltamivir carboxylate est utilisé comme inhibiteur de référence.

- Le test de neutralisation réalisé en présence des virus RGH3N2 et RGH3N2 (R292K) et des concentrations croissantes en oseltamivir (**figure 4.2C**) montre que l'oseltamivir neutralise la réplication du virus RGH3N2 avec une valeur de CI50 100 fois inférieure à celle nécessaire pour neutraliser la réplication du virus RGH3N2 (R292K) (**figure 4.2D**).
- Parallèlement, le virus RGH3N2 est neutralisé par l'oligosaccharide 152 (**figure 4.2A**), la CI50 étant comprise entre 2,5 et 25 µg/ml. Contrairement à ce qui est observé en présence d'oseltamivir, la réplication du virus RGH3N2 (R292K), est inhibée par la molécule 152 (**figure 4.2B**). La sensibilité du virus résistante à l'oseltamivir est plus importante que le virus parental non résistante puisque la CI50 est inférieure à 2,5 µg/ml.

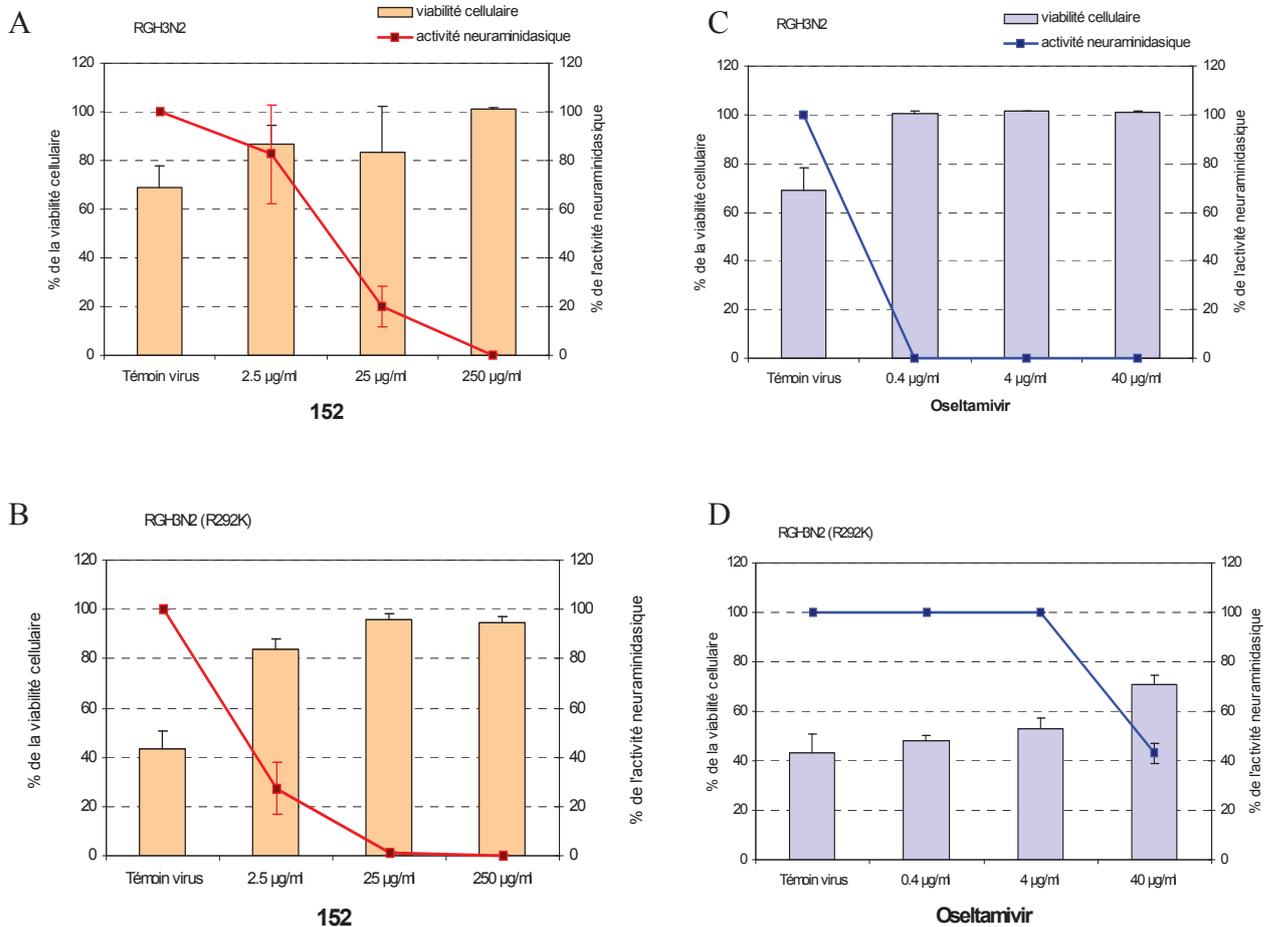


Figure 4.2 : Comparaison de l'activité de l'oligosaccharide 152 vis-à-vis de la souche sauvage et du mutant résistant à l'oseltamivir. Trois concentrations de l'oseltamivir carboxylate (0,4 µg/ml, 4 µg/ml, 40 µg/ml) sont utilisées comme inhibiteur de référence. Les cellules MDCK sont infectées par une dose virale de 30 CCID₅₀/50 µl, en présence ou absence du composé 152. Après 48 heures d'incubation, les virus produits dans le surnageant sont quantifiés par détection de l'activité de l'enzyme NA (ligne pleine). La viabilité cellulaire est mesurée en utilisant le colorant rouge neutre (bar). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux témoins virus ou aux témoins cellules (pour la viabilité cellulaire). Chaque valeur est une moyenne de 4 réplicats.

IV.2. CARACTERISATION DES CIBLES VIRALES

IV.2.1. L'impact de l'oligosaccharide 152 sur l'activité de l'enzyme NA des virus influenza de type A et de type B

Deux méthodes de révélation ont été employées afin de mettre en évidence la neutralisation de la réplication virale par la molécule testée. La détermination de la quantité de virus présent dans le surnageant de culture après 48 heures est effectuée, par titrage infectieux ou par détermination de l'activité enzymatique résiduelle. Bien que des profils corrélatifs soient observables pour ces deux méthodes, les résultats obtenus sont pourtant variés en termes de sensibilité. Nous avons, par conséquent, émis l'hypothèse d'une possible interaction entre la neuraminidase et l'oligosaccharide 152.

Afin de montrer cette possible interaction, nous avons testé la capacité d'inhibition de la molécule 152 dans un test d'inhibition de l'activité enzymatique de la NA (**figure 4.3**). Une quantité standardisée de virus à 10 nmol/h/ml, basée sur l'activité enzymatique, a été mise en contact avec des dilutions sériées de raison 10 de l'oligosaccharide 152, allant de 100 à 0,00001 µg/ml.

Vis-à-vis du virus de sous-type A (H3N2), la sensibilité des souches A/Brisbane/10/07 et RGH3N2 sont comparables, leurs valeurs de CI50 sont de 66,85 ng/ml et de 64,70 ng/ml respectivement. Par contre, une diminution de l'effet de la molécule 152 est observée sur le virus résistant à l'oseltamivir RGH3N2 (R292K), avec une CI50 20 fois supérieure (1292 ng/ml). L'oligosaccharide 152 peut donc inhiber l'activité enzymatique de la neuraminidase. Le virus porteur de la mutation R292K est moins sensible que les virus sauvages.

Les virus de sous-type A (H1N1) apparaissent moins sensibles à l'oligosaccharide 152 que les virus de sous-type A (H3N2). Le virus A/Solomon Island/03/06 est très peu sensible avec une CI50 de 100 µg/ml. Les virus pandémiques A/Lyon/969/09 et A/St-Etienne/1691/09 (D222G), tous les deux porteurs d'une NA sensible à l'oseltamivir ont une CI50 respectivement de 853,2 ng/ml et 855,65 ng/ml. Comme pour le virus de sous-type A (H3N2) porteur d'une mutation de résistance à l'oseltamivir, on observe que le virus A/Lyon-CHU/48-4251/09 (H275Y) est moins sensible à la molécule 152 que les virus sensibles avec une CI50 de 2889 ng/ml. Cette valeur reste néanmoins inférieure à

celle observée pour le virus A/Solomon Island/03/06 et ne peut donc pas être considérée comme une valeur de résistance.

L'oligosaccharide 152 inhibe l'activité NA du virus B/Florida/4/06 avec une CI50 d'environ 0,1 µg/ml. Au-delà de cette concentration, on note que l'activité NA est partiellement inhibée puisque l'activité est inhibée à une hauteur de 60 % de 1 à 100 µg/ml.

En résumé, l'oligosaccharide 152 inhibe donc l'activité neuraminidasique des virus A (H3N2), A (H1N1), A (H1N1) pandémique, et B. Il apparaît que les virus porteurs d'une mutation conférant une résistance à l'oseltamivir sont moins sensibles à la molécule 152.

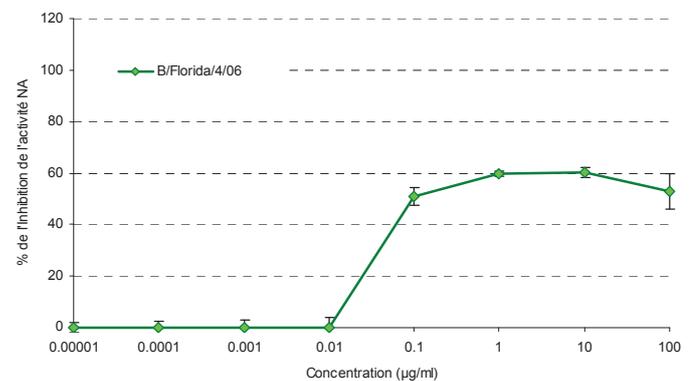
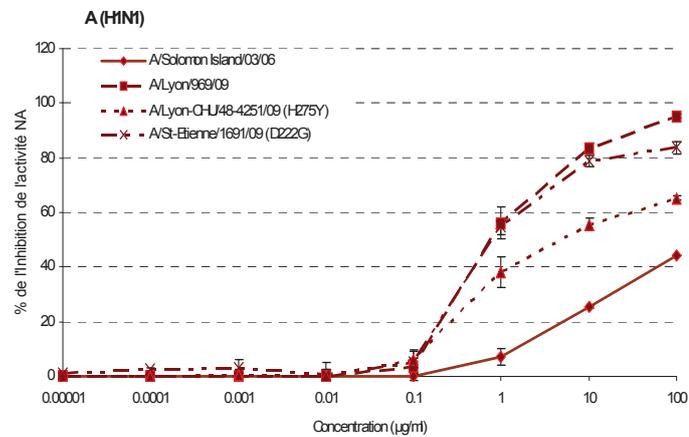
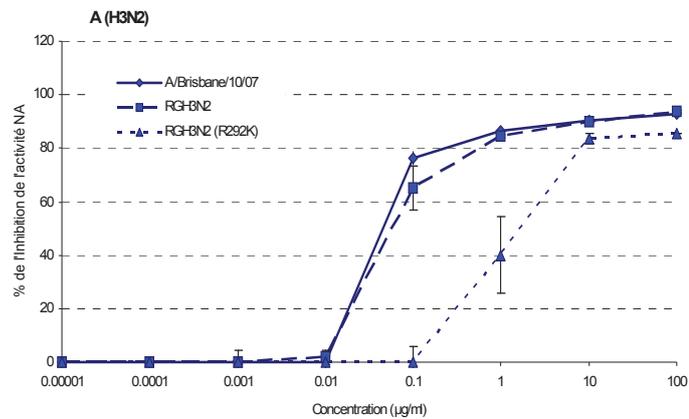


Figure 4.3 : L'inhibition de l'activité de l'enzyme NA. La dose standardisée des virus à 10 nmol/heure/ml est pré-incubée avec les dilutions de raison 10 de la molécule 152 (0,00001 µg/ml à 100 µg/ml) pendant 30 minutes à 37°C. L'incubation avec le substrat se poursuit pendant une heure à 37°C. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux témoins virus. Chaque valeur est une moyenne de 2 réplicats.

IV.2.2. Etude d'action neutralisale de l'oligosaccharide 152 dans des phases précoces et phases tardives de l'infection virale

Afin de déterminer les phases du cycle infectieux neutralisées par l'oligosaccharide 152, cinq modalités d'infection divisées en fonction des phases précoces et des phases tardives ont été réalisées. Cinq virus ont été utilisés pour tester l'influence du type et du sous-type viral et l'influence d'une mutation de résistance à l'oseltamivir. Ces virus sont, le virus A/Brisbane/10/07 (H3N2), A/Solomon Island/03/06 (H1N1), B/Florida/4/06, RGH3N2, RGH3N2 (R292K).

Les différents essais ont été effectués en présence de 30 CCID₅₀/50 µl de virus pour une concentration finale en oligosaccharide 152 de 62,5 µg/ml. Cette concentration a été sélectionnée en fonction des résultats d'inhibition de l'activité NA. Les 5 différentes modalités utilisées sont résumées dans la **figure 4.4A**. L'étape de prétraitement de la modalité 2 est un point correspondant au protocole « classique » réalisé pour le criblage des polysaccharides. Les modalités 1, 2, 3, et 4 correspondent à l'étude de l'influence sur les phases précoces, tandis que la modalité 5 correspond à l'étude de l'influence sur les phases tardives.

L'inhibition de la multiplication virale obtenue présente une corrélation entre l'obtention de l'effet cytopathique (ECP) et la détection de l'activité neuraminidasique dans le surnageant. En effet, une forte diminution d'ECP peut conduire à une inhibition de l'activité NA jusqu'à 100 %. Cependant, nous présenterons uniquement les résultats obtenus par l'activité NA, qui permet d'analyser différents niveaux d'inhibition pour chaque modalité.

- Dans la **modalité 1**, l'exposition des cellules à la molécule 152 avant l'infection virale conduit à un très faible effet sur le virus A/Brisbane/10/07 (H3N2) et le virus

RGH3N2 (R292K). Une réduction de 15 % et 5 % de la détection de l'activité NA a été obtenue respectivement. Quant aux virus RGH3N2 et virus B/Florida/4/06, aucune inhibition n'est détectée. De manière similaire pour la **modalité 4**, le traitement dans la période de pénétration présente un léger effet sur les virus B/Florida/4/06, RGH3N2 et le mutant R292K, dont seulement 5 % d'inhibition est observable. Malgré ces observations, il semble que la molécule 152 n'agit pas au cours des périodes de pré-adsorption et de pénétration du virus.

- Dans la **modalité 3**, la présence de la molécule 152 au cours de la période d'adsorption indique un effet significatif sur le virus A/Solomon Island/03/06 (H1N1) et le virus RGH3N2 (R292K), puisque l'on observe une inhibition de 35 à 40 %. Il apparaît que le traitement par la **modalité 2**, avec un prétraitement de 30 minutes, est plus efficace que celui de la **modalité 3**, particulièrement pour les virus B/Florida/4/06 (50 %), le RGH3N2 (30 %), et le RGH3N2 (R292K) (45 %). De ce fait, une interaction entre la molécule 152 et les virus au cours de la période d'adsorption est à souligner.
- De façon intéressante, l'action de la molécule 152 dans la **modalité 5**, correspondant au traitement de post-infection (de 1 à 48 h), est la plus effective. Elle présente une inhibition significative de 100 % contre tous les virus testés, à l'exception de la souche A/Brisbane/10/07. Dans cette condition, la réplication du virus A/Brisbane/10/07 (H3N2) est réduite à environ 50 %. Cependant, cette diminution peut atteindre jusqu'à 100 % en utilisant une concentration plus élevée de l'inhibiteur, à 250 µg/ml (données non présentées).

Finalement, les résultats indiquent que l'action inhibitrice de l'oligosaccharide 152 varie en fonction des traitements et des virus testés. Il est suggéré que la molécule 152 affecte fortement la période de post-infection virale, autrement dit, cet inhibiteur agit plutôt durant les étapes tardives du cycle de l'infection virale. Cette observation est concordante avec l'activité inhibitrice sur l'enzyme NA déjà obtenue. De plus, la molécule présente également une influence sur le processus d'entrée virale, ce qui est probablement une inhibition partielle.

Figure 4.4 : Essai de neutralisation de la multiplication virale au cours du temps. Cinq modalités de traitement sont décrites dans la figure (A). Les souches virales (à une dose de 30 CCID₅₀/50 µl) et la molécule 152 (62,5 µg/ml) sont introduites dans des périodes différentes en fonction de chaque modalité de traitement. **Modalité 1** : les cellules MDCK sont exposées à la molécule 152 pendant 2 heures avant de l'inoculation du virus. **Modalité 2** : le virus est pré-incubé avec la molécule 152 à 34°C pendant 30 minutes, puis ce mélange est inoculé sur les cellules dans la période d'adsorption pendant 1 heure. **Modalité 3** : le virus et l'inhibiteur 152 sont introduits simultanément sur les cellules dans la période d'adsorption pendant 1 heure. **Modalité 4** : après l'adsorption du virus, la molécule 152 est ajoutée dans la période de pénétration pendant 1 heure. **Modalité 5** : la molécule 152 est ajoutée dans la période de post-infection et incubée jusqu'à 48 heures. L'activité de l'enzyme NA dans le surnageant est déterminée après 48 heures d'incubation. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin virus dans la modalité de contrôle. Chaque point représente la valeur des quatre réplicats, les lignes représentent les valeurs moyennes.

IV.2.3. Caractérisation de l'interaction entre l'oligosaccharide 152 et la protéine HA de surface des virus de type A

Pour mieux comprendre l'interaction entre la molécule 152 et le virus, à l'étape précoce de l'infection virale, nous avons réalisé des tests basés sur la technique ELISA. Les molécules sont immobilisées au fond des puits d'une plaque, où les signaux détectés permettront de reconnaître la capacité de capturer les virus. Ce test a été mis au point en utilisant la fétuine, une glycoprotéine sialylée qui possède deux types de liaisons $\alpha(2,3)$ et $\alpha(2,6)$, entre l'acide sialique et le pénultième galactose. La présence de motifs reconnus par le virus influenza favorise la fixation de celui-ci. Trois virus de type A, A/Brisbane/10/07 (H3N2), A/Solomon Island/03/06 (H1N1), et A/Lyon-CHU/26430/03 (H3NA-), à une dose de 256 ou 512 unités hémagglutinantes (UHA) ont été utilisés. Le virus H3NA- est caractérisé par l'absence de sa protéine NA, donc aucune activité enzymatique détectée.

Une interaction en fonction de la quantité d'UHA a été mise en évidence avec l'oligosaccharide 152 pour les trois virus (**figure 4.5**). La comparaison de la capacité de fixation se base sur une absorbance moyenne de $\sim 1,0$ DO. Parmi les trois virus, la souche A/Brisbane/10/07 présente la plus faible affinité à la molécule 152, une quantité de 32

UHA est requise pour avoir une absorbance de 1,0 DO. Les autres ont besoin d'une quantité d'environ 8 UHA pour atteindre la même valeur d'absorbance. Donc l'affinité des virus A/Solomon Island/0306 et H3NA- est 4 fois plus forte que celle du virus A/Brisbane/10/07. Un profil similaire est observé pour la fétuine (**figure 4.6**). Cependant, il apparaît que l'attachement des virus à l'oligosaccharide 152 est meilleur qu'avec la fétuine. En effet, en présence de fétuine, une quantité virale de 256 UHA (A/Brisbane/10/07) ou 64 UHA (A/Solomon Island/03/06 et H3NA-) doit être utilisée pour atteindre une valeur d'absorbance de 1,0 DO.

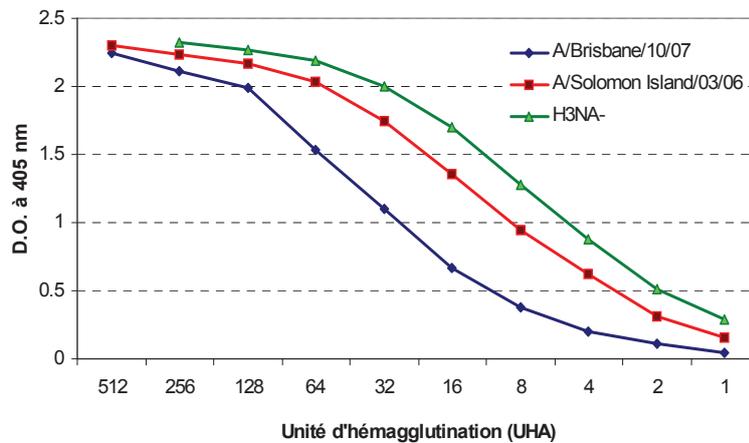


Figure 4.5 : Interaction entre les virus et l'oligosaccharide 152. Une dose virale à 256 ou 512 UHA est utilisée. Une concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ de la molécule 152 est immobilisée. L'anticorps anti-NP conjugué avec l'enzyme peroxydase est utilisé pour la détection.

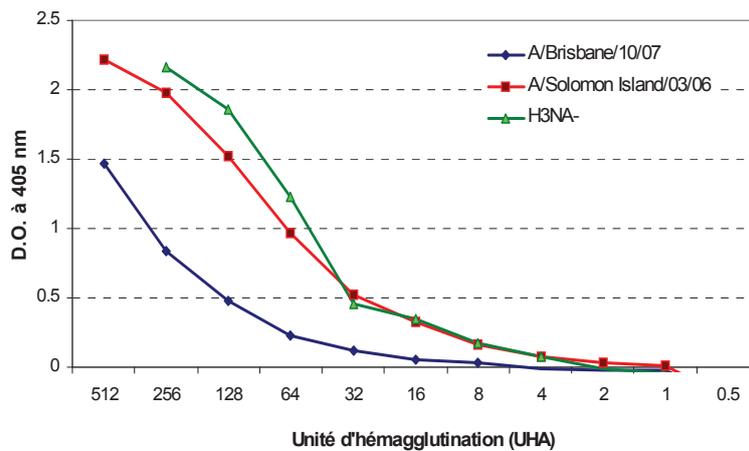


Figure 4.6 : Interaction entre les virus et la fétuine. Une dose virale à 256 ou 512 UHA est utilisée. Une concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ de la fétuine est immobilisée. L'anticorps anti-NP conjugué avec l'enzyme peroxydase est utilisé pour la détection.

A partir des résultats obtenus, nous pouvons déduire que la molécule 152 est capable d'interagir directement avec les particules virales, en particulier avec la protéine HA par le fait d'un signal positif dans le test avec la souche H3NA-.

La compétition entre l'oligosaccharide 152 et la fétuine pour capturer les particules virales a été étudiée dans un test d'ELISA compétitif. Dans ce test, la fétuine est immobilisée à une concentration de 10 µg/ml. Une dose virale qui donne une valeur d'absorbance standard de 1,0 DO est utilisée. Le virus est pré-incubé avec une série de dilution de raison 2 de l'oligosaccharide 152. Ces mélanges sont alors introduits dans les cupules avec la fétuine pré-enduite.

D'après le résultat de la **figure 4.7**, une forte compétition de 100 % a été observée pour les concentrations allant de 1,25 µg/ml à 5 µg/ml de la molécule 152 vis-à-vis des trois virus. Trois concentrations comparables de la molécule 152 sont obtenues pour atteindre une compétition de 50 % : 0,19 µg/ml (A/Brisbane/10/07), 0,21 µg/ml (A/Solomon Island/03/06), 0,27 µg/ml (H3NA-). Ces résultats montrent que l'oligosaccharide 152 est capable d'inhiber la capture du virus par la fétuine.

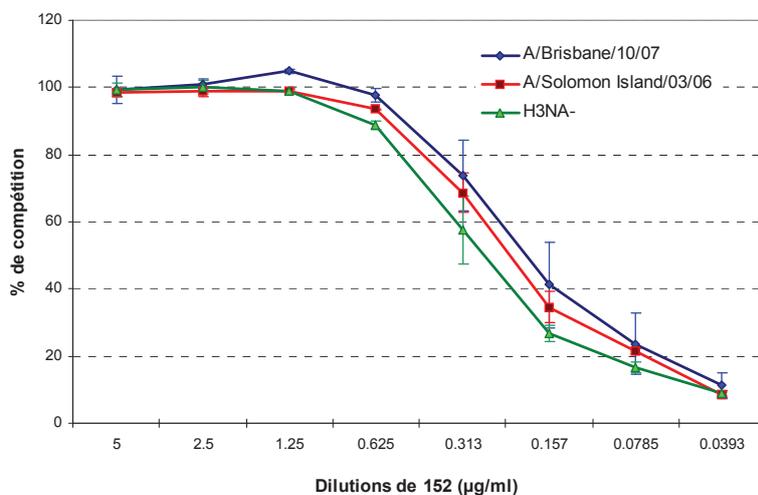


Figure 4.7 : La compétition entre l'oligosaccharide 152 et la fétuine vis-à-vis des virus de type A. Le virus est utilisé à une dose qui donne une valeur absorbance ~ 1,0 DO correspondant au test d'interaction avec la fétuine. La fétuine est immobilisée à une concentration de 10 µg/ml. La molécule 152 est diluée de raison 2 (allant de 0,0393 – 5 µg/ml). Le résultat correspond à la moyenne de deux tests.

DISCUSSION

Parmi les composés actifs identifiés, nous avons sélectionné la molécule 152, un oligosaccharide sulfaté de la famille des arabinogalactanes. Cet oligosaccharide, isolé de l'algue verte *Codium fragile*, possède un effet inhibiteur sur les virus influenza de type A et B *in vitro*. Il a été démontré que des extraits polysaccharidiques de l'espèce *C. fragile* présentent des activités anti-herpès (153, 204). Dans notre étude, l'oligosaccharide 152 ne présente pas d'effets toxiques sur les cellules MDCK aux trois concentrations testées (2,5, 25, 250 µg/ml). De plus, l'activité antivirale de la molécule 152, a été reproduite à partir de nouveaux lots de production issus d'un même procédé d'extraction (données non présentées).

Dans l'étude de neutralisation, nous avons constaté que l'oligosaccharide 152 a des effets variables en fonction des souches grippales testées. Les concentrations de l'ordre de 25 à 250 µg/ml sont efficaces pour protéger les cellules MDCK aux infections par des souches saisonnières et des souches pandémiques 2009. De plus, la molécule 152 est également efficace contre deux souches résistantes à l'oseltamivir, dont l'une porte la mutation R292K (A/H3N2) et l'autre porte la mutation H275Y (A/H1N1) au niveau de la protéine NA. Ces deux mutations sont majoritaires associées à un phénotype de résistance du sous-type N2 et du sous-type N1, et apparaissent après le traitement avec l'oseltamivir *in vivo* (102, 142) et *in vitro* (100, 129, 273). Contrairement à celle de l'oseltamivir, l'activité inhibitrice de l'oligosaccharide 152 a permis de protéger les cellules MDCK contre l'infection de la souche résistante à l'oseltamivir, RGH3N2 (R292K).

Les essais de neutralisation effectués ont démontré l'activité antigrippale de l'oligosaccharide 152. L'activité antivirale pourrait être liée à la caractéristique structurelle, le poids moléculaire, et le degré de densité de charge comme il a été déjà rapporté pour les polysaccharides sulfatés. Des études ont identifié les propriétés antivirales des polysaccharides sulfatés, principalement chez les virus HSV et HIV, et ont montré que différentes phases du cycle viral pouvaient être ciblées par ces macromolécules (308). Ces polysaccharides peuvent bloquer la fixation virale et d'autres étapes précoces du cycle de l'infection virale (5, 46, 109, 174, 194). L'hypothèse d'un mécanisme d'inhibition due à une interaction électrostatique entre la charge négative du polysaccharide sulfaté et les régions positives des protéines de surface du virus est proposée. Cette interaction, par conséquent, interfère dans le processus de l'attachement du virus aux récepteurs cellulaires. D'autre part, l'influence des polysaccharides sulfatés sur la synthèse des protéines virales (25, 94), et sur l'activité de la transcriptase inverse des rétrovirus (193) a été révélée. De

manière intéressante, la capacité d'induction d'événements intracellulaires des polysaccharides sulfatés pourrait être attribuée à leurs propriétés antivirales. Ce mécanisme a été observé dans l'étude des polysaccharides dérivés de spirulane contre le cytomégalo virus (224).

L'oligosaccharide 152 se caractérise par un poids moléculaire supérieur à 10 kDa et est chargé négativement en raison de la présence de groupements sulfates. En accord avec les études précédemment citées, les résultats obtenus nous permettent de déduire que l'oligosaccharide 152 pourrait interagir dans différentes étapes du cycle infectieux. En outre, le degré d'inhibition est également subordonné aux différents types et sous-types de virus.

La pré-incubation de l'oligosaccharide sur le tapis cellulaire avant l'addition du virus, modalité 1, n'a pas induit d'inhibition de la réplication virale. Il apparaît donc que l'oligosaccharide 152 n'interagit pas avec les cibles cellulaires de l'HA du virus influenza. Les virus de la grippe se lient à des récepteurs spécifiques portant des acides sialiques à leur extrémité terminale. Le résidu d'acide sialique, un monosaccharide de neuf carbones, est caractérisé par une charge négative produite par son groupe carboxylique ionisé au pH physiologique (287). La charge négative commune entre le récepteur cellulaire de l'HA et l'oligosaccharide 152 est sans doute responsable d'une répulsion électrostatique entre cet oligosaccharide et les régions cellulaires recouvertes par des acides sialiques.

La modalité 4 permet d'étudier l'efficacité de l'oligosaccharide 152 au cours de l'étape de pénétration dans laquelle a lieu l'internalisation virale via la voie de l'endocytose. Par la suite, le virus subit des événements de fusion et décapsidation permettant la libération des nucléocapsides dans le cytoplasme. La sous-unité HA2 de l'hémagglutinine et le canal ionique M2 sont les deux protéines virales jouant un rôle indispensable dans ces événements (36, 253). Dans le cas où la molécule 152 pourrait être impliquée dans la voie d'endocytose virale, un blocage soit de l'activité fusogénique de l'HA portée par la partie HA2 soit de l'activité de la protéine M2, conduira à une inhibition de la réplication virale. Cependant, l'absence d'inhibition significative indique que l'oligosaccharide 152 n'interfère pas avec ces événements.

Les modalités 2 et 3 nous permettent de comprendre l'influence de l'oligosaccharide 152 sur l'étape d'adsorption aux récepteurs cellulaires du virus. Sur les deux glycoprotéines de surface virale (HA et NA), la quantité des protéines HA est cinq à six fois plus important que celle des protéines NA (107, 234). L'activité de l'attachement aux sites de liaison a été mise en évidence pour l'hémagglutinine (304). Nous supposons que l'inhibition obtenue pourrait être due à l'interaction entre l'hémagglutinine et l'oligosaccharide 152. L'hypothèse de cette interaction a été confirmée en utilisant la technique de l'immobilisation et la révélation par ELISA. Dans cet essai, la molécule 152 a montré sa capacité à capturer directement les particules virales (type A), en particulier à la souche H3NA- avec une forte affinité. Le virus H3NA- est une souche isolée chez un patient atteint de la grippe, et se caractérise par la délétion entière du segment codé pour la protéine NA (191). Dans l'essai de compétition, la fétuine, une protéine porteuse naturellement des oligosaccharides sialylés, a été utilisée. La fixation de la fétuine sur un support est un modèle mimant le récepteur à la surface cellulaire pour les virus de la grippe. De ce fait, la capacité de l'oligosaccharide 152 de concurrencer et d'empêcher l'attachement du virus à la fétuine a démontré son intervention potentielle durant l'étape précoce du cycle viral.

Cependant, l'attachement du virus A/Brisbane/10/07 (H3N2) aux cellules MDCK n'est pas inhibé par la molécule 152, comme observé dans les modalités 2 et 3. La diminution de l'activité inhibitrice, dans les modalités 2 et 3, du virus A/Brisbane/10/07 (H3N2) est reliée à la faible affinité de la molécule 152 pour l'HA de ce virus.

De plus, nous supposons que la force électrostatique a une influence sur l'effet inhibiteur de l'oligosaccharide 152 sur l'HA. Selon une analyse de Huang et *al.*, 2002, l'ensemble de la sous-unité HA1 est chargée positivement, alors que la sous-unité HA2 est fondamentalement chargée négativement à pH neutre (123). La distribution hétérogène de charge pourrait entraîner une orientation électrostatique vers la sous-unité chargée positivement HA1 pour la molécule 152 de charge négative. En accord avec les inhibitions significatives obtenues dans les modalités 2 et 3, il est raisonnable de supposer une interaction potentielle entre l'oligosaccharide 152 avec un domaine spécifique à proximité du site de liaison au récepteur de la sous-unité HA1. Cette interaction pourrait se traduire par un effet d'encombrement stérique. Cependant, l'activité antivirale varie selon le type et le sous-type de virus influenza. Cela peut être dû aux différentes caractéristiques de structures des HA de différentes souches virales et à la variabilité des régions

électrostatiques au sein de ces glycoprotéines (198), entraînant une forte ou une faible affinité pour l'oligosaccharide 152. D'autre part, on pourrait en déduire que l'obtention de l'inhibition observée au cours de la modalité 2, qui est caractérisée par une étape de pré-incubation de virus et de composé, est généralement plus efficace que celle de la modalité 3 non prétraitée. Il est possible que dans l'état de l'inoculation simultanée, l'affinité des protéines HA pour le récepteur naturel est sans doute supérieure à l'affinité de l'HA pour la molécule 152. En conséquence, la modalité de prétraitement donne un avantage en favorisant l'interaction entre virus et composé. Le même degré d'inhibition observé dans la modalité 2 pour les deux souches RGH3N2 et RGH3N2 (R292K), qui ne diffèrent que par la propriété de la protéine NA, montre une interaction préférentielle de l'oligosaccharide 152 pour l'HA, au cours de l'étape précoce du cycle infectieux.

La comparaison de l'activité inhibitrice de la molécule 152 vis-à-vis des virus H1N1 pandémiques et le virus A/St-Etienne/1691/09 (H1N1) porteur de la mutation D222G montre une diminution de l'efficacité de cette molécule vis-à-vis du virus A/St-Etienne/1691/09. Ce type de mutation a été isolé principalement chez des cas graves au cours de la pandémie 2009 (138, 172). Des études *in vitro* ont montré que la substitution D222G peut augmenter l'affinité de la protéine HA à la liaison de type $\alpha(2,3)$ du récepteur cellulaire tout en conservant une affinité à la liaison de type $\alpha(2,6)$, affinité préférentielle des virus humains. L'augmentation de l'activité pour des liaisons de types $\alpha(2,3)$ semble donc influencer le degré d'activité antivirale de la molécule 152. Une étude de neutralisation en présence de cellules exprimant préférentiellement l'un ou l'autre type de liaison favoriserait la compréhension du mécanisme d'interaction et d'inhibition de la molécule 152.

Parmi les 5 modalités réalisées, l'effet inhibiteur le plus efficace est obtenu au cours du traitement tardif de l'infection décrit dans la modalité 5. Le traitement décrit dans la modalité 5, exclut une interaction entre la molécule 152 et l'HA au cours du premier cycle infectieux. Cependant, cette interaction peut être considérée à partir du second cycle infectieux, en raison du maintien de la molécule 152 dans le milieu de culture. L'activité inhibitrice partielle observée durant l'étape précoce de l'infection ne justifie pas l'inhibition complète observée. Il a été démontré que la protéine NA joue un rôle indispensable dans la libération et la propagation des virions néoformés (207). De plus, l'inhibition de l'activité neuraminidase par la molécule 152 a présenté une interaction

significative de la molécule 152 avec les protéines NA. Nous suggérons que la protéine NA représente donc une seconde cible potentielle de la molécule 152. Dans le test d'inhibition de l'activité enzymatique, il apparaît que l'activité de la neuraminidase du virus RGH3N2 (R292K) et A/Lyon-CHU/48-4251/09 (H275Y) est moins sensible à l'oligosaccharide 152. Cependant, comme la valeur d'inhibition de la NA de la souche A/Lyon-CHU/48-4251/09 reste inférieure à celle de la souche A/Solomon Island/03/06, ce mutant H275Y est considéré également sensible à la molécule 152. Bien que la présence de la mutation R292K ait induit une diminution de la sensibilité vis-à-vis de la molécule 152 de 20 fois par rapport au virus sensible, nous ne pouvons pas conclure en une résistance croisée induite par les mutations H275Y ou R292K. Ces résultats indiquent un avantage du mode d'action complexe de l'oligosaccharide 152 qui cible principalement deux glycoprotéines virales. Cette forte interaction contribue à l'activité antivirale de la molécule 152 dans la phase tardive du cycle viral. La synthèse de ces résultats montre que les inhibitions obtenues varient en fonction des souches virales et reposent principalement sur l'interaction de l'oligosaccharide 152 avec la protéine HA et la protéine NA.

L'interaction de la molécule 152 avec les deux glycoprotéines de surface du virus influenza, l'HA et la NA, apparaît comme un mécanisme antiviral d'intérêt. Ce mécanisme a déjà été observé pour des protéines de l'immunité innée comme le surfactant D et des lectines liant le mannose (134, 275). D'autre part, des molécules synthétiques dérivées de l'acide sialique ont également présentés cette double activité antivirale (104). Enfin, la povidone-iodine a présenté une activité similaire avec une capacité d'inhibition des étapes dans la phase précoce et dans la phase tardive du cycle infectieux (261). Le développement des inhibiteurs multifonctionnels apparaît donc comme une stratégie d'intérêt pour le développement de nouveaux moyens thérapeutiques contre le virus de la grippe.

En conclusion, l'oligosaccharide 152 présente un mode d'action ciblant les étapes de la phase précoce et de la phase tardive du cycle infectieux. La variation de l'efficacité observée, en fonction du type et du sous-type virale considérés, incite à mieux définir les zones de l'oligosaccharide qui interagissent avec les glycoprotéines. La définition de cette structure favorise par la suite le développement de molécules synthétiques dérivées de cette structure parentale afin d'augmenter l'activité antivirale de cet oligosaccharide.

CONCLUSION

L'activité des polysaccharides et oligosaccharides, 245 composés au total, a été mise en évidence vis-à-vis des deux virus d'épreuves de type A et B. L'ensemble de ces résultats montrent que les polysaccharides testés sont plus actifs vis-à-vis du virus d'épreuve de type B que de type A. L'activité des molécules sont variables en fonction de la dose virale et de la concentration testée. La robustesse du procédé de purification a été mise en évidence par la reproduction des résultats à partir de différents lots de production.

Les 13 molécules actives vis-à-vis des deux types de virus d'épreuves et répondant aux critères de sélection se répartissent dans 7 des 20 familles de sucres testées. Parmi ces 7 familles :

- Deux familles sont isolées des plantes aquatiques : les apiogalacturonanes, les hétéroglycanes sulfatés
- Cinq familles proviennent d'algues :
 - Algue verte : les arabinogalactanes, les ulvanes
 - Algue brune : les fucanes, les galactofucanes
 - Algue rouge : les carraghénanes

Les molécules actives sont plus largement représentées dans 4 familles de sucres : les arabinogalactanes, les apiogalacturonanes, les fucanes, les galactofucanes.

L'activité biologique soulignée s'ajoute pour la plupart à un potentiel thérapeutique déjà rapportés. La mise en évidence d'une activité antigrippale pour ces 4 familles revêt un caractère « d'invention » pour les arabinogalactanes et les apiogalacturonanes puisque cette capacité biologique n'a jamais été décrite. Pour les fucanes et galactofucanes nous confirmons l'activité antivirale de ces molécules sur une espèce nouvelle, le virus influenza.

Bien qu'il n'y ait pas encore de données pour analyser une corrélation directe entre le degré de charge ou de sulfatation et une activité antivirale, les résultats obtenus soulignent une influence de la charge électrostatique sur l'activité antivirale. Les molécules actives appartiennent aux groupes soit sulfatés soit chargés. Parmi les 20 familles de sucres testées, on dénombre 9 familles « sulfatées », 2 familles « chargées », et 9 familles « neutres ».

- Les apiogalacturonanes, appartenant à la famille chargée, présentent une bonne activité vis-à-vis des deux virus d'épreuve.
- Six des 9 familles sulfatées présentent une activité antivirale correspondant aux critères de sélection. Cependant, la majorité des molécules répartissent dans 3 familles : les arabinogalactanes, les fucanes, les galactofucanes.
- Les sucres considérés comme neutres (74 molécules) ne présentent pas d'activité antivirale ou possèdent une activité ne répondant pas aux critères de sélection établis.

Par ailleurs, une relation « structure - composition - charge - activité » pourrait être déduite. Cette hypothèse s'appuie sur les études rapportées et la comparaison de l'activité des molécules entre différentes familles, d'espèces d'origine, et l'état de purification dans notre étude. La compréhension et combinaison des caractéristiques favorables permettront d'établir de meilleures molécules antivirales.

- Les arabinogalactanes et les apiogalacturonanes sont les 2 familles les plus actives. Toutes les deux sont des hétéropolysaccharides de type pectine, dont plusieurs activités biologiques ont été documentées. Les apiogalacturonanes se caractérisent par une propriété acide avec des groupements carboxylates chargés négativement, et par des chaînes latérales d'apioses. Les arabinogalactanes, quant à eux, sont également des polysaccharides acides et comportent des chaînes latérales d'arabinogalactanes et des groupements sulfates.
- La plupart des molécules actives sont des polysaccharides natifs. Les molécules à l'état de polysaccharide séparé et d'oligosaccharide sont moins actives ou n'ont plus d'activité, à l'exception de certains cas comme pour l'oligosaccharide 152.

L'oligosaccharide 152 qui appartient à la famille des arabinogalactanes, de l'algue verte *Codium fragile*, a été choisi pour l'évaluation son activité inhibitrice et pour définir le mode d'action de cet oligosaccharide par la caractérisation de la cible virale ainsi que l'étape du cycle infectieux inhibée.

- L'activité neutralisante de l'oligosaccharide 152 a été évaluée par un panel de 6 souches virales, dont 3 souches saisonnières (A/H3N2, A/H1N1, B), 3 souches pandémiques 2009 (A/H1N1).
- La capacité protectrice de l'oligosaccharide 152 vis-à-vis des deux souches résistantes à l'oseltamivir, dont le mutant H275Y du sous-type N1 et le mutant R292K du sous-type N2, montre l'absence de résistance croisée.
- L'oligosaccharide 152 a présenté un mode d'action qui intervient dans la phase précoce et dans la phase tardive du cycle infectieux. Il apparaît que cet oligosaccharide cible les deux glycoprotéines de surface du virus influenza, réduisant de ce fait la probabilité d'émergence de mutation de résistance.

De façon générale, les oligo/polysaccharides, caractérisés par une disponibilité en abondance, une diversité structurale, par de grandes variétés, et de nombreuses activités biologiques, sont une source de biodiversité potentielle pour la recherche d'une nouvelle classe d'antiviral. Notre étude a, donc, permis de souligner une activité antigrippale à développer pour ces macromolécules.

PERSPECTIVES

Afin d'évaluer les propriétés antigrippales des molécules obtenues, les étapes suivantes sont proposées en perspectives :

- Ces premiers résultats confirment l'intérêt à apporter aux activités biologiques des oligo/polysaccharides, dans le domaine anti-infectieux.
- La recherche des molécules possédant l'activité similaire à la molécule 152 active vis-à-vis des deux glycoprotéines de surface semble donc d'intérêt. Il apparaît que le développement des antiviraux de multiples activités est une stratégie intéressante permettant de réduire l'émergence des virus résistants.
- Une confirmation de l'activité *in vitro* par des études *in vivo* de protection doit être effectuée. Le modèle murin sera primitivement utilisé pour l'étude des sucres d'intérêt *in vivo*. Les sucres seront administrés par voie intranasale, à des souris préalablement infectées également par voie nasale, afin de tester la capacité de neutralisation des molécules actives. La transposition du modèle murin vers le modèle furet pourra être envisagée.
- L'analyse et la comparaison des différentes structures entre les molécules actives et inactives, ainsi que leurs états de purification afin d'identifier le domaine structurel de type antiviral. L'identification d'un motif spécifique permettra d'affiner la structure active et facilitera la reproduction de cette dernière. Ceci permet d'éviter la dépendance d'une source de matière première et sa variabilité.
- Le développement de molécules synthétiques dérivées de la structure parentale d'intérêt pour améliorer leur capacité antivirale. Cela est nécessaire afin d'augmenter la constante de dissociation entre la molécule et la cible virale. De plus, la biodisponibilité des candidats d'intérêt peut être modifiée afin d'améliorer les pharmacocinétiques des médicaments.
- L'élargissement du spectre d'activité sur les virus de la grippe aviaire (H5N1, H7N7...) et d'autres virus respiratoires tels que les paramyxovirus, adénovirus, coronavirus (le coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS))...

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abad Martinez, M. J., L. M. B. Del Olmo, and P. B. Benito.** 2005. Antiviral activities of polysaccharides from natural sources, p. 393-418. *In* R. Atta ur (ed.), *Studies in Natural Products Chemistry*, vol. 30. Elsevier.
2. **Abe, Y., E. Takashita, K. Sugawara, Y. Matsuzaki, Y. Muraki, and S. Hongo.** 2004. Effect of the addition of oligosaccharides on the biological activities and antigenicity of influenza A/H3N2 virus hemagglutinin. *Journal of Virology* **78**:9605-9611.
3. **Akarsu, H., W. P. Burmeister, C. Petosa, I. Petit, C. W. Müller, R. W. H. Ruigrok, and F. Baudin.** 2003. Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2). *The EMBO Journal* **22**:4646-4655.
4. **Appleyard, G.** 1977. Amantadine-resistance as a genetic marker for influenza viruses. *Journal of General Virology* **36**:249-255.
5. **Baba, M., R. Pauwels, J. Balzarini, J. Arnout, J. Desmyter, and E. De Clercq.** 1988. Mechanism of inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on replication of human immunodeficiency virus in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**:6132-6136.
6. **Babu, Y. S., P. Chand, S. Bantia, P. Kotian, A. Dehghani, Y. El-Kattan, T. H. Lin, T. L. Hutchison, A. J. Elliott, and C. D. Parker.** 2000. BCX-1812 (RWJ-270201): discovery of a novel, highly potent, orally active, and selective influenza neuraminidase inhibitor through structure-based drug design. *Journal of Medicinal Chemistry* **43**:3482-3486.
7. **Baenziger, J. U., and D. Fiete.** 1979. Structure of the complex oligosaccharides of fetuin. *Journal of Biological Chemistry* **254**:789-795.
8. **Bantia, S., C. S. Arnold, C. D. Parker, R. Upshaw, and P. Chand.** 2006. Anti-influenza virus activity of peramivir in mice with single intramuscular injection. *Antiviral Research* **69**:39-45.
9. **Barman, S., and D. P. Nayak.** 2000. Analysis of the transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II transmembrane glycoprotein, for apical sorting and raft association. *Journal of Virology* **74**:6538-6545.
10. **Barroso, L., J. Treanor, L. Gubareva, and F. G. Hayden.** 2005. Efficacy and tolerability of the oral neuraminidase inhibitor peramivir in experimental human influenza: randomized, controlled trials for prophylaxis and treatment. *Antiviral therapy* **10**:901-910.
11. **Barth, H., E. K. Schnober, F. Zhang, R. J. Linhardt, E. Depla, B. Boson, F.-L. Cosset, A. H. Patel, H. E. Blum, and T. F. Baumert.** 2006. Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction. *Journal of Virology* **80**:10579-10590.
12. **Bartlett, A. H., and P. W. Park.** 2010. Proteoglycans in host-pathogen interactions: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Reviews in Molecular Medicine* **12**:e5.
13. **Baudin, F., C. Bach, S. Cusack, and R. Ruigrok.** 1994. Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *The EMBO Journal* **13**:3158-3165.
14. **Baudin, F., I. Petit, W. Weissenhorn, and R. W. H. Ruigrok.** 2001. In vitro dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein. *Virology* **281**:102-108.

15. **Baum, L. G., and J. C. Paulson.** 1991. The N2 neuraminidase of human influenza virus has acquired a substrate specificity complementary to the hemagglutinin receptor specificity. *Virology* **180**:10-15.
16. **Belser, J. A., X. Lu, K. J. Szretter, X. Jin, L. M. Aschenbrenner, A. Lee, S. Hawley, M. P. Malakhov, M. Yu, and F. Fang.** 2007. DAS181, a novel sialidase fusion protein, protects mice from lethal avian influenza H5N1 virus infection. *The Journal of Infectious Diseases* **196**:1493-1499.
17. **Belshe, R. B., M. H. Smith, C. B. Hall, R. Betts, and A. J. Hay.** 1988. Genetic basis of resistance to rimantadine emerging during treatment of influenza virus infection. *Journal of Virology* **62**:1508-1512.
18. **Belshe, R. B.** 2005. The origins of pandemic influenza - Lessons from the 1918 virus. *The New England Journal of Medicine* **353**:2209-2211.
19. **Berendt, R. F., J. S. Walker, J. W. Dominik, and E. L. Stephen.** 1977. Response of influenza virus-infected mice to selected doses of ribavirin administered intraperitoneally or by aerosol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **11**:1069-1070.
20. **Bergefall, K., E. Trybala, M. Johansson, T. Uyama, S. Naito, S. Yamada, H. Kitagawa, K. Sugahara, and T. Bergström.** 2005. Chondroitin sulfate characterized by the E-disaccharide unit is a potent inhibitor of herpes simplex virus infectivity and provides the virus binding sites on gro2C cells. *Journal of Biological Chemistry* **280**:32193-32199.
21. **Berger, E. A., P. M. Murphy, and J. M. Farber.** 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: Roles in viral entry, tropism, and disease. *Annual Review of Immunology* **17**:657-700.
22. **Berteau, O., and B. Mulloy.** 2003. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology* **13**:29R-40R.
23. **Betakova, T., M. V. Nermut, and A. J. Hay.** 1996. The NB protein is an integral component of the membrane of influenza B virus. *Journal of General Virology* **77**:2689-2694.
24. **Bewley, C. A.** 2008. Illuminating the switch in influenza viruses. *Nature Biotechnology* **26**:60-62.
25. **Biesert, L., M. Adamski, G. Zimmer, H. Suhartono, J. Fuchs, U. Unkelbach, R. J. Mehlhorn, K. Hideg, R. Milbradt, and H. Rübsamen-Waigmann.** 1990. Anti-human immunodeficiency virus (HIV) drug HOE/BAY 946 increases membrane hydrophobicity of human lymphocytes and specifically suppresses HIV-protein synthesis. *Medical Microbiology and Immunology* **179**:307-321.
26. **Biswas, S. K., and D. P. Nayak.** 1994. Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. *Journal of Virology* **68**:1819-1826.
27. **Biswas, S. K., P. L. Boutz, and D. P. Nayak.** 1998. Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *The Journal of Virology* **72**:5493-5501.
28. **Bodian, D. L., R. B. Yamasaki, R. L. Buswell, J. F. Stearns, J. M. White, and I. D. Kuntz.** 1993. Inhibition of the fusion-inducing conformational change of influenza hemagglutinin by benzoquinones and hydroquinones. *Biochemistry* **32**:2967-2978.

29. **Bosch, F. X., W. Garten, H. D. Klenk, and R. Rott.** 1981. Proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinins: primary structure of the connecting peptide between HA1 and HA2 determines proteolytic cleavability and pathogenicity of avian influenza viruses. *Virology* **113**:725-735.
30. **Bottcher, E., T. Matrosovich, M. Beyerle, H. D. Klenk, W. Garten, and M. Matrosovich.** 2006. Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *Journal of Virology* **80**:9896-9898.
31. **Braam, J., I. Ulmanen, and R. M. Krug.** 1983. Molecular model of a eucaryotic transcription complex: Functions and movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription. *Cell* **34**:611-618.
32. **Brady, M. T., S. D. Sears, D. L. Pacini, R. Samorodin, J. DePamphilis, M. Oakes, W. Soo, and M. L. Clements.** 1990. Safety and prophylactic efficacy of low-dose rimantadine in adults during an influenza A epidemic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **34**:1633-1636.
33. **Brassard, D. L., G. P. Leser, and R. A. Lamb.** 1996. Influenza B virus NB glycoprotein is a component of the virion. *Virology* **220**:350-360.
34. **Bright, R. A., M. Medina, X. Xu, G. Perez-Oronoz, T. R. Wallis, X. M. Davis, L. Povinelli, N. J. Cox, and A. I. Klimov.** 2005. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *The Lancet* **366**:1175-1181.
35. **Bright, R. A., D. K. Shay, B. Shu, N. J. Cox, and A. I. Klimov.** 2006. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. *JAMA* **295**:891-894.
36. **Cady, S. D., W. Luo, F. Hu, and M. Hong.** 2009. Structure and function of the influenza A M2 proton channel. *Biochemistry* **48**:7356-7364.
37. **Calfee, D. P., A. W. Peng, L. M. Cass, M. Lobo, and F. G. Hayden.** 1999. Safety and efficacy of intravenous zanamivir in preventing experimental human influenza A virus infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**:1616-1620.
38. **Chang, H., F. Samaniego, B. Nair, L. Buonaguro, and B. Ensoli.** 1997. HIV-1 Tat protein exits from cells via a leaderless secretory pathway and binds to extracellular matrix-associated heparan sulfate proteoglycans through its basic region. *AIDS* **11**:1421-1431.
39. **Chattopadhyay, K., U. Adhikari, P. Lerouge, and B. Ray.** 2007. Polysaccharides from *Caulerpa racemosa*: Purification and structural features. *Carbohydrate Polymers* **68**:407-415.
40. **Chen, W., P. A. Calvo, D. Malide, J. Gibbs, U. Schubert, I. Bacik, S. Basta, R. O'Neill, J. Schickli, and P. Palese.** 2001. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nature Medicine* **7**:1306-1312.
41. **Chen, Z., S.-e. Kadowaki, Y. Hagiwara, T. Yoshikawa, K. Matsuo, T. Kurata, and S.-i. Tamura.** 2000. Cross-protection against a lethal influenza virus infection by DNA vaccine to neuraminidase. *Vaccine* **18**:3214-3222.
42. **Coleman, J. R.** 2007. The PB1-F2 protein of Influenza A virus: increasing pathogenicity by disrupting alveolar macrophages. *Virology Journal* **4**.
43. **Colman, P. M., J. N. Varghese, and W. G. Laver.** 1983. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* **303**:41-44.

44. **Compans, R. W.** 1972. Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *Journal of Virology* **10**:795-800.
45. **Connor, R. J., Y. Kawaoka, R. G. Webster, and J. C. Paulson.** 1994. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* **205**:17-23.
46. **Copeland, R., A. Balasubramaniam, V. Tiwari, F. Zhang, A. Bridges, R. J. Linhardt, D. Shukla, and J. Liu.** 2008. Using a 3-O-sulfated heparin octasaccharide to inhibit the entry of herpes simplex virus type 1. *Biochemistry* **47**:5774-5783.
47. **Couceiro, J. N. S. S., J. C. Paulson, and L. G. Baum.** 1993. Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Research* **29**:155-165.
48. **Cros, J. F., A. Garcia-Sastre, and P. Palese.** 2005. An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. *Traffic* **6**:205-213.
49. **Davies, W. L., R. R. Grunert, R. F. Haff, J. W. McGahen, E. M. Neumayer, M. Paulshock, J. C. Watts, T. R. Wood, E. C. Hermann, and C. E. Hoffmann.** 1964. Antiviral activity of 1-adamantanamine (Amantadine). *Science* **144**:862-863.
50. **De Clercq, E.** 2001. Molecular targets for antiviral agents. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **297**:1-10.
51. **De Clercq, E.** 2006. Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nature Reviews Drug Discovery* **5**:1015-1025.
52. **de Jong, M. D., T. T. Thanh, T. H. Khanh, V. M. Hien, G. J. D. Smith, N. V. Chau, B. V. Cam, P. T. Qui, D. Q. Ha, Y. Guan, J. S. M. Peiris, T. T. Hien, and J. Farrar.** 2005. Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection. *The New England Journal of Medicine* **353**:2667-2672.
53. **de la Luna, S., P. Fortes, A. Beloso, and J. Ortin.** 1995. Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs. *Journal of Virology* **69**:2427-2433.
54. **de Witte, L., M. Bobardt, U. Chatterji, G. Degeest, G. David, T. B. H. Geijtenbeek, and P. Gallyay.** 2007. Syndecan-3 is a dendritic cell-specific attachment receptor for HIV-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**:19464-19469.
55. **Deshpande, K. L., V. A. Fried, M. Ando, and R. G. Webster.** 1987. Glycosylation affects cleavage of an H5N2 influenza virus hemagglutinin and regulates virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**:36-40.
56. **Deyde, V. M., X. Xu, R. A. Bright, M. Shaw, C. B. Smith, Y. Zhang, Y. Shu, L. V. Gubareva, N. J. Cox, and A. I. Klimov.** 2007. Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A (H3N2) and A (H1N1) viruses isolated worldwide. *The Journal of Infectious Diseases* **196**:249-257.
57. **Domingo, E., and J. J. Holland.** 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual Review of Microbiology* **51**:151-178.
58. **Draget, K. I., O. Smidsrod, and G. Skjak-Braek.** 2002. Alginates from algae. *Biopolymers* **6**:215-244.

59. **Drzeniek, R.** 1973. Substrate specificity of neuraminidases. *The Histochemical Journal* **5**:271-290.
60. **Dutkowski, R.** 2010. Oseltamivir in seasonal influenza: cumulative experience in low-and high-risk patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **65 (suppl 2)**:ii11-ii24.
61. **Dwek, R. A.** 1996. Glycobiology: Toward understanding the function of sugars. *Chemical Reviews* **96**:683-720.
62. **Eccles, R., C. Meier, M. Jawad, R. Weinmullner, A. Grassauer, and E. Prieschl-Grassauer.** 2010. Efficacy and safety of an antiviral Iota-Carrageenan nasal spray: a randomized, double-blind, placebo-controlled exploratory study in volunteers with early symptoms of the common cold. *Respiratory Research* **11**:108.
63. **Eckert, D. M., and P. S. Kim.** 2001. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annual Review of Biochemistry* **70**:777-810.
64. **Eichelberger, M. C., A. Hassantoufighi, M. Wu, and M. Li.** 2008. Neuraminidase activity provides a practical read-out for a high throughput influenza antiviral screening assay. *Virology journal* **5**:109.
65. **Eister, C., K. Larsen, J. Gagnon, R. W. Ruigrok, and F. Baudin.** 1997. Influenza virus M1 protein binds to RNA through its nuclear localization signal. *Journal of General Virology* **78**:1589-1596.
66. **Elliott, M.** 2001. Zanamivir: from drug design to the clinic. *Philosophical Transactions B* **356**:1885-1893.
67. **Elton, D., E. Medcalf, K. Bishop, and P. Digard.** 1999. Oligomerization of the influenza virus nucleoprotein: identification of positive and negative sequence elements. *Virology* **260**:190-200.
68. **Elton, D., L. Medcalf, K. Bishop, D. Harrison, and P. Digard.** 1999. Identification of amino acid residues of influenza virus nucleoprotein essential for RNA binding. *Journal of Virology* **73**:7357-7367.
69. **Eriksson, B., E. Helgstrand, N. G. Johansson, A. Larsson, A. Misiorny, J. O. Noren, L. Philipson, K. Stenberg, G. Stening, and S. Stridh.** 1977. Inhibition of influenza virus ribonucleic acid polymerase by ribavirin triphosphate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **11**:946-951.
70. **Ernst, B., and J. L. Magnani.** 2009. From carbohydrate leads to glycomimetic drugs. *Nature Review Drug Discovery* **8**:661-677.
71. **Estevez, J. M., P. V. Fernández, L. Kasulin, P. Dupree, and M. Ciancia.** 2009. Chemical and in situ characterization of macromolecular components of the cell walls from the green seaweed *Codium fragile*. *Glycobiology* **19**:212-228.
72. **Ferraris, O., N. Kessler, and B. Lina.** 2005. Sensitivity of influenza viruses to zanamivir and oseltamivir: A study performed on viruses circulating in France prior to the introduction of neuraminidase inhibitors in clinical practice. *Antiviral Research* **68**:43-48.
73. **Feyzi, E., E. Trybala, T. Bergström, U. Lindahl, and D. Spillmann.** 1997. Structural requirement of heparan sulfate for interaction with herpes simplex virus type 1 virions and isolated glycoprotein C. *Journal of Biological Chemistry* **272**:24850-24857.
74. **Fitch, W. M., J. M. Leiter, X. Q. Li, and P. Palese.** 1991. Positive Darwinian evolution in human influenza A viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**:4270-4274.

75. **Flumadine® (rimantadine) (package insert)**. 2000. St. Louis, MO: Forest Pharmaceuticals.
Disponible sur : www.fda.gov/cder/foi/label/2001/19650S4lbl.pdf.
76. **Fodor, E., M. Crow, L. J. Mingay, T. Deng, J. Sharps, P. Fechter, and G. G. Brownlee**. 2002. A Single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase inhibits endonucleolytic cleavage of capped RNAs. *Journal of Virology* **76**:8989-9001.
77. **Fodor, E., and M. Smith**. 2004. The PA subunit is required for efficient nuclear accumulation of the PB1 subunit of the influenza A virus RNA polymerase complex. *Journal of Virology* **78**:9144-9153.
78. **Fouchier, R. A. M., P. M. Schneeberger, F. W. Rozendaal, J. M. Broekman, S. A. G. Kemink, V. Munster, T. Kuiken, G. F. Rimmelzwaan, M. Schutten, G. J. J. van Doornum, G. Koch, A. Bosman, M. Koopmans, and A. D. M. E. Osterhaus**. 2004. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:1356-1361.
79. **Fouchier, R. A. M., V. Munster, A. Wallensten, T. M. Bestebroer, S. Herfst, D. Smith, G. F. Rimmelzwaan, B. Olsen, and A. D. M. E. Osterhaus**. 2005. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *Journal of Virology* **79**:2814 - 2822.
80. **Furuta, Y., K. Takahashi, Y. Fukuda, M. Kuno, T. Kamiyama, K. Kozaki, N. Nomura, H. Egawa, S. Minami, and Y. Watanabe**. 2002. In vitro and in vivo activities of anti-influenza virus compound T-705. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**:977-981.
81. **Furuta, Y., K. Takahashi, M. Kuno-Maekawa, H. Sangawa, S. Uehara, K. Kozaki, N. Nomura, H. Egawa, and K. Shiraki**. 2005. Mechanism of action of T-705 against influenza virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**:981-986.
82. **Gagneux, P., and A. Varki**. 1999. Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology* **9**:747-755.
83. **Gambaryan, A., S. Yamnikova, D. Lvov, A. Tuzikov, A. Chinarev, G. Pazynina, R. Webster, M. Matrosovich, and N. Bovin**. 2005. Receptor specificity of influenza viruses from birds and mammals: new data on involvement of the inner fragments of the carbohydrate chain. *Virology* **334**:276-283.
84. **Gambaryan, A., A. Tuzikov, G. Pazynina, N. Bovin, A. Balish, and A. Klimov**. 2006. Evolution of the receptor binding phenotype of influenza A (H5) viruses. *Virology* **344**:432-438.
85. **Gambaryan, A. S., A. B. Tuzikov, V. E. Piskarev, S. S. Yamnikova, D. K. Lvov, J. S. Robertson, N. V. Bovin, and M. N. Matrosovich**. 1997. Specification of receptor-binding phenotypes of influenza virus isolates from different hosts using synthetic sialylglycopolymers: non-egg-adapted human H1 and H3 influenza A and influenza B viruses share a common high binding affinity for 6 -sialyl (N-acetyllactosamine). *Virology* **232**:345-350.
86. **García-Sastre, A., A. Egorov, D. Matasov, S. Brandt, D. E. Levy, J. E. Durbin, P. Palese, and T. Muster**. 1998. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* **252**:324-330.
87. **Garrett, R. H., and C. M. Grisham**. 2008. *Biochemistry*. Chapter 7: Carbohydrate, p. 209-237. Saunders College Publishing, New York.

88. **Gastaminza, P., B. Perales, A. M. Falcon, and J. Ortin.** 2003. Mutations in the N-terminal region of influenza virus PB2 protein affect virus RNA replication but not transcription. *Journal of Virology* **77**:5098-5108.
89. **Ghate, A. A., and G. M. Air.** 1999. Influenza type B neuraminidase can replace the function of type A neuraminidase. *Virology* **264**:265-277.
90. **Ghosh, T., K. Chattopadhyay, M. Marschall, P. Karmakar, P. Mandal, and B. Ray.** 2009. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: from structure-activity analysis to clinical evaluation. *Glycobiology* **19**:2-15.
91. **Gilbert, B. E., S. Z. Wilson, V. Knight, R. Couch, J. M. Quarles, L. Dure, N. Hayes, and G. Willis.** 1985. Ribavirin small-particle aerosol treatment of infections caused by influenza virus strains A/Victoria/7/83 (H1N1) and B/Texas/1/84. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **27**:309-313.
92. **Girard, M. P., J. S. Tam, O. M. Assossou, and M. P. Kieny.** 2010. The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review. *Vaccine* **28**:4895-4902.
93. **Gloaguen, V., V. Brudieux, B. Closs, A. Barbat, P. Krausz, O. Sainte-Catherine, M. Kraemer, E. Maes, and Y. Guerardel.** 2010. Structural characterization and cytotoxic properties of an apiose-rich pectic polysaccharide obtained from the cell wall of the marine phanerogam *Zostera marina*. *Journal of Natural Products* **73**:1087-1092.
94. **González, M. E., B. Alarcon, and L. Carrasco.** 1987. Polysaccharides as antiviral agents: antiviral activity of carrageenan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **31**:1388-1393.
95. **González, S., T. Zurcher, and J. Ortin.** 1996. Identification of two separate domains in the influenza virus PB1 protein involved in the interaction with the PB2 and PA subunits: a model for the viral RNA polymerase structure. *Nucleic Acids Research* **24**:4456-4463.
96. **González, S., and J. Ortin.** 1999. Characterization of influenza virus PB1 protein binding to viral RNA: two separate regions of the protein contribute to the interaction domain. *Journal of Virology* **73**:631-637.
97. **González, S., and J. Ortín.** 1999. Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates. *The EMBO Journal* **18**:3767-3775.
98. **Govorkova, E. A., I. A. Leneva, O. G. Goloubeva, K. Bush, and R. G. Webster.** 2001. Comparison of efficacies of RWJ-270201, zanamivir, and oseltamivir against H5N1, H9N2, and other avian influenza viruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**:2723-2732.
99. **Grassauer, A., R. Weinmuellner, C. Meier, A. Pretsch, E. Prieschl-Grassauer, and H. Unger.** 2008. Iota-Carrageenan is a potent inhibitor of rhinovirus infection. *Virology journal* **5**:107.
100. **Gubareva, L. V., M. J. Robinson, R. C. Bethell, and R. G. Webster.** 1997. Catalytic and framework mutations in the neuraminidase active site of influenza viruses that are resistant to 4-guanidino-Neu5Ac2en. *Journal of Virology* **71**:3385-3390.
101. **Gubareva, L. V., M. N. Matrosovich, M. K. Brenner, R. C. Bethell, and R. G. Webster.** 1998. Evidence for zanamivir resistance in an immunocompromised child infected with influenza B virus. *The Journal of Infectious Diseases* **178**:1257-1262.

102. **Gubareva, L. V., L. Kaiser, M. N. Matrosovich, Y. Soo-Hoo, and F. G. Hayden.** 2001. Selection of influenza virus mutants in experimentally infected volunteers treated with oseltamivir. *The Journal of Infectious Diseases* **183**:523-531.
103. **Gubareva, L. V.** 2004. Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Virus Research* **103**:199-203.
104. **Guo, C. T., X. L. Sun, O. Kanie, K. F. Shortridge, T. Suzuki, D. Miyamoto, K. I. Hidari, C. H. Wong, and Y. Suzuki.** 2002. An O-glycoside of sialic acid derivative that inhibits both hemagglutinin and sialidase activities of influenza viruses. *Glycobiology* **12**:183-190.
105. **Hamasuna, R., Y. Eizuru, and Y. Minamishima.** 1994. Inhibition by iota-carrageenan of the spread of murine cytomegalovirus from the peritoneal cavity to the blood plasma. *Journal of General Virology* **75**:111 - 116.
106. **Hara, K., F. I. Schmidt, M. Crow, and G. G. Brownlee.** 2006. Amino acid residues in the N-terminal region of the PA subunit of influenza A virus RNA polymerase play a critical role in protein stability, endonuclease activity, cap binding, and virion RNA promoter binding. *Journal of Virology* **80**:7789-7798.
107. **Harris, A., G. Cardone, D. C. Winkler, J. B. Heymann, M. Brecher, J. M. White, and A. C. Steven.** 2006. Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**:19123-19127.
108. **Harrison, S. C.** 2008. Viral membrane fusion. *Nature Structural & Molecular Biology* **15**:690-698.
109. **Harrop, H. A., and C. C. Rider.** 1998. Heparin and its derivatives bind to HIV-1 recombinant envelope glycoproteins, rather than to recombinant HIV-1 receptor, CD4. *Glycobiology* **8**:131-137.
110. **Hatta, M., P. Gao, P. Halfmann, and Y. Kawaoka.** 2001. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* **293**:1840-1842.
111. **Hatta, M., and Y. Kawaoka.** 2003. The NB protein of influenza B virus is not necessary for virus replication in vitro. *The Journal of Virology* **77**:6050-6054.
112. **Hauer, J., and F. A. Anderer.** 1993. Mechanism of stimulation of human natural killer cytotoxicity by arabinogalactan from *Larix occidentalis*. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **36**:237-244.
113. **Hay, A. J., A. J. Wolstenholme, J. J. Skehel, and M. H. Smith.** 1985. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *The EMBO Journal* **4**:3021-3024.
114. **Hay, A. J., V. Gregory, A. R. Douglas, and Y. P. Lin.** 2001. The evolution of human influenza viruses. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **356**:1861-1870.
115. **Hayashi, T., K. Hayashi, M. Maeda, and I. Kojima.** 1996. Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*. *Journal of Natural Products* **59**:83-87.
116. **Hayden, F. G., and B. S. Rollins.** 1997. In vitro activity of the neuraminidase inhibitor GS4071 against influenza viruses: FG Hayden and BS Rollins, University of Virginia, Charlottesville, Virginia, USA. *Antiviral Research* **34**:A86-A86.
117. **Hayden, F. G., L. V. Gubareva, A. S. Monto, T. C. Klein, M. J. Elliott, J. M. Hammond, S. J. Sharp, M. J. Ossi, and The Zanamivir Family Study Group.**

2000. Inhaled zanamivir for the prevention of influenza in families. *The New England Journal of Medicine* **343**:1282-1289.
118. **Hemmingson, J., R. Falshaw, R. Furneaux, and K. Thompson.** 2006. Structure and antiviral activity of the galactofucan sulfates extracted from *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta). *Journal of Applied Phycology* **18**:185-193.
119. **Hoffman, L. R., I. D. Kuntz, and J. M. White.** 1997. Structure-based identification of an inducer of the low-pH conformational change in the influenza virus hemagglutinin: irreversible inhibition of infectivity. *Journal of Virology* **71**:8808-8820.
120. **Horimoto, T., K. Nakayama, S. P. Smeekens, and Y. Kawaoka.** 1994. Proprotein-processing endoproteases PC6 and furin both activate hemagglutinin of virulent avian influenza viruses. *Journal of Virology* **68**:6074-6078.
121. **Hosoya, M., J. Balzarini, S. Shigeta, and E. De Clercq.** 1991. Differential inhibitory effects of sulfated polysaccharides and polymers on the replication of various myxoviruses and retroviruses, depending on the composition of the target amino acid sequences of the viral envelope glycoproteins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**:2515-2520.
122. **Hosoya, M., S. Matsuyama, M. Baba, H. Suzuki, and S. Shigeta.** 1992. Effects of protease inhibitors on replication of various myxoviruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **36**:1432-1436.
123. **Huang, Q., R. Opitz, E.-W. Knapp, and A. Herrmann.** 2002. Protonation and stability of the globular domain of influenza virus hemagglutinin. *Biophysical Journal* **82**:1050-1058.
124. **Hurt, A. C., J. Ernest, Y.-M. Deng, P. Iannello, T. G. Besselaar, C. Birch, P. Buchy, M. Chittaganpitch, S.-C. Chiu, D. Dwyer, A. Guigon, B. Harrower, I. P. Kei, T. Kok, C. Lin, K. McPhie, A. Mohd, R. Olveda, T. Panayotou, W. Rawlinson, L. Scott, D. Smith, H. D'Souza, N. Komadina, R. Shaw, A. Kelso, and I. G. Barr.** 2009. Emergence and spread of oseltamivir-resistant A(H1N1) influenza viruses in Oceania, South East Asia and South Africa. *Antiviral Research* **83**:90-93.
125. **Hurt, A. C., J. K. Holien, M. Parker, A. Kelso, and I. G. Barr.** 2009. Zanamivir-resistant influenza viruses with a novel neuraminidase mutation. *Journal of Virology* **83**:10366-10373.
126. **Imberty, A., and A. Varrot.** 2008. Microbial recognition of human cell surface glycoconjugates. *Current Opinion in Structural Biology* **18**:567-576.
127. **Inngjerdingen, K. T., T. R. Patel, X. Chen, L. Kenne, S. Allen, G. A. Morris, S. E. Harding, T. Matsumoto, D. Diallo, H. Yamada, T. E. Michaelsen, M. Inngjerdingen, and B. S. Paulsen.** 2007. Immunological and structural properties of a pectic polymer from *glinus oppositifolius*. *Glycobiology* **17**:1299-1310.
128. **Ito, T., J. N. S. S. Couceiro, S. Kelm, L. G. Baum, S. Krauss, M. R. Castrucci, I. Donatelli, H. Kida, J. C. Paulson, R. G. Webster, and Y. Kawaoka.** 1998. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *Journal of Virology* **72**:7367-7373.
129. **Ives, J. A. L., J. A. Carr, D. B. Mendel, C. Y. Tai, R. Lambkin, L. Kelly, J. S. Oxford, F. G. Hayden, and N. A. Roberts.** 2002. The H274Y mutation in the influenza A/H1N1 neuraminidase active site following oseltamivir phosphate treatment leave virus severely compromised both in vitro and in vivo. *Antiviral Research* **55**:307-317.

130. **Jackson, C. L., T. M. Dreaden, L. K. Theobald, N. M. Tran, T. L. Beal, M. Eid, M. Y. Gao, R. B. Shirley, M. T. Stoffel, M. V. Kumar, and D. Mohnen.** 2007. Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: correlation of apoptotic function with pectin structure. *Glycobiology* **17**:805-819.
131. **Jassim, S. A. A., and M. A. Naji.** 2003. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *Journal of Applied Microbiology* **95**:412-427.
132. **Johansson, B. E., D. J. Bucher, and E. D. Kilbourne.** 1989. Purified influenza virus hemagglutinin and neuraminidase are equivalent in stimulation of antibody response but induce contrasting types of immunity to infection. *Journal of Virology* **63**:1239-1246.
133. **Karlsson Hedestam, G. B., R. A. M. Fouchier, S. Phogat, D. R. Burton, J. Sodroski, and R. T. Wyatt.** 2008. The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nature Reviews Microbiology* **6**:143-155.
134. **Kase, S., S. Kawai, E. Ohtani, O. Maeda, and W. Kurimura.** 1999. Human mannan-binding lectin inhibits the infection of influenza A virus without complement. *Immunology* **97**:385-392.
135. **Kawaoka, Y., and K. Shinya.** 2008. Transmission of avian influenza viruses to humans: viral receptor specificity and distribution in human airways, p. 45-54, *Emerging Infections in Asia*. Springer US.
136. **Kido, H., Y. Yokogoshi, K. Sakai, M. Tashiro, Y. Kishino, A. Fukutomi, and N. Katunuma.** 1992. Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. A possible activator of the viral fusion glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry* **267**:13573-13579.
137. **Kido, H., Y. Okumura, E. Takahashi, H. Y. Pan, S. Wang, J. Chida, T. Q. Le, and M. Yano.** 2009. Host envelope glycoprotein processing proteases are indispensable for entry into human cells by seasonal and highly pathogenic avian influenza viruses. *Journal of Molecular and Genetic Medicine* **3**:167-175.
138. **Kilander, A., R. Rykkvin, S. Dudman, and O. Hungnes.** 2010. Observed association between the HA1 mutation D222G in the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus and severe clinical outcome, Norway 2009-2010. *Euro Surveillance* **15**.
139. **Kilbourne, E D., B A. Pokorny, B. Johansson, I. Brett, Y. Milev, and J T. Matthews.** 2004. Protection of mice with recombinant influenza virus neuraminidase. *The Journal of Infectious Diseases* **189**:459-461.
140. **Kilbourne, E. D.** 2006. Influenza pandemics of the 20th century. *Emerging Infectious Diseases* **12**
141. **Kim, C. U., W. Lew, M. A. Williams, H. Liu, L. Zhang, S. Swaminathan, N. Bischofberger, M. S. Chen, D. B. Mendel, and C. Y. Tai.** 1997. Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity. *Journal of the American Chemical Society* **119**:681-690.
142. **Kiso, M., K. Mitamura, Y. Sakai-Tagawa, K. Shiraishi, C. Kawakami, K. Kimura, F. G. Hayden, N. Sugaya, and Y. Kawaoka.** 2004. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. *The Lancet* **364**:759-765.

143. **Kiso, M., S. Kubo, M. Ozawa, Q. M. Le, C. A. Nidom, M. Yamashita, and Y. Kawaoka.** 2010. Efficacy of the new neuraminidase inhibitor CS-8958 against H5N1 influenza viruses. *PLoS Pathogene* **6**:e1000786.
144. **Klumpp, K., R. W. H. Ruigrok, and F. Baudin.** 1997. Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *The EMBO Journal* **16**:1248-1257.
145. **Kochs, G., A. Garcia-Sastre, and L. Martinez-Sobrido.** 2007. Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. *Journal of Virology* **81**:7011-7021.
146. **Koff, W. C., and V. Knight.** 1979. Inhibition of influenza virus uncoating by rimantadine hydrochloride. *Journal of Virology* **31**:261-263.
147. **Koyama, K., M. Takahashi, M. Oitate, N. Nakai, H. Takakusa, S.-i. Miura, and O. Okazaki.** 2009. CS-8958, a prodrug of the novel neuraminidase inhibitor R-125489, demonstrates a favorable long-retention profile in the mouse respiratory tract. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**:4845-4851.
148. **Kubo, S., T. Tomozawa, M. Kakuta, A. Tokumitsu, and M. Yamashita.** 2010. Laninamivir prodrug CS-8958, a long-acting neuraminidase inhibitor, shows superior anti-influenza virus activity after a single administration. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**:1256-1264.
149. **Lahaye, M., M. Brunel, and E. Bonnin.** 1997. Fine chemical structure analysis of oligosaccharides produced by an ulvan-lyase degradation of the water-soluble cell-wall polysaccharides from *Ulva* sp. (Ulvales, Chlorophyta). *Carbohydrate Research* **304**:325-333.
150. **Lai, Y., and R. L. Gallo.** 2009. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in Immunology* **30**:131-141.
151. **Lakadamyali, M., M. J. Rust, and X. Zhuang.** 2004. Endocytosis of influenza viruses. *Microbes and Infection* **6**:929-936.
152. **Laquerre, S., R. Argnani, D. B. Anderson, S. Zucchini, R. Manservigi, and J. C. Glorioso.** 1998. Heparan sulfate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 glycoproteins B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread. *Journal of Virology* **72**:6119-6130.
153. **Lee, J. B., K. Hayashi, M. Maeda, and T. Hayashi.** 2004. Antiherpetic activities of sulfated polysaccharides from green algae. *Planta medica* **70**:813-817.
154. **Lee, J. B., K. Hayashi, M. Hirata, E. Kuroda, E. Suzuki, Y. Kubo, and T. Hayashi.** 2006. Antiviral sulfated polysaccharide from *Navicula directa*, a diatom collected from deep-sea water in Toyama Bay. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **29**:2135-2139.
155. **Lee, M. G., K. H. Kim, K. Y. Park, and J. S. Kim.** 1996. Evaluation of anti-influenza effects of camostat in mice infected with non-adapted human influenza viruses. *Archives of Virology* **141**:1979-1989.
156. **Leneva, I. A., N. A. Roberts, E. A. Govorkova, O. G. Goloubeva, and R. G. Webster.** 2000. The neuraminidase inhibitor GS4104 (oseltamivir phosphate) is efficacious against A/Hong Kong/156/97 (H5N1) and A/Hong Kong/1074/99 (H9N2) influenza viruses. *Antiviral Research* **48**:101-115.
157. **Leneva, I. A., O. Goloubeva, R. J. Fenton, M. Tisdale, and R. G. Webster.** 2001. Efficacy of zanamivir against avian influenza A viruses that possess genes

- encoding H5N1 internal proteins and are pathogenic in mammals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**:1216-1224.
158. **Li, K. S., Y. Guan, J. Wang, G. J. D. Smith, K. M. Xu, L. Duan, A. P. Rahardjo, P. Puthavathana, C. Buranathai, T. D. Nguyen, A. T. S. Estoepongstie, A. Chaisingh, P. Auwarakul, H. T. Long, N. T. H. Hanh, R. J. Webby, L. L. M. Poon, H. Chen, K. F. Shortridge, K. Y. Yuen, R. G. Webster, and J. S. M. Peiris.** 2004. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature* **430**:209-213.
 159. **Li, M.-L., P. Rao, and R. M. Krug.** 2001. The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. *The EMBO Journal* **20**:2078-2086.
 160. **Li, S., J. Schulman, S. Itamura, and P. Palese.** 1993. Glycosylation of neuraminidase determines the neurovirulence of influenza A/WSN/33 virus. *Journal of Virology* **67**:6667-6673.
 161. **Li, W., P. A. Escarpe, E. J. Eisenberg, K. C. Cundy, C. Sweet, K. J. Jakeman, J. Merson, W. Lew, M. Williams, and L. Zhang.** 1998. Identification of GS 4104 as an orally bioavailable prodrug of the influenza virus neuraminidase inhibitor GS 4071. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**:647-653.
 162. **Lin, C., L. T. Yeh, D. Vitarella, and Z. Hong.** 2003. Viramidine, a prodrug of ribavirin, shows better liver-targeting properties and safety profiles than ribavirin in animals. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* **14**:145-152.
 163. **Lin, Y. P., V. Gregory, M. Bennett, and A. Hay.** 2004. Recent changes among human influenza viruses. *Virus Research* **103**:47-52.
 164. **Lindstrom, S. E., N. J. Cox, and A. Klimov.** 2004. Genetic analysis of human H2N2 and early H3N2 influenza viruses, 1957-1972: evidence for genetic divergence and multiple reassortment events. *Virology* **328**:101-119.
 165. **Lu, Y., M. Wambach, M. G. Katze, and R. M. Krug.** 1995. Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. *Virology* **214**:222-228.
 166. **Lüscher-Mattli, M., and R. Glück.** 1990. Dextran sulfate inhibits the fusion of influenza virus with model membranes, and suppresses influenza virus replication in vivo. *Antiviral Research* **14**:39-50.
 167. **Lüscher-Mattli, M., R. Glück, C. Kempf, and M. Zanoni-Grassi.** 1993. A comparative study of the effect of dextran sulfate on the fusion and the in vitro replication of influenza A and B, Semliki Forest, vesicular stomatitis, rabies, Sendai, and mumps virus. *Archives of Virology* **130**:317-326.
 168. **Luettig, B., C. Steinmuller, G. E. Gifford, H. Wagner, and M.-L. Lohmann-Matthes.** 1989. Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of *Echinacea purpurea*. *Journal of the National Cancer Institute* **81**:669-675.
 169. **Luo, C., E. Nobusawa, and K. Nakajima.** 2002. Analysis of the desialidation process of the haemagglutinin protein of influenza B virus: the host-dependent desialidation step. *Journal of General Virology* **83**:1729-1734.
 170. **Luytjes, W., M. Krystal, M. Enami, J. D. Parvin, and P. Palese.** 1989. Amplification, expression, and packaging of a foreign gene by influenza virus. *Cell* **59**:1107-1113.

171. **Macdonald, S. J. F., K. G. Watson, R. Cameron, D. K. Chalmers, D. A. Demaine, R. J. Fenton, D. Gower, J. N. Hamblin, S. Hamilton, G. J. Hart, G. G. A. Inglis, B. Jin, H. T. Jones, D. B. McConnell, A. M. Mason, V. Nguyen, I. J. Owens, N. Parry, P. A. Reece, S. E. Shanahan, D. Smith, W.-Y. Wu, and S. P. Tucker.** 2004. Potent and long-acting dimeric inhibitors of influenza virus neuraminidase are effective at a once-weekly dosing regimen. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**:4542-4549.
172. **Mak, G. C., K. W. Au, L. S. Tai, K. C. Chuang, K. C. Cheng, T. C. Shiu, and W. Lim.** 2010. Association of D222G substitution in haemagglutinin of 2009 pandemic influenza A (H1N1) with severe disease. *Euro Surveillance* **15**.
173. **Malakhov, M. P., L. M. Aschenbrenner, D. F. Smee, M. K. Wandersee, R. W. Sidwell, L. V. Gubareva, V. P. Mishin, F. G. Hayden, and D. H. Kim.** 2006. Sialidase fusion protein as a novel broad-spectrum inhibitor of influenza virus infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**:1470-1479.
174. **Mardberg, K., E. Trybala, J. C. Glorioso, and T. Bergstrom.** 2001. Mutational analysis of the major heparan sulfate-binding domain of herpes simplex virus type 1 glycoprotein C. *Journal of General Virology* **82**:1941-1950.
175. **Marion, K., W. Berry, C. Marina, N. Gerard, N. Hans van der, V. Harry, M. Adam, S. Jim van, F. Ron, O. Albert, and B. Arnold.** 2004. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *The Lancet* **363**:587-593.
176. **Matrosovich, M., A. Tuzikov, N. Bovin, A. Gambaryan, A. Klimov, M. R. Castrucci, I. Donatelli, and Y. Kawaoka.** 2000. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *Journal of Virology* **74**:8502-8512.
177. **Matrosovich, M. N., T. Y. Matrosovich, T. Gray, N. A. Roberts, and H. D. Klenk.** 2004. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *Journal of Virology* **78**:12665-12667.
178. **Matsuda, M., S. Shigeta, and K. Okutani.** 1999. Antiviral activities of marine *Pseudomonas* polysaccharides and their oversulfated derivatives. *Marine Biotechnology* **1**:68-73.
179. **McGahen, J. W., E. M. Neumayer, R. R. Grunert, and C. E. Hoffmann.** 1970. Influenza infections of mice: II. Curative activity of alpha-methyl-1-adamantanemethylamine HCl (Rimantadine HCl). *Annals of the New York Academy of Sciences* **173**:557-581.
180. **McKimm-Breschkin, J., T. Trivedi, A. Hampson, A. Hay, A. Klimov, M. Tashiro, F. Hayden, and M. Zambon.** 2003. Neuraminidase sequence analysis and susceptibilities of influenza virus clinical isolates to zanamivir and oseltamivir. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**:2264-2272.
181. **Meijer, A., A. Lackenby, O. Hungnes, B. Lina, S. van der Werf, and B. Schweiger.** 2009 Oseltamivir-resistant influenza A (H1N1) virus, Europe, 2007–08 season. *Emerging Infectious Diseases* **15**.
182. **Meindl, P., G. Bodo, P. Palese, J. Schulman, and H. Tuppy.** 1974. Inhibition of neuraminidase activity by derivatives of 2-deoxy-2, 3-dehydro-N-acetylneuraminic acid. *Virology* **58**:457-463.
183. **Mendel, D. B., C. Y. Tai, P. A. Escarpe, W. Li, R. W. Sidwell, J. H. Huffman, C. Sweet, K. J. Jakeman, J. Merson, S. A. Lacy, W. Lew, M. A. Williams, L. Zhang, M. S. Chen, N. Bischofberger, and C. U. Kim.** 1998. Oral administration

- of a prodrug of the influenza virus neuraminidase inhibitor GS 4071 protects mice and ferrets against influenza infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**:640-646.
184. **Mitnaul, L. J., M. R. Castrucci, K. G. Murti, and Y. Kawaoka.** 1996. The cytoplasmic tail of influenza A virus neuraminidase (NA) affects NA incorporation into virions, virion morphology, and virulence in mice but is not essential for virus replication. *Journal of Virology* **70**:873-879.
 185. **Mitnaul, L. J., M. N. Matrosovich, M. R. Castrucci, A. B. Tuzikov, N. V. Bovin, D. Kobasa, and Y. Kawaoka.** 2000. Balanced hemagglutinin and neuraminidase activities are critical for efficient replication of influenza A virus. *The Journal of Virology* **74**:6015-6020.
 186. **Mochalova, L., A. Gambaryan, J. Romanova, A. Tuzikov, A. Chinarev, D. Katinger, H. Katinger, A. Egorov, and N. Bovin.** 2003. Receptor-binding properties of modern human influenza viruses primarily isolated in Vero and MDCK cells and chicken embryonated eggs. *Virology* **313**:473-480.
 187. **Mohnen, D.** 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* **11**:266-277.
 188. **Mondor, I., S. Ugolini, and Q. J. Sattentau.** 1998. Human immunodeficiency virus type 1 attachment to heLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans. *Journal of Virology* **72**:3623-3634.
 189. **Monto, A. S., J. L. McKimm-Breschkin, C. Macken, A. W. Hampson, A. Hay, A. Klimov, M. Tashiro, R. G. Webster, M. Aymard, F. G. Hayden, and M. Zambon.** 2006. Detection of influenza viruses resistant to neuraminidase inhibitors in global surveillance during the first 3 years of their use. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**:2395-2402.
 190. **Mould, J. A., R. G. Paterson, M. Takeda, Y. Ohigashi, P. Venkataraman, R. A. Lamb, and L. H. Pinto.** 2003. Influenza B virus BM2 protein has ion channel activity that conducts protons across membranes. *Developmental Cell* **5**:175-184.
 191. **Moules, V., O. Ferraris, O. Terrier, E. Giudice, M. Yver, J. P. Rolland, M. Bouscambert-Duchamp, C. Bergeron, M. Ottmann, E. Fournier, A. Traversier, C. Boule, A. Rivoire, Y. Lin, A. Hay, M. Valette, R. Marquet, M. Rosa-Calatrava, N. Naffakh, G. Schoehn, D. Thomas, and B. Lina.** 2010. In vitro characterization of naturally occurring influenza H3NA- viruses lacking the NA gene segment: Toward a new mechanism of viral resistance? *Virology* **404**:215-224.
 192. **Murakami, M., T. Towatari, M. Ohuchi, M. Shiota, M. Akao, Y. Okumura, M. A. A. Parry, and H. Kido.** 2001. Mini-plasmin found in the epithelial cells of bronchioles triggers infection by broad-spectrum influenza A viruses and Sendai virus. *European Journal of Biochemistry* **268**:2847-2855.
 193. **Nakashima, H., Y. Kido, N. Kobayashi, Y. Motoki, M. Neushul, and N. Yamamoto.** 1987. Purification and characterization of an avian myeloblastosis and human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor, sulfated polysaccharides extracted from sea algae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **31**:1524-1528.
 194. **Nakashima, H., O. Yoshida, M. Baba, E. De Clercq, and N. Yamamoto.** 1989. Anti-HIV activity of dextran sulphate as determined under different experimental conditions. *Antiviral Research* **11**:233-246.

195. **Nayak, D. P., R. A. Balogun, H. Yamada, Z. H. Zhou, and S. Barman.** 2009. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Research* **143**:147-161.
196. **Nemeroff, M. E., S. M. L. Barabino, Y. Li, W. Keller, and R. M. Krug.** 1998. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3' end formation of cellular pre-mRNAs. *Molecular Cell* **1**:991-1000.
197. **Neumann, G., M. T. Hughes, and Y. Kawaoka.** 2000. Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *The EMBO Journal* **19**:6751-6758.
198. **Newhouse, E. I., D. Xu, P. R. L. Markwick, R. E. Amaro, H. C. Pao, K. J. Wu, M. Alam, J. A. McCammon, and W. W. Li.** 2009. Mechanism of glycan receptor recognition and specificity switch for avian, swine, and human adapted influenza virus hemagglutinins: a molecular dynamics perspective. *Journal of the American Chemical Society* **131**:17430-17442.
199. **Noonan, D., and A. Albin.** 2000. From the outside in: Extracellular activities of HIV tat, p. 229-250. *In* J. Kuan-Teh (ed.), *Advances in Pharmacology*, vol. Volume 48. Academic Press.
200. **Noti, C., and P. H. Seeberger.** 2005. Chemical approaches to define the structure-activity relationship of heparin-like glycosaminoglycans. *Chemistry & Biology* **12**:731 - 756.
201. **O'Keefe, B. R., D. F. Smee, J. A. Turpin, C. J. Saucedo, K. R. Gustafson, T. Mori, D. Blakeslee, R. Buckheit, and M. R. Boyd.** 2003. Potent anti-Influenza activity of Cyanovirin-N and interactions with viral hemagglutinin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**:2518-2525.
202. **O'Neill, R. E., R. Jaskunas, G. Blobel, P. Palese, and J. Moroianu.** 1995. Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *Journal of Biological Chemistry* **270**:22701-22704.
203. **O'Neill, R. E., J. Talon, and P. Palese.** 1998. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *The EMBO Journal* **17**:288-296.
204. **Ohta, Y., J. B. Lee, K. Hayashi, and T. Hayashi.** 2009. Isolation of sulfated galactan from *Codium fragile* and its antiviral effect. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **32**:892-898.
205. **Olofsson, S., and T. Bergström.** 2005. Glycoconjugate glycans as viral receptors. *Annals of Medicine* **37**:154-172.
206. **Ortega, J., J. Martin-Benito, T. Zurcher, J. M. Valpuesta, J. L. Carrascosa, and J. Ortin.** 2000. Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification. *The Journal of Virology* **74**:156-163.
207. **Palese, P., K. Tobita, M. Ueda, and R. W. Compans.** 1974. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology* **61**:397-410.
208. **Palese, P., and J. F. Young.** 1982. Variation of influenza A, B, and C viruses. *Science* **215**:1468-1474.
209. **Palese, P., and M. L. Shaw.** 2007. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication, p. 1650-1651. *In* D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology* 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins.

210. **Park, P. W., G. B. Pier, M. T. Hinkes, and M. Bernfield.** 2001. Exploitation of syndecan-1 shedding by *Pseudomonas aeruginosa* enhances virulence. *Nature* **411**:98-102.
211. **Paterson, R. G., M. Takeda, Y. Ohigashi, L. H. Pinto, and R. A. Lamb.** 2003. Influenza B virus BM2 protein is an oligomeric integral membrane protein expressed at the cell surface. *Virology* **306**:7-17.
212. **Peiris, J. S. M., M. D. de Jong, and Y. Guan.** 2007. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. *Clinical Microbiology Reviews* **20**:243-267.
213. **Pereira, M. S., F. R. Melo, and P. A. S. Mourão.** 2002. Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans? *Glycobiology* **12**:573-580.
214. **Pérez, S., M. A. Rodríguez-Carvajal, and T. Doco.** 2003. A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie* **85**:109-121.
215. **Pinto, L. H., L. J. Holsinger, and R. A. Lamb.** 1992. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* **69**:517-528.
216. **Pinto, L. H., and R. A. Lamb.** 2006. The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *Journal of Biological Chemistry* **281**:8997-9000.
217. **Ponce, N. M. A., C. A. Pujol, E. B. Damonte, M. L. Flores, and C. A. Stortz.** 2003. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. *Carbohydrate Research* **338**:153-165.
218. **Popov, S. V., V. V. Golovchenko, R. G. Ovodova, V. V. Smirnov, D. S. Khramova, G. Y. Popova, and Y. S. Ovodov.** 2006. Characterisation of the oral adjuvant effect of lemnan, a pectic polysaccharide of *Lemna minor* L. *Vaccine* **24**:5413-5419.
219. **Portela, A., and P. Digard.** 2002. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *Journal of General Virology* **83**:723-734.
220. **Premkumar, A., G. D. Ewart, G. B. Cox, and P. W. Gage.** 2004. An amino-acid substitution in the influenza-B NB protein affects ion-channel gating. *Journal of Membrane Biology* **197**:135-143.
221. **Pujol, C., M. Carlucci, M. Matulewicz, and E. Damonte.** 2007. Natural sulfated polysaccharides for the prevention and control of viral infections, p. 259-281. *In* M. Khan (ed.), *Bioactive Heterocycles V*, vol. 11. Springer Berlin / Heidelberg.
222. **Qian, X. Y., C. Y. Chien, Y. Lu, G. T. Montelione, and R. M. Krug.** 1995. An amino-terminal polypeptide fragment of the influenza virus NS1 protein possesses specific RNA-binding activity and largely helical backbone structure. *RNA* **1**:948-956.
223. **Ramalho-Santos, J., and M. Pedroso de Lima.** 2001. Fusion and infection of influenza and sendai viruses as modulated by dextran sulfate: a comparative study. *Bioscience Reports* **21**:293-304.
224. **Rechter, S., T. König, S. Auerochs, S. Thulke, H. Walter, H. Dörnenburg, C. Walter, and M. Marschall.** 2006. Antiviral activity of Arthrospira-derived spirulan-like substances. *Antiviral Research* **72**:197-206.
225. **Reed, L. J., and H. Muench.** 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology* **27**:493-497.

226. **Regan, J. F., Y. Liang, and T. G. Parslow.** 2006. Defective assembly of influenza A virus due to a mutation in the polymerase subunit PA. *Journal of Virology* **80**:252-261.
227. **Ridley, B. L., M. A. O'Neill, and D. Mohnen.** 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57**:929-967.
228. **Robb, N. C., M. Smith, F. T. Vreede, and E. Fodor.** 2009. NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome. *Journal of General Virology* **90**:1398-1407.
229. **Robertson, J. S.** 1979. 5' and 3' terminal nucleotide sequences of the RNA genome segments of influenza virus. *Nucleic Acids Research* **6**:3745-3757.
230. **Roderiquez, G., T. Oravec, M. Yanagishita, D. C. Bou-Habib, H. Mostowski, and M. A. Norcross.** 1995. Mediation of human immunodeficiency virus type 1 binding by interaction of cell surface heparan sulfate proteoglycans with the V3 region of envelope gp120-gp41. *Journal of Virology* **69**:2233-2239.
231. **Rogers, G. N., and J. C. Paulson.** 1983. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: Differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology* **127**:361-373.
232. **Rogers, G. N., and B. L. D'Souza.** 1989. Receptor binding properties of human and animal H1 influenza virus isolates. *Virology* **173**:317-322.
233. **Rota, P. A., T. R. Wallis, M. W. Harmon, J. S. Rota, A. P. Kendal, and K. Nerome.** 1990. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. *Virology* **175**:59-68.
234. **Ruigrok, R. W. H., P. J. Andree, R. A. M. Hooft Van Huysduyenen, and J. E. Mellema.** 1984. Characterization of three highly purified influenza virus strains by electron microscopy. *Journal of General Virology* **65**:799-802.
235. **Ruigrok, R. W. H., and F. Baudin.** 1995. Structure of influenza virus ribonucleoprotein particles. II. Purified RNA-free influenza virus ribonucleoprotein forms structures that are indistinguishable from the intact influenza virus ribonucleoprotein particles. *Journal of General Virology* **76**:1009-1014.
236. **Rusnati, M., D. Coltrini, P. Oreste, G. Zoppetti, A. Albin, D. Noonan, F. d. A. di Fagagna, M. Giacca, and M. Presta.** 1997. Interaction of HIV-1 Tat protein with heparin : Role of the backbone structure, sulfatation, and size. *Journal of Biological Chemistry* **272**:11313-11320.
237. **Rusnati, M., G. Tulipano, D. Spillmann, E. Tanghetti, P. Oreste, G. Zoppetti, M. Giacca, and M. Presta.** 1999. Multiple interactions of HIV-I Tat protein with size-defined heparin oligosaccharides. *Journal of Biological Chemistry* **274**:28198-28205.
238. **Russell, R. J., P. S. Kerry, D. J. Stevens, D. A. Steinhauer, S. R. Martin, S. J. Gamblin, and J. J. Skehel.** 2008. Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**:17736-17741.
239. **Ryan, D. M., J. Ticehurst, M. H. Dempsey, and C. R. Penn.** 1994. Inhibition of influenza virus replication in mice by GG167 (4-guanidino-2, 4-dideoxy-2, 3-dehydro-N-acetylneuraminic acid) is consistent with extracellular activity of viral neuraminidase (sialidase). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**:2270-2275.

240. **Ryan, D. M., J. Ticehurst, and M. H. Dempsey.** 1995. GG167 (4-guanidino-2, 4-dideoxy-2, 3-dehydro-N-acetylneuraminic acid) is a potent inhibitor of influenza virus in ferrets. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**:2583-2584.
241. **Sanz-Ezquerro, J. J., S. de la Luna, J. Ortin, and A. Nieto.** 1995. Individual expression of influenza virus PA protein induces degradation of coexpressed proteins. *Journal of Virology* **69**:2420-2426.
242. **Saphire, A. C. S., M. D. Bobardt, Z. Zhang, G. David, and P. A. Galloway.** 2001. Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages. *Journal of Virology* **75**:9187-9200.
243. **Schmidtchen, A., I.-M. Frick, and L. Björck.** 2001. Dermatan sulphate is released by proteinases of common pathogenic bacteria and inactivates antibacterial α -defensin. *Molecular Microbiology* **39**:708-713.
244. **Sears, S. D., and M. L. Clements.** 1987. Protective efficacy of low-dose amantadine in adults challenged with wild-type influenza A virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **31**:1470-1473.
245. **Sharon, N.** 2006. Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1760**:527-537.
246. **Sheu, T. G., V. M. Deyde, M. Okomo-Adhiambo, R. J. Garten, X. Xu, R. A. Bright, E. N. Butler, T. R. Wallis, A. I. Klimov, and L. V. Gubareva.** 2008. Surveillance for neuraminidase Inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**:3284-3292.
247. **Shimizu, K., H. Handa, S. Nakada, and K. Nagata.** 1994. Regulation of influenza virus RNA polymerase activity by cellular and viral factors. *Nucleic Acids Research* **22**:5047-5053.
248. **Sidwell, R. W., L. B. Allen, G. P. Khare, J. H. Huffman, J. T. Witkowski, L. N. Simon, and R. K. Robins.** 1973. Effect of 1- β -D-ribofuranosyl-1, 2, 4-triazole-3-carboxamide (Virazole, ICN 1229) on herpes and vaccinia keratitis and encephalitis in laboratory animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **3**:242-246.
249. **Sidwell, R. W., K. W. Bailey, M. H. Wong, D. L. Barnard, and D. F. Smee.** 2005. In vitro and in vivo influenza virus-inhibitory effects of viraclidine. *Antiviral Research* **68**:10-17.
250. **Sidwell, R. W., D. L. Barnard, C. W. Day, D. F. Smee, K. W. Bailey, M.-H. Wong, J. D. Morrey, and Y. Furuta.** 2007. Efficacy of orally administered T-705 on lethal avian influenza A (H5N1) virus infections in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51**:845-851.
251. **Skehel, J. J., P. M. Bayley, E. B. Brown, S. R. Martin, M. D. Waterfield, J. M. White, I. A. Wilson, and D. C. Wiley.** 1982. Changes in the conformation of influenza virus hemagglutinin at the pH optimum of virus-mediated membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**:968-972.
252. **Skehel, J. J., D. J. Stevens, R. S. Daniels, A. R. Douglas, M. Knossow, I. A. Wilson, and D. C. Wiley.** 1984. A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**:1779-1783.

253. **Skehel, J. J., and D. C. Wiley.** 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The influenza hemagglutinin. *Annual Review of Biochemistry* **69**:531-569.
254. **Smee, D. F., J. H. Huffman, A. C. Morrison, D. L. Barnard, and R. W. Sidwell.** 2001. Cyclopentane neuraminidase inhibitors with potent in vitro anti-influenza virus activities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**:743-748.
255. **Smee, D. F., A. C. Morrison, D. L. Barnard, and R. W. Sidwell.** 2002. Comparison of colorimetric, fluorometric, and visual methods for determining anti-influenza (H1N1 and H3N2) virus activities and toxicities of compounds. *Journal of Virological Methods* **106**:71-79.
256. **Smee, D. F., K. W. Bailey, M. H. Wong, B. R. O'Keefe, K. R. Gustafson, V. P. Mishin, and L. V. Gubareva.** 2008. Treatment of influenza A (H1N1) virus infections in mice and ferrets with cyanovirin-N. *Antiviral Research* **80**:266-271.
257. **Smestad Paulsen, B., and H. Barsett.** 2005. Bioactive pectic polysaccharides, p. 69-101. *In* T. Heinze (ed.), *Polysaccharides I*, vol. 186. Springer Berlin / Heidelberg.
258. **Smith, G. J. D., D. Vijaykrishna, J. Bahl, S. J. Lycett, M. Worobey, O. G. Pybus, S. K. Ma, C. L. Cheung, J. Raghvani, S. Bhatt, J. S. M. Peiris, Y. Guan, and A. Rambaut.** 2009. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* **459**:1122-1125.
259. **Spear, P. G.** 2004. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cellular Microbiology* **6**:401-410.
260. **Spillmann, D.** 2001. Heparan sulfate: Anchor for viral intruders? *Biochimie* **83**:811-817.
261. **Sriwilairoen, N., P. Wilairat, H. Hiramatsu, T. Takahashi, T. Suzuki, M. Ito, Y. Ito, M. Tashiro, and Y. Suzuki.** 2009. Mechanisms of the action of povidone-iodine against human and avian influenza A viruses: its effects on hemagglutination and sialidase activities. *Virology journal* **6**:124.
262. **Steinhauer, D. A.** 1999. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology* **258**:1-20.
263. **Stick, R. V.** 2001. Carbohydrates: the sweet molecules of life. Academic press.
264. **Streeter, D. G., J. T. Witkowski, G. P. Khare, R. W. Sidwell, R. J. Bauer, R. K. Robins, and L. N. Simon.** 1973. Mechanism of action of 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (Virazole), a new broad-spectrum antiviral agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**:1174-1178.
265. **Subbarao, E. K., W. London, and B. R. Murphy.** 1993. A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *Journal of Virology* **67**:1761-1764.
266. **Sugahara, K., T. Mikami, T. Uyama, S. Mizuguchi, K. Nomura, and H. Kitagawa.** 2003. Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Current Opinion in Structural Biology* **13**:612-620.
267. **Sugaya, N., and Y. Ohashi.** 2010. Long-acting neuraminidase inhibitor laninamivir octanoate (CS-8958) versus oseltamivir as treatment for children with influenza virus infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**:2575-2582.

268. **Sugrue, R. J., G. Bahadur, M. C. Zambon, M. Hall-Smith, A. R. Douglas, and A. J. Hay.** 1990. Specific structural alteration of the influenza haemagglutinin by amantadine. *The EMBO Journal* **9**:3469-3476.
269. **Sunstrom, N. A., L. S. Premkumar, A. Premkumar, G. Ewart, G. B. Cox, and P. W. Gage.** 1996. Ion channels formed by NB, an influenza B virus protein. *Journal of Membrane Biology* **150**:127-132.
270. **Sweet, C., F. G. Hayden, K. J. Jakeman, S. Grambas, and A. J. Hay.** 1991. Virulence of rimantadine-resistant human influenza A (H3N2) viruses in ferrets. *The Journal of Infectious Diseases* **164**:969-972.
271. **Sweet, C., K. J. Jakeman, K. Bush, P. C. Wagaman, L. A. Mckown, A. J. Streeter, D. Desai-Krieger, P. Chand, and Y. S. Babu.** 2002. Oral administration of cyclopentane neuraminidase inhibitors protects ferrets against influenza virus infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**:996-1004.
272. **Symmetrel (package insert).** 2003. Endo Pharmaceuticals Inc. Chadds Ford. Disponible sur : www.endo.com/PDF/symmetrel_pack_insert.pdf.
273. **Tai, C. Y., P. A. Escarpe, R. W. Sidwell, M. A. Williams, W. Lew, H. Wu, C. U. Kim, and D. B. Mendel.** 1998. Characterization of human influenza virus variants selected in vitro in the presence of the neuraminidase inhibitor GS 4071. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**:3234-3241.
274. **Taube, S., M. Jiang, and C. E. Wobus.** 2010. Glycosphingolipids as receptors for non-enveloped viruses. *Viruses* **2**:1011-1049.
275. **Teclé, T., M. R. White, E. C. Crouch, and K. L. Hartshorn.** 2007. Inhibition of influenza viral neuraminidase activity by collectins. *Archives of Virology* **152**:1731-1742.
276. **Thornton, D. J., K. Rousseau, and M. A. McGuckin.** 2008. Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. *Annual Review of Physiology* **70**:459-486.
277. **Tomassini, J., H. Selnick, M. E. Davies, M. E. Armstrong, J. Baldwin, M. Bourgeois, J. Hastings, D. Hazuda, J. Lewis, and W. McClements.** 1994. Inhibition of cap (m7GpppXm)-dependent endonuclease of influenza virus by 4-substituted 2, 4-dioxobutanoic acid compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**:2827-2837.
278. **Tomassini, J. E., M. E. Davies, J. C. Hastings, R. Lingham, M. Mojena, S. L. Raghoobar, S. B. Singh, J. S. Tkacz, and M. A. Goetz.** 1996. A novel antiviral agent which inhibits the endonuclease of influenza viruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**:1189.
279. **Triana-Baltzer, G. B., M. Babizki, M. C. W. Chan, A. C. N. Wong, L. M. Aschenbrenner, E. R. Campbell, Q. X. Li, R. W. Y. Chan, J. S. Peiris, and J. M. Nicholls.** 2009. DAS181, a sialidase fusion protein, protects human airway epithelium against influenza virus infection: an in vitro pharmacodynamic analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **65**:275-284.
280. **Triana-Baltzer, G. B., L. V. Gubareva, A. I. Klimov, D. F. Wurtman, R. B. Moss, M. Hedlund, J. L. Larson, R. B. Belshe, and F. Fang.** 2009. Inhibition of neuraminidase inhibitor-resistant influenza virus by DAS181, a novel sialidase fusion protein. *PloS ONE* **4**:e7838.

281. **Tyagi, M., M. Rusnati, M. Presta, and M. Giacca.** 2001. Internalization of HIV-1 Tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry* **276**:3254-3261.
282. **Ulmanen, I., B. A. Broni, and R. M. Krug.** 1981. Role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structures (m7GpppNm) on RNAs and in initiating viral RNA transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**:7355-7359.
283. **Underwood, P. A.** 1982. Mapping of antigenic changes in the haemagglutinin of Hong Kong influenza (H3N2) strains using a large panel of monoclonal antibodies. *Journal of General Virology* **62**:153-169.
284. **Urbinati, C., S. Nicoli, M. Giacca, G. David, S. Fiorentini, A. Caruso, M. Alfano, L. Cassetta, M. Presta, and M. Rusnati.** 2009. HIV-1 Tat and heparan sulfate proteoglycan interaction: a novel mechanism of lymphocyte adhesion and migration across the endothelium. *Blood* **114**:3335-3342.
285. **Varghese, J. N., W. G. Laver, and P. M. Colman.** 1983. Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature* **303**:35-40.
286. **Varghese, J. N., J. L. McKimm-Breschkin, J. B. Caldwell, A. A. Kortt, and P. M. Colman.** 1992. The structure of the complex between influenza virus neuraminidase and sialic acid, the viral receptor. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **14**:327-332.
287. **Varki, A.** 1997. Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *FASEB Journal* **11**:248-255.
288. **Varki, A., R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, and M. E. Etzler.** 2009. *Essentials of glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Plainview, New York, 2nd ed.
289. **Vey, M., M. Orlich, S. Adler, H. D. Klenk, R. Rott, and W. Garten.** 1992. Hemagglutinin activation of pathogenic avian influenza viruses of serotype H7 requires the protease recognition motif R-X-K/R-R. *Virology* **188**:408-413.
290. **Viswanathan, K., A. Chandrasekaran, A. Srinivasan, R. Raman, V. Sasisekharan, and R. Sasisekharan.** 2010. Glycans as receptors for influenza pathogenesis. *Glycoconjugate Journal* **27**:561-570.
291. **von Itzstein, M., W. Y. Wu, G. B. Kok, M. S. Pegg, J. C. Dyason, B. Jin, T. Van Phan, M. L. Smythe, H. F. White, and S. W. Oliver.** 1993. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature* **363**:418-423.
292. **von Itzstein, M.** 2007. The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. *Nature Review Drug Discovery* **6**:967 - 974.
293. **Voragen, A., G.-J. Coenen, R. Verhoef, and H. Schols.** 2009. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry* **20**:263-275.
294. **Wang, D., A. Harmon, J. Jin, D. H. Francis, J. Christopher-Hennings, E. Nelson, R. C. Montelaro, and F. Li.** 2010. The lack of an inherent membrane targeting signal is responsible for the failure of the matrix (M1) protein of influenza A virus to bud into virus-like-particles. *Journal of Virology* **84**:4673-4681.
295. **Wang, J., R. M. Pielak, M. A. McClintock, and J. J. Chou.** 2009. Solution structure and functional analysis of the influenza B proton channel. *Nature Structural & Molecular Biology* **16**:1267-1271.

296. **Ward, C. W., J. M. Murray, C. M. Roxburgh, and D. C. Jackson.** 1983. Chemical and antigenic characterization of the carbohydrate side chains of an Asian (N2) influenza virus neuraminidases. *Virology* **126**:370-375.
297. **Ward, P., I. Small, J. Smith, P. Suter, and R. Dutkowski.** 2005. Oseltamivir (Tamiflu®) and its potential for use in the event of an influenza pandemic. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **55**:i5-i21.
298. **Webster, R. G., S. Krauss, D. Hulse-Post, and K. Sturm-Ramirez.** 2007. Evolution of influenza A viruses in wild birds. *Journal of Wildlife Diseases* **43**:S1-6.
299. **Weis, W., J. H. Brown, S. Cusack, J. C. Paulson, J. J. Skehel, and D. C. Wiley.** 1988. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* **333**:426-431.
300. **WHO.** A simple double immunodiffusion test for typing influenza viruses. *Bulletin of The World Health Organization* **51**:213-218.
301. **WHO.** 1980. A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO Memorandum. *Bulletin of The World Health Organization* **58**:585-591.
302. **WHO.** 2003. WHO factsheet 211: influenza. Disponible sur : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs211/en/>.
303. **WHO.** 2010. Update on oseltamivir resistant pandemic A (H1N1) 2009 influenza virus: January 2010. *Weekly epidemiological record* **85**:37-48.
304. **Wiley, D. C., and J. J. Skehel.** 1987. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annual Review of Biochemistry* **56**:365-394.
305. **Wilson, I. A., J. J. Skehel, and D. C. Wiley.** 1981. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* **289**:366-373.
306. **Wilson, I. A., and N. J. Cox.** 1990. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. *Annual Review of Immunology* **8**:737-787.
307. **Wilson, S. Z., V. Knight, P. R. Wyde, S. Drake, and R. B. Couch.** 1980. Amantadine and ribavirin aerosol treatment of influenza A and B infection in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **17**:642-648.
308. **Witvrouw, M., J. Desmyter, and E. De Clercq.** 1994. Antiviral portrait series: 4. Polysulfates as inhibitors of HIV and other enveloped viruses. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* **5**:345-359.
309. **Witvrouw, M., J. A. Este, M. Q. Mateu, D. Reymen, G. Andrei, R. Snoeck, S. Ikeda, R. Pauwels, N. V. Bianchini, and J. Desmyter.** 1994. Activity of a sulfated polysaccharide extracted from the red seaweed *Aghardhiella tenera* against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* **5**:297-303.
310. **Witvrouw, M., and E. De Clercq.** 1997. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *General Pharmacology* **29**:497-511.
311. **Woods, J. M., R. C. Bethell, J. A. Coates, N. Healy, S. A. Hiscox, B. A. Pearson, D. M. Ryan, J. Ticehurst, J. Tilling, and S. M. Walcott.** 1993. 4-Guanidino-2, 4-dideoxy-2, 3-dehydro-N-acetylneuraminic acid is a highly effective inhibitor both of the sialidase (neuraminidase) and of growth of a wide range of influenza A and B viruses in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**:1473-1479.

312. **Wu, J. Z., C.-c. Lin, and Z. Hong.** 2003. Ribavirin, viramidine and adenosine-deaminase-catalysed drug activation: implication for nucleoside prodrug design. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**:543-546.
313. **Yamashita, M., M. Krystal, W. M. Fitch, and P. Palese.** 1988. Influenza B virus evolution: Co-circulating lineages and comparison of evolutionary pattern with those of influenza A and C viruses. *Virology* **163**:112-122.
314. **Yamashita, M., T. Tomozawa, M. Kakuta, A. Tokumitsu, H. Nasu, and S. Kubo.** 2009. CS-8958, a prodrug of the new neuraminidase inhibitor R-125489, shows long-acting anti-influenza virus activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**:186-192.
315. **Yasuda, J., S. Nakada, A. Kato, T. Toyoda, and A. Ishihama.** 1993. Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology* **196**:249-255.
316. **Yen, H.-L., A. S. Monto, R. G. Webster, and E. A. Govorkova.** 2005. Virulence may determine the necessary duration and dosage of oseltamivir treatment for highly pathogenic A/Vietnam/1203/04 influenza virus in mice. *The Journal of Infectious Diseases* **192**:665-672.
317. **Yun, N. E., N. S. Linde, M. A. Zacks, I. G. Barr, A. C. Hurt, J. N. Smith, N. Dziuba, M. R. Holbrook, L. Zhang, J. M. Kilpatrick, C. S. Arnold, and S. Paessler.** 2008. Injectable peramivir mitigates disease and promotes survival in ferrets and mice infected with the highly virulent influenza virus, A/Vietnam/1203/04 (H5N1). *Virology* **374**:198-209.
318. **Zamarin, D., A. García-Sastre, X. Xiao, R. Wang, and P. Palese.** 2005. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathogens* **1**:e4.
319. **Zamarin, D., M. B. Ortigoza, and P. Palese.** 2006. Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice. *Journal of Virology* **80**:7976-7983.
320. **Zambon, M., and F. G. Hayden.** 2001. Position statement: global neuraminidase inhibitor susceptibility network: (On behalf of the Global Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Network). *Antiviral Research* **49**:147-156.
321. **Zebedee, S. L., and R. A. Lamb.** 1988. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *Journal of Virology* **62**:2762-2772.
322. **Zopf, D., and S. Roth.** 1996. Oligosaccharide anti-infective agents. *Lancet* **347**:1017-1021.

ANNEXES

ANNEXE 1

Activité inhibitrice (%) des molécules de la famille des alginates vis-à-vis du virus de type A

| Famille de sucres | Type de virus | A/Brisbane/10/2007 | | | | | | | | |
|---------------------------|------------------------------|--------------------|---------|----------|---------------|---------|----------|---------------|---------|----------|
| | Dose virale | 100CCID50/50µl | | | 30CCID50/50µl | | | 10CCID50/50µl | | |
| | Dose antivirale Molécules | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml |
| <i>Laminaria japonica</i> | 45 | | 75.4 | 0.0 | | 96.4 | 0.0 | | 98.2 | 0.0 |
| | 46 | | 72.3 | 0.0 | | 91.9 | 0.0 | | 70.8 | 0.0 |
| | 38 | | 1.6 | 0.0 | | 28.7 | 0.0 | | 72.4 | 17.4 |
| | 35 | | 0.8 | 0.0 | | 0.0 | 0.0 | | 30.5 | 14.1 |
| | 42 | | 0.0 | 0.0 | | 9.1 | 0.0 | | 55.3 | 0.0 |
| | 36 | | 1.0 | 0.4 | | 0.0 | 0.0 | | 20.5 | 7.0 |
| | 44 | | 0.0 | 0.0 | | 0.0 | 0.0 | | 26.5 | 1.0 |
| | 43 | | 0.0 | 0.0 | | 9.2 | 0.0 | | 12.2 | 0.0 |
| | 40 | | 0.0 | 0.1 | | 0.0 | 1.3 | | 13.7 | 0.0 |
| | 56 | 9.6 | 0.0 | 2.1 | 12.4 | 1.8 | 3.2 | 8.3 | 0.0 | 2.2 |
| | 57 | 5.2 | 1.6 | 4.0 | 1.8 | 0.7 | 2.1 | 3.9 | 1.5 | 3.7 |
| | 58 | 2.3 | 0.0 | 0.4 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.2 | 0.0 | 0.0 |
| | 59 | 0.2 | 0.1 | 0.6 | 0.3 | 2.5 | 1.3 | 2.6 | 0.0 | 1.0 |
| | 60 | 3.5 | 0.0 | 2.7 | 2.6 | 4.8 | 0.0 | 4.2 | 0.0 | 0.0 |
| | 61 | 5.1 | 0.0 | 4.0 | 2.0 | 0.0 | 5.1 | 1.5 | 0.0 | 0.0 |
| | 62 | 3.3 | 0.6 | 0.7 | 0.0 | 1.5 | 0.0 | 0.6 | 0.0 | 0.0 |
| | 73 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 5.8 | 3.5 | 7.3 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 74 | 8.4 | 5.9 | 1.9 | 10.6 | 5.8 | 5.9 | 5.3 | 4.4 | 0.0 |
| | 183 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 4.4 | 0.0 | 0.0 |
| | 184 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 185 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 186 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 187 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 188 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 189 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 10.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 190 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 29 | 0.6 | 0.0 | 0.0 | 6.0 | 3.0 | 0.4 | 5.1 | 0.0 | 13.0 |
| 34 | | 3.3 | 2.4 | | 3.8 | 0.0 | | 0.0 | 3.6 | |
| 37 | | 0.0 | 1.5 | | 5.3 | 0.0 | | 53.0 | 0.0 | |
| 39 | | 0.0 | 0.0 | | 3.1 | 0.0 | | 0.0 | 0.0 | |
| 41 | | 0.0 | 0.0 | | 1.6 | 0.0 | | 3.4 | 0.0 | |
| <i>Fucus vesiculosus</i> | 23 | | | | | | | | | |
| | 220 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 8.8 | 1.3 | |
| | 221 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.3 | 0.0 | |
| | 228 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | |
| | 229 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 9.9 | 3.2 | |
| <i>Chorda filum</i> | 92 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | |
| | 93 | 7.1 | 0.0 | 0.0 | 7.8 | 6.6 | 0.0 | 0.0 | 0.4 | |
| | 231 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 3.1 | 0.0 | 0.0 | 26.0 | 7.0 | |
| | 163 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 5.6 | 8.7 | |
| | 222 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 5.1 | |
| | 223 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.3 | 18.1 | |
| | 224 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 4.6 | |
| 225 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 4.8 | | |

| | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 226 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 9.5 | 0.0 |
| | 227 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 7.7 | 0.2 |
| | 230 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.4 | 0.0 |
| | 232 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| <i>Ascophillum nodosum</i> | 106 | 8.8 | 8.4 | 6.5 | 4.5 | 5.6 | 8.3 | 0.0 | 0.0 | 2.1 |
| <i>Durvillea antarctica</i> | 104 | 0.0 | 0.4 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 8.0 | 3.2 | 0.2 |

 Les valeurs inhibitrices correspondent au groupe 3

 Non déterminé

 Les valeurs inhibitrices correspondent au groupe 2

 Les valeurs toxiques ($\geq 10\%$)

Activité inhibitrice (%) des molécules de la famille des alginates vis-à-vis du virus de type B

| Famille de sucres | Type de virus | B/Florida/4/06 | | | | | | | | |
|---------------------------|------------------------------|----------------------|---------------|----------------|---------------------|---------------|----------------|---------------------|---------------|----------------|
| | Dose virale | 100CCID50/50 μ l | | | 30CCID50/50 μ l | | | 10CCID50/50 μ l | | |
| | Dose antivirale Molécules | 250 μ g/ml | 25 μ g/ml | 2.5 μ g/ml | 250 μ g/ml | 25 μ g/ml | 2.5 μ g/ml | 250 μ g/ml | 25 μ g/ml | 2.5 μ g/ml |
| <i>Laminaria japonica</i> | 45 | 99.1 | 58.3 | 0.0 | 99.1 | 99.0 | 0.0 | 99.1 | 98.6 | 0.0 |
| | 46 | 97.3 | 41.2 | 0.0 | 98.0 | 85.8 | 0.0 | 98.4 | 98.2 | 0.0 |
| | 43 | 99.1 | 20.0 | 4.9 | 99.1 | 65.8 | 5.5 | 99.1 | 97.7 | 6.6 |
| | 44 | 99.1 | 18.7 | 0.0 | 99.1 | 57.7 | 0.6 | 99.1 | 99.1 | 0.0 |
| | 38 | 91.2 | 11.2 | 0.7 | 96.8 | 31.6 | 1.0 | 98.5 | 88.7 | 2.4 |
| | 37 | 89.6 | 0.1 | 0.0 | 95.7 | 18.7 | 2.5 | 98.1 | 66.5 | 2.5 |
| | 39 | 92.7 | 0.0 | 0.0 | 94.0 | 0.0 | 0.0 | 97.3 | 11.7 | 0.0 |
| | 40 | 88.4 | 0.0 | 0.0 | 92.2 | 0.0 | 0.0 | 96.7 | 37.7 | 0.0 |
| | 42 | 99.1 | 0.0 | 0.0 | 99.2 | 5.5 | 0.0 | 99.1 | 32.2 | 0.0 |
| | 41 | 99.2 | 0.0 | 0.0 | 99.2 | | 0.3 | 99.1 | | 2.4 |
| | 73 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 14.4 | 0.0 | 0.0 | 57.1 | 16.2 | 0.0 |
| | 190 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 37.7 | 0.0 | 0.0 | 93.5 | 0.0 | 0.0 |
| | 183 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 33.1 | 0.0 | 0.0 | 68.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 187 | 1.8 | 0.0 | 0.0 | 16.7 | 0.0 | 0.0 | 77.9 | 6.4 | 0.0 |
| | 188 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 10.5 | 0.0 | 0.0 | 52.1 | 0.0 | 0.0 |
| | 184 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 6.8 | 0.0 | 0.0 | 78.7 | 3.9 | 0.0 |
| | 185 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 27.2 | 0.0 | 0.0 | 41.3 | 0.0 | 0.0 |
| | 186 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 37.1 | 0.0 | 0.0 |
| | 57 | 2.1 | 0.4 | 0.0 | 2.7 | 0.5 | 0.0 | 24.6 | 0.9 | 1.2 |
| | 58 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 2.0 | 1.5 | 0.0 | 17.9 | 2.5 | 1.1 |
| | 189 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 2.0 | 0.0 | 0.0 | 29.6 | 0.0 | 0.0 |
| | 74 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 3.6 | 18.5 | 0.0 | 0.0 |
| | 34 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 28.4 | 0.0 | 0.0 |
| | 29 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.2 | 2.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 35 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 36 | 0.0 | 0.0 | 1.0 | 0.0 | 0.0 | 0.2 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 56 | 4.7 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 1.5 | 0.0 | 10.3 | 10.4 | 1.2 | |
| 59 | 1.4 | 0.5 | 0.5 | 1.4 | 0.7 | 0.7 | 1.8 | 1.5 | 0.8 | |
| 60 | 0.3 | 2.4 | 0.0 | 0.6 | 0.0 | 0.0 | 0.5 | 0.3 | 0.0 | |
| 61 | 1.0 | 0.2 | 0.8 | 1.5 | 0.8 | 0.2 | 2.6 | 0.6 | 1.0 | |
| 62 | 3.6 | 0.7 | 1.8 | 2.4 | 1.2 | 2.2 | 2.3 | 1.7 | 2.5 | |
| <i>Fucus vesiculosus</i> | 221 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 4.2 | 0.0 | 0.0 | 40.7 | 0.0 | 0.0 |
| | 229 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.1 | 0.0 | 0.0 | 17.1 | 0.0 | 0.0 |
| | 23 | | | | | | | | | |
| | 220 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 7.6 | 0.0 | 0.0 |

| | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|-----|------|------|-----|------|------|-----|------|------|------|
| | 228 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 4.4 | 0.0 | 0.0 |
| <i>Chorda filum</i> | 92 | 56.3 | 24.9 | 0.0 | 82.1 | 62.6 | 0.0 | 91.9 | 75.2 | 44.9 |
| | 163 | 63.4 | 7.7 | 0.0 | 91.5 | 59.3 | 0.0 | 89.7 | 65.4 | 2.8 |
| | 93 | 46.6 | 1.7 | 0.0 | 72.1 | 44.5 | 0.0 | 87.8 | 76.1 | 3.4 |
| | 223 | 1.9 | 0.0 | 0.0 | 44.7 | 0.0 | 0.0 | 57.8 | 5.5 | 0.0 |
| | 224 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 2.2 | 0.0 | 0.0 | 66.1 | 0.0 | 0.0 |
| | 225 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 16.6 | 0.0 | 0.0 | 43.5 | 0.0 | 0.0 |
| | 222 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 16.6 | 0.0 | 0.0 | 42.9 | 0.0 | 0.0 |
| | 231 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 13.1 | 0.0 | 0.0 | 44.7 | 0.0 | 0.0 |
| | 227 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 34.4 | 0.0 | 24.1 |
| | 226 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 25.4 | 0.0 | 0.0 |
| | 232 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 25.0 | 0.0 | 0.0 |
| 230 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | |
| <i>Ascophillum nodosum</i> | 104 | 0.0 | 0.0 | 2.8 | 16.1 | 0.0 | 0.0 | 56.6 | 0.8 | 0.0 |
| <i>Durvillea antarctica</i> | 106 | 45.2 | 0.0 | 0.0 | 76.6 | 0.0 | 0.0 | 92.0 | 25.3 | 0.0 |

Activité inhibitrice (%) des molécules de la famille des amidons, des isolichenans, des xyloglucanes, des glucomannanes, des galactomannanes, des glycanes, des celluloses, des xanthanes vis-à-vis du virus de type A

| Famille de sucres | Type de virus | A/Brisbane/10/2007 | | | | | | | | |
|-------------------|------------------------------|--------------------|---------|----------|---------------|---------|----------|---------------|---------|----------|
| | Dose virale | 100CCID50/50µl | | | 30CCID50/50µl | | | 10CCID50/50µl | | |
| | Dose antivirale Molécules | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml |
| Amidon | 199 | 41.7 | 0.0 | 0.0 | 49.8 | 0.0 | 0.0 | 76.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 200 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 50.1 | 0.0 | 0.0 |
| | 197 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 44.8 | 0.0 | 0.0 |
| | 198 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Isolichenan | 63 | 5.3 | 0.0 | 0.0 | 17.3 | 1.5 | 1.9 | 26.8 | 9.3 | 4.0 |
| | 64 | 4.4 | 0.2 | 0.0 | 13.3 | 8.5 | 3.6 | 22.2 | 4.4 | 0.0 |
| | 66 | 4.4 | 0.0 | 0.0 | 13.8 | 3.3 | 5.0 | 29.8 | 8.0 | 0.0 |
| | 65 | 6.0 | 4.1 | 3.6 | 7.2 | 2.3 | 3.7 | 5.6 | 0.0 | 0.0 |
| | 127 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 128 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 129 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 130 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 132 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 133 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Xyloglucane | 4 | 87.6 | 0.0 | 0.0 | 94.5 | 0.0 | 0.0 | 96.2 | 24.8 | 0.3 |
| | 13 | 12.1 | 0.0 | 0.0 | 24.0 | 5.7 | 0.0 | 18.7 | 11.6 | 20.9 |
| | 1 | 17.2 | 10.3 | 13.0 | 20.0 | 10.1 | 15.3 | 27.6 | 10.2 | 10.1 |
| | 5 | 8.7 | 2.4 | 2.4 | 22.4 | 12.7 | 7.3 | 29.3 | 16.3 | 8.0 |
| | 6 | 4.4 | 0.0 | 0.0 | 11.6 | 7.0 | 0.0 | 19.0 | 13.0 | 3.3 |
| | 49 | 7.0 | 3.7 | 1.9 | 15.2 | 3.9 | 6.6 | 46.2 | 2.8 | 17.2 |
| | 15 | 7.4 | 0.0 | 0.0 | 12.2 | 5.3 | 0.2 | 15.4 | 0.0 | 0.0 |
| | 50 | 4.5 | 4.7 | 1.1 | 5.4 | 7.3 | 5.5 | 11.3 | 7.4 | 8.3 |

| | | | | | | | | | | |
|-----------|-----|------|------|-----|------|------|-----|------|------|------|
| | 7 | 2.5 | 1.1 | 1.4 | 4.3 | 0.7 | 5.0 | 0.0 | 0.0 | 1.3 |
| | 8 | 3.4 | 2.1 | 0.0 | 6.7 | 4.2 | 0.0 | 3.4 | 15.2 | 0.0 |
| | 9 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.8 | 0.6 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 10 | 0.6 | 0.0 | 0.0 | 2.3 | 0.0 | 0.0 | 7.2 | 3.3 | 3.3 |
| | 11 | 1.7 | 1.1 | 1.4 | 0.0 | 3.2 | 2.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 12 | 1.2 | 1.1 | 0.0 | 8.5 | 4.1 | 0.0 | 4.6 | 4.5 | 0.0 |
| | 47 | 3.6 | 0.1 | 0.0 | 0.3 | 0.0 | 0.6 | 7.0 | 9.6 | 3.5 |
| | 48 | 2.4 | 3.2 | 1.9 | 4.4 | 3.5 | 1.2 | 9.0 | 6.8 | 3.9 |
| | 51 | 0.0 | 5.2 | 0.0 | 0.0 | 10.5 | 0.0 | 0.0 | 8.8 | 1.8 |
| | 52 | 1.0 | 2.0 | 2.7 | 0.6 | 2.4 | 4.1 | 4.9 | 3.1 | 3.5 |
| | 126 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 2 | 15.0 | 10.3 | 4.7 | 15.5 | 9.1 | 2.4 | 3.1 | 15.1 | 0.0 |
| | 3 | 0.0 | 5.0 | 0.4 | 4.0 | 14.4 | 5.5 | 0.7 | 21.1 | 28.4 |
| | | | | | | | | | | |
| | 174 | 46.5 | 0.0 | 0.0 | 64.2 | 0.0 | 0.0 | 94.8 | 3.1 | 2.1 |
| | 68 | 10.5 | 0.0 | 0.0 | 12.0 | 0.6 | 0.0 | 17.0 | 7.3 | 0.0 |
| | 69 | 9.7 | 0.0 | 4.8 | 11.9 | 3.6 | 5.4 | 11.7 | 4.4 | 2.0 |
| | 26 | 3.4 | 1.6 | 0.0 | 2.3 | 3.0 | 3.8 | 15.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 67 | 9.7 | 2.8 | 0.0 | 10.3 | 2.3 | 0.0 | 13.2 | 4.7 | 6.9 |
| | 25 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.2 | 0.0 | 3.2 | 1.2 | 7.6 |
| | 24 | 0.0 | 0.0 | 1.6 | 0.0 | 0.0 | 1.4 | 1.3 | 11.2 | 14.3 |
| | 27 | 1.1 | 0.7 | 0.0 | 0.0 | 0.3 | 1.5 | 0.0 | 15.0 | 5.6 |
| | 70 | 4.0 | 0.0 | 0.0 | 3.4 | 1.8 | 0.7 | 0.0 | 1.8 | 0.0 |
| | 175 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 176 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 177 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 178 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 179 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 180 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 181 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 182 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 3.3 | 0.0 | 0.0 |
| | | | | | | | | | | |
| | 71 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 72 | 1.9 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 5.7 | 13.2 | 2.4 |
| | 75 | 2.3 | 0.0 | 0.0 | 3.2 | 0.0 | 0.0 | 9.8 | 0.0 | 4.2 |
| | 76 | 0.0 | 0.6 | 0.0 | 0.0 | 1.9 | 1.6 | 9.2 | 4.0 | 1.4 |
| | 201 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 202 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 203 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 204 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 205 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | | | | | | | | | |
| | 173 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 2.1 | 23.6 | 39.0 |
| | 171 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 170 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 6.8 |
| | 172 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 32.9 | 19.1 |
| | 169 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 207 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | | | | | | | | | |
| Cellulose | 191 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | | | | | | | | | |
| Xanthane | 192 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |

| | | | | | | | | | | |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 193 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 194 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 195 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 196 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Dextrane | 28 | | | | | | | | | |

Activité inhibitrice (%) des molécules de la famille des amidons, des isolichenans, des xyloglucanes, des glucomannanes, des galactomannanes, des glycanes, des celluloses, des xanthanes vis-à-vis de virus de type B

| Famille de sucres | Type de virus | B/Florida/4/06 | | | | | | | | |
|-------------------|------------------------------|----------------|---------|----------|---------------|---------|----------|---------------|---------|----------|
| | Dose virale | 100CCID50/50µl | | | 30CCID50/50µl | | | 10CCID50/50µl | | |
| | Dose antivirale Molécules | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml | 250µg/ml | 25µg/ml | 2.5µg/ml |
| Amidon | 199 | 20.1 | 0.0 | 0.0 | 66.7 | 0.0 | 0.0 | 100.0 | 22.4 | 0.0 |
| | 200 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 24.5 | 0.0 | 0.0 | 75.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 197 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 37.5 | 0.0 | 0.0 |
| | 198 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Isolichenan | 63 | 18.1 | 0.0 | 0.0 | 52.2 | 10.3 | 7.7 | 79.0 | 18.9 | 3.2 |
| | 66 | 13.4 | 3.8 | 0.0 | 28.5 | 6.8 | 0.0 | 69.2 | 6.4 | 0.0 |
| | 64 | 11.2 | 6.5 | 12.8 | 18.4 | 0.0 | 0.0 | 58.9 | 2.8 | 5.5 |
| | 65 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.3 | 0.0 | 0.8 | 20.6 | 0.0 | 1.4 |
| | 127 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 128 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 7.1 | 0.0 |
| | 129 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 130 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 132 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 133 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | |
| Xyloglucane | 49 | 9.5 | 9.1 | 0.0 | 18.9 | 10.7 | 3.7 | 26.5 | 13.2 | 4.7 |
| | 1 | 9.5 | 3.5 | 3.1 | 6.0 | 0.0 | 0.0 | 13.6 | 0.0 | 0.0 |
| | 4 | 6.0 | 2.9 | 4.5 | 4.6 | 3.8 | 0.0 | 11.8 | 2.5 | 3.1 |
| | 15 | 6.4 | 7.5 | 2.5 | 8.6 | 3.2 | 0.0 | 11.2 | 3.7 | 0.0 |
| | 2 | 0.3 | 1.5 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.3 | 0.0 |
| | 3 | 5.3 | 7.2 | 6.0 | 5.6 | 0.0 | 2.1 | 7.7 | 4.4 | 1.8 |
| | 5 | 3.7 | 3.0 | 0.0 | 4.5 | 1.0 | 0.0 | 7.7 | 2.0 | 0.0 |
| | 6 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 7 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.3 | 0.0 | 0.0 |
| | 8 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.6 | 0.0 | 0.0 | 0.5 | 0.6 | 0.0 |
| | 9 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.5 | 1.0 | 1.3 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 10 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 2.0 | 1.0 | 0.5 | 0.6 | 0.0 | 0.0 |
| | 11 | 1.0 | 0.0 | 0.6 | 1.1 | 0.0 | 0.0 | 1.2 | 0.5 | 0.9 |
| | 12 | 0.2 | 0.0 | 0.0 | 1.0 | 0.8 | 0.0 | 1.1 | 1.6 | 0.0 |
| | 13 | 3.0 | 22.2 | 0.0 | 8.0 | 12.0 | 0.0 | 4.0 | 2.6 | 0.0 |
| | 47 | 0.0 | 1.9 | 0.0 | 3.7 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 2.9 | 0.0 |
| 48 | 4.6 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | |
| 50 | 0.0 | 0.0 | 0.5 | 2.5 | 0.0 | 5.7 | 5.4 | 20.4 | 10.9 | |

| | | | | | | | | | | |
|----------------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 51 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 52 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.5 | 0.0 | 2.3 |
| | 126 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 6.0 | 0.0 |
| | | | | | | | | | | |
| Glucomannane | 174 | 51.0 | 0.0 | 0.0 | 72.0 | 0.0 | 0.0 | 98.8 | 0.0 | 0.0 |
| | 178 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 20.9 | 0.0 | 0.0 |
| | 24 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 25 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.3 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 26 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 5.7 | 0.0 |
| | 27 | 0.0 | 0.0 | | 1.1 | 0.0 | | 0.0 | 0.0 | |
| | 67 | 3.6 | 7.8 | 12.9 | 14.9 | 16.2 | 9.9 | 17.7 | 19.3 | 10.8 |
| | 68 | 4.0 | 21.4 | 32.5 | 14.8 | 25.2 | 39.7 | 18.7 | 28.5 | 40.8 |
| | 69 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.8 | 0.0 | 0.0 | 7.5 | 0.0 | 0.0 |
| | 70 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 175 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 176 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 177 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 179 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 180 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 181 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 182 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | |
| | | | | | | | | | | |
| Galactomannane | 71 | 4.3 | 0.0 | 0.0 | 8.6 | 0.0 | 0.0 | 32.9 | 16.3 | 0.0 |
| | 76 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 17.4 | 0.0 | 0.0 |
| | 75 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 6.4 | 0.0 | 0.0 | 5.2 | 0.0 | 0.0 |
| | 72 | 0.0 | 0.0 | 1.6 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 201 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 202 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 203 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 204 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 205 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | | | | | | | | | |
| Glycane | 173 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 30.1 | 15.8 | 0.0 |
| | 171 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 23.1 | 28.5 | 0.0 |
| | 170 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.9 | 18.7 | 4.2 | 22.0 |
| | 172 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 2.6 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 29.3 |
| | 169 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 8.8 |
| | 207 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | | | | | | | | | |
| Cellulose | 191 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | | | | | | | | | |
| Xanthane | 192 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 193 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 194 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 195 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 196 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | | | | | | | | | |
| Dextrane | 28 | | | | | | | | | |

ANNEXE 2

RESULTATS DE TOXICITE CELLULAIRE

| Molécule | % Toxicité (phase de croissance) | | | % Toxicité (phase confluente) | | |
|----------|----------------------------------|----------|-----------|-------------------------------|----------|-----------|
| | 250 µg/ml | 25 µg/ml | 2,5 µg/ml | 250 µg/ml | 25 µg/ml | 2,5 µg/ml |
| 4 | 0.1 | 2.1 | 2.2 | 0.6 | 2.6 | 2 |
| 14 | 0.1 | 0.7 | 1.4 | | | |
| 20 | 2.6 | 0.1 | 0.6 | 0.9 | 1.6 | 1.4 |
| 21 | 2.7 | 2.3 | 4.5 | 1.8 | 2.6 | 1.9 |
| 22 | 3.3 | 2.4 | 1.8 | | | |
| 33 | 11.2 | 0.6 | 1 | 0.7 | 2 | 0.3 |
| 37 | | | | 99.9 | 3.4 | 1.8 |
| 38 | | | | 100 | 2.5 | 0.6 |
| 39 | | | | 100 | 1.1 | 0.2 |
| 40 | | | | 100 | 2.7 | 0.7 |
| 41 | | | | 100 | 2.6 | 0.4 |
| 42 | | | | 98.9 | 4.6 | 2.6 |
| 43 | | | | 99.6 | 99.7 | 1.19 |
| 44 | | | | 99.6 | 94.3 | 0.9 |
| 45 | | | | 99.4 | 99.3 | 1.3 |
| 46 | | | | 99.7 | 99.3 | 1.3 |
| 54 | 2 | 2 | 2.5 | 1.3 | 1.1 | 1.1 |
| 67 | 15.8 | 0 | 1.9 | 0 | 2.3 | 1.9 |
| 68 | 0 | 0.2 | 3.5 | 0 | 1.4 | 0.4 |
| 79 | 1.4 | 0.7 | 0.5 | 0.2 | 1.4 | 1.3 |
| 80 | 2.8 | 0.8 | 0.7 | 0 | 1.9 | 0 |
| 81 | 14.7 | 0 | 8.7 | 0 | 0.2 | 1.3 |
| 82 | 20.7 | 0 | 4.0 | 0 | 2.8 | 2.8 |
| 83 | 16 | 0 | 10.4 | 0 | 1.3 | 2.2 |
| 86 | 47.8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.6 |
| 87 | 29.8 | 0 | 0 | 0 | 2.4 | 2.4 |
| 88 | 10.0 | 0 | 0 | 0 | 2.1 | 1.8 |
| 89 | 30.1 | 0 | 0 | 0 | 0.7 | 0.8 |
| 90 | 4.42 | 0 | 0 | 0.5 | 1 | 1.1 |
| 91 | 12.3 | 0 | 0 | 1.7 | 1.8 | 1.5 |
| 92 | 43.6 | 0 | 0 | 1.4 | 1.4 | 1.6 |
| 93 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.3 | 0.1 |
| 96 | 23.5 | 0 | 0 | 0 | 1.8 | 2.3 |
| 97 | 21.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.7 |
| 98 | 12.8 | 0.4 | 1.4 | 0 | 2.4 | 1.4 |
| 99 | 3.5 | 0 | 0 | 0 | 0.2 | 0 |
| 101 | 0 | 4.0 | 0 | 1.2 | 1.2 | |
| 103 | 7.8 | 0 | 0 | 0.6 | 2 | 2.8 |
| 104 | 3.0 | 1.3 | 0 | 0 | 1.8 | 1.5 |
| 105 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.5 | 1.7 |
| 106 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.9 | 1.5 |
| 109 | 14.2 | 1.7 | 0 | 0 | 0.6 | 0.5 |

| Molécule | % Toxicité (phase de croissance) | | | % Toxicité (phase confluente) | | |
|----------|----------------------------------|----------|-----------|-------------------------------|----------|-----------|
| | 250 µg/ml | 25 µg/ml | 2,5 µg/ml | 250 µg/ml | 25 µg/ml | 2,5 µg/ml |
| 151 | 7.7 | 1 | 2.2 | 0 | 1.1 | 0.6 |
| 152 | 1.1 | 0 | 0.3 | 0 | 0 | 0 |
| 153 | 2.2 | 1.4 | 1 | 1.8 | 2.5 | 2.5 |
| 156 | 6.2 | 0.8 | 0.5 | 0.8 | 1.3 | 1.1 |
| 157 | 3.7 | 0.2 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 1 |
| 158 | 5.6 | 1.9 | 1.7 | 2.8 | 1.4 | 1.5 |
| 159 | 1.3 | 0.8 | 0.6 | 1.1 | 1.6 | 0.8 |
| 160 | 10.8 | 0.3 | 0.3 | 0.8 | 0.3 | 0.1 |
| 161 | 5.4 | 1.4 | 1.6 | 2 | 1.7 | 1.6 |
| 162 | 4.6 | 1.4 | 0.1 | 0.5 | 0.2 | 0.3 |
| 163 | 0.9 | 0.2 | 0 | 0 | 0.2 | 0.2 |
| 164 | 3.6 | 2.2 | 2.3 | 1 | 1.8 | 0.1 |
| 165 | 3 | 0.9 | 0.8 | 0.1 | 0.9 | 0.5 |
| 166 | 2.3 | 0.9 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 167 | 5.5 | 3.2 | 2.9 | 0 | 0.1 | 0.1 |
| 174 | 10.5 | 0 | 0 | 15.4 | 1.5 | 0.2 |
| 178 | 0 | 0 | 0 | 0.2 | 0 | 0 |
| 183 | 0 | 0 | 0 | 4.1 | 0 | 2.3 |
| 184 | 0 | 0 | 0 | 3.4 | 0 | 0.9 |
| 185 | 0 | 3.1 | 0 | 0 | 0 | 3.9 |
| 186 | 0 | 0 | 0 | 0.9 | 4.8 | 0.1 |
| 187 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.6 | 0 |
| 188 | 0 | 0 | 0 | 0.1 | 2.7 | 2.9 |
| 189 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.1 | 1.5 |
| 190 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 197 | 6.5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 199 | 13.8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 200 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 208 | 0 | 0.2 | 0 | 3.2 | 3.7 | 4.4 |
| 209 | 0 | 0 | 0 | 3.6 | 2.6 | 5.7 |
| 210 | 0 | 0 | 0 | 2.4 | 3.3 | 3.9 |
| 211 | 0 | 0 | 0 | 6.3 | 4.1 | 2.5 |
| 212 | 0 | 0 | 0 | 2.6 | 2.5 | 2.4 |
| 213 | 0 | 0 | 0 | 2.8 | 2.7 | 1.8 |
| 214 | 5.7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 217 | 0 | 0 | 0 | 3.6 | 0 | 0 |
| 218 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.3 | 1.8 |
| 221 | 0 | 0 | 5.8 | 0.5 | 4 | 0.7 |
| 222 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 223 | 0.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 224 | 3.8 | 0 | 0 | 0 | 1.4 | 5.6 |
| 225 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | | |
|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 110 | 0 | 0 | 0 | 0.2 | 0.1 | |
| 111 | 0 | 0 | 0 | 0.5 | 0.4 | 0.6 |
| 112 | 10.3 | 0 | 0 | 0.7 | 3.6 | 2.3 |
| 113 | 0 | 0 | 0 | 2.5 | 2.8 | 1.4 |
| 115 | 0 | 0 | 0 | 4 | 2.2 | 0.8 |
| 116 | 0 | 3.3 | 5.5 | 1.9 | 3.2 | 1.9 |
| 117 | 0 | 0 | 0 | 1.5 | 1.8 | 0.3 |
| 122 | 1.9 | 0 | 0 | 0.1 | 0 | 0.2 |
| 124 | 12.5 | 0 | 0 | 1.5 | 0 | 0 |
| 134 | 0 | 0 | 0 | 1.3 | 0.6 | |
| 135 | 0.4 | 0.5 | 0.9 | 1.3 | 2.5 | 2.6 |
| 137 | 1.9 | 0.6 | 0.8 | 0.1 | 1.5 | 2 |
| 138 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.7 | 0.8 |
| 139 | 1.5 | 1.5 | 2.8 | 1.1 | 2.4 | 2.2 |
| 140 | 2.5 | 1.2 | 1.6 | 0.7 | 2.3 | 1.7 |
| 141 | 2.1 | 0.7 | 0.4 | 1 | 0.5 | 0.2 |
| 144 | 2.8 | 3.2 | 3.7 | 0.3 | 2.4 | 2.5 |
| 148 | 1.9 | 1.5 | 1.3 | 0 | 0.5 | 1.2 |
| 149 | 0.4 | 1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0 |
| 150 | 3.7 | 1.9 | 3.2 | 0 | 1.7 | 1.7 |

| | | | | | | |
|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 226 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 227 | 16.7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 229 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6.4 | 5.4 |
| 231 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.9 | 5.4 |
| 232 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.4 | 2.6 |
| 233 | 16.2 | 9.9 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 234 | 21.3 | 1.6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 235 | 8.8 | 0 | 0 | 0 | 6.9 | 5.2 |
| 236 | 3.1 | 0 | 0 | 0 | 2.9 | 0 |
| 237 | 46 | 27 | 3.7 | 0 | 2 | 2.3 |
| 238 | 46.2 | 33 | 5.3 | 0 | 3.5 | 0.8 |
| 239 | 30.4 | 22 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 240 | 26 | 13 | 0 | 1.7 | 0 | 0 |
| 241 | 0 | 0 | 1.4 | 0 | 0 | 0 |
| 242 | 49.5 | 31 | 5.9 | 7.3 | 1.5 | 0 |
| 243 | 0 | 0 | 0 | 11 | 2.3 | 4.6 |
| 246 | 18.4 | 0.6 | 0 | 6.5 | 0.4 | 2.4 |
| 247 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 248 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

ANNEXE 3

TAMPONS ET REACTIFS

1. Tampons d'utilisation courante

PBS (concentré 10 fois) pH 7,2 – 7,4

| | |
|---|--------|
| NaCl | 80 g |
| KCl | 2 g |
| Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O | 14,3 g |
| KH ₂ PO ₄ | 2 g |
| H ₂ O distillé qsp | 1 L |

SALK (concentré 20 fois)

| | |
|---------------------------------|--------|
| NaCl | 170 g |
| KH ₂ PO ₄ | 13,6 g |
| NaOH | 3 g |
| H ₂ O distillé qsp | 1 L |

2. Tampon de lavage – PBS-Tween 20 - 0,1 % (v/v)

| | |
|---------------|-------|
| PBS | 99 ml |
| Tween 20 10 % | 1 ml |

3. Tampon citrate/ethanol pH 4,8 pour la méthode au rouge neutre

Solution A

| | |
|--|------|
| C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O | 21 g |
| NaOH | 8 g |
| H ₂ O distillé qsp | 1 L |

Solution B HCl 0,1N

Composition : X ml de A + (150 – X) ml de B = C

Y ml de C + Y ml d'éthanol absolu