

THÈSE DE DOCTORAT EN COTUTELLE

Pour l'obtention du grade de Docteur délivré par

l'Université de Lille

Spécialité Biotechnologies agroalimentaires, sciences de l'aliment, physiologie
et

l'Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie (Université de Carthage)

Spécialité Génie Biologique

LES MÉTABOLITES SPÉCIALISÉS DU GENRE *JUNCUS* : APPROFONDISSEMENT DE LEUR POTENTIEL ANTIMICROBIEN ET ÉTUDE DE LEUR BIODISPONIBILITÉ

Préparée au sein de l'UMRt 1158 BioEcoAgro, Institut Charles Viollette

et

le LPAM, Centre de Biotechnologie de Borj Cédria

Présentée et soutenue publiquement à Lille le 24 Octobre 2023 par

Asma HAKEM

Composition du Jury :

Dr HDR Stéphanie Krisa
Pr Taoufik Ghrairi
Pr Sophie Tomasi
Pr Chedly Chouchani

Université de Bordeaux
Université de Tunis El Manar
Université de Rennes
Institut Supérieur des Sciences et
Technologies de l'Environnement
de Borj Cédria
Université de Lille
Centre de Biotechnologie de Borj
Cédria
Centre d'Infection et d'Immunité
de Lille
Université de Lille

Rapportrice
Rapporteur
Examinatrice
Président du jury,
Examinateur

Pr Céline Rivière
Pr Riadh Ksouri

Directrice de thèse
Directeur de thèse

Dr Karin Séron

Membre invité

Pr Nicolas Blanchemain

Membre invité

À la mémoire de ma chère mentor le Dr Christel Neut

Vous m’avez tellement marquée pendant ces quatre années de thèse par votre immense passion pour la recherche, votre sincérité, votre modestie infinie et votre incroyable bienveillance.

Je n’oublierai jamais les matinées du samedi matin au laboratoire, consacrées à la lecture des boîtes de Pétri, et les journées de manips qui commençaient à 7 h du matin. Vous étiez toujours la première personne à qui je disais BONJOUR. Je me souviendrai toujours de vos conseils, de nos nombreux sujets de discussion et surtout de votre gentillesse envers moi, même durant les quelques jours avant votre départ.

Je me considère vraiment très chanceuse d’avoir fait votre connaissance et je vous garderai précieusement dans mon cœur pour toute ma vie.

DÉDICACES

*Je dédie ce travail
À mes chers parents
en témoignage de mon plus grand respect et mon profond amour
Je ne vous remercierai jamais assez pour tous vos sacrifices, vos
encouragements et votre amour*

*À mes chères sœurs Wefa, Ons et Yosr, mon cher frère Montassar et
ma nièce Assia auxquels je dois de l'amour, avec tous mes souhaits de
les voir réussir dans leurs vies
À ma superbe copine Lamia pour ton soutien continu*

*À ma deuxième famille en France :
Victoire, Philippine, Sabrina et Pierre-Antoine
Et
Nathalie et Joël mes superbes propriétaires*

*À mes amis(es) et mes collègues
Merci d'être à mes côtés et de m'insuffler le courage et la force d'aller
toujours plus loin*

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier, tout d'abord, Mesdames et Messieurs les membres de Jury, rapporteurs et examinateurs : Dr Stéphanie Krisa, Pr Taoufik Ghrairi, Pr Sophie Tomasi et Pr Chedly Chouchani, d'avoir accepté l'invitation de faire partie de ce jury et d'avoir bien voulu juger ces travaux.

Je remercie également la regrettée Dr Christel Neut, le Dr Karin Séron et le Dr Marion Girardot d'avoir fait partie de mes comités de suivi individuels de thèse, merci d'avoir pris le temps pour la lecture de mes manuscrits et merci pour vos conseils et vos judicieuses orientations.

Je tiens à faire part de toute ma reconnaissance envers mes directeurs de thèse, le Pr Céline Rivière et le Pr Riadh Ksouri, qui m'ont guidée, conseillée et encouragée tout au long de ces quatre années de thèse. Je vous remercie énormément de m'avoir fait confiance et de m'avoir intégrée à ce sujet de thèse. J'espère avoir été à la hauteur. Merci beaucoup Céline pour votre patience, vos conseils pertinents et vos relectures attentives de mes rapports de CSI, de mes résumés de congrès et de manuscrit de thèse. Merci Mr Ksouri pour votre soutien, réactivité et aide pour les procédures administratives, souvent très longues et compliquées.

Je souhaiterais adresser ma profonde reconnaissance à tous mes collègues du laboratoire de pharmacognosie de la faculté de pharmacie de Lille, avec qui l'aventure avait commencé depuis mon stage de fin d'étude de M2. Le travail auprès de vous a été tellement agréable, nous avons partagé de très beaux moments ensembles (les fêtes d'anniversaire, les repas de labo, les pots). Un grand merci à Mme Sevser Sahpaz, cheffe de service du laboratoire de pharmacognosie, pour votre accueil au sein de l'équipe, votre bienveillance et votre gentillesse.

Jennifer Samaillie, tu es vraiment une perle. Je ne sais pas ce qu'on ferait sans toi au laboratoire ! Tu viens toujours à notre secours et tu es toujours prête à apporter de l'aide. Je te remercie beaucoup de m'avoir formée et de m'avoir assistée durant les expériences sur les équipements de CPC et de RMN mais pas que.

Je te remercie beaucoup Djamila Amini pour ton aide logistique, ton investissement incroyable dans la vie des étudiants et surtout pour l'ambiance et les good vibes que tu mets au laboratoire. Je me rappellerai toujours de nos petites sorties.

Remerciements

Je remercie également les membres permanents du laboratoire et tous mes collègues en doctorat et en post-doctorat, et les ingénieurs de recherche qui sont d'une gentillesse incroyable : Vincent Roumy, Simon Bordage, Thierry Hennebelle, Abda Ba, Malak Al Ibrahim, Mariam Taha, Anne-Sophie Paguet, Augustin Bildstein, Gabriel Lefèvre, Évariste Zachee et Sophie Moreau. Je pense aussi aux étudiants en stage que j'ai croisés au cours de ces quatre années.

Une mention spéciale à mon collègue le doctorant Abda Ba. Je te remercie beaucoup pour ton aide à la résolution de mes calculs fastidieux, de tes encouragements et d'avoir toujours resté tard avec moi au laboratoire pour que je puisse finaliser mes dénombrements en bactériologie. Je te souhaite une très belle chance dans ton aventure en tant qu'ATER à l'Université de Nantes et pour ton parcours professionnel futur. J'espère que notre amitié durera pour toujours.

Merci à Malak et à Mariam, mes deux collègues devenues de proches amies pour avoir participé à créer une ambiance agréable au bureau des étudiants. Je vous souhaite tout le meilleur.

J'en profite aussi pour remercier Malika (la Queen des gâteaux) et Magali.

Je tiens à remercier nos collaborateurs du laboratoire de bactériologie de la faculté de pharmacie de Lille (Inserm U1286 Infinite, Université de Lille), particulièrement le Dr Christel Neut pour avoir porté grand intérêt à ce travail. Je suis bien triste que vous soyez partie avant le jour de ma soutenance :’(... mais je n'oublierai jamais vos précieux conseils. Isabelle Houcke et Séverine Mahieux, je vous remercie de tout mon cœur d'avoir partagé votre savoir et vos connaissances. Je vous remercie aussi de votre disponibilité et votre aide pour la préparation des milieux de culture et l'autoclavage. J'ai passé de très beaux moments auprès de vous. La pause thé me manque déjà beaucoup ! Isabelle, j'ai adoré nos nombreuses discussions, tu m'as ouvert l'esprit sur de nombreux sujets ! Merci pour ton aide lorsque j'ai été débordée et pour ton écoute quand j'avais besoin de souffler un peu. Séverine, je te remercie beaucoup pour ton aide technique et je souhaite que tu arrives à accomplir ton rêve professionnel.

Je remercie très sincèrement nos autres collaborateurs :

- le Dr Karin Séron (Inserm U1019, CNRS UMR8204, Institut Pasteur de Lille) et son équipe pour la réalisation des différents tests de l'étude de l'activité antivirale contre les coronavirus. Merci Karin pour les échanges et votre aide dans la réalisation de l'article.

- le Dr Benoît Cudennec et le Pr Rozenn Ravallec de l'UMRt 1158 BioEcoAgro pour mon accueil au sein de leur laboratoire. Un grand merci au Dr Benoît Cudennec pour sa réactivité et d'être toujours à l'écoute. Je remercie également la doctorante Pauline Bruniaux, l'ingénieure de recherche le Dr Mathie Tenenbaum et l'ingénieure d'étude, Hairati Aboubacar pour leur aide

Remerciements

dans la mise en place des expériences de digestion gastro-intestinale statique *in vitro*, de cytotoxicité et de passage de barrière intestinale *in vitro*.

- le Dr Christophe Flahaut, le Dr Barbara Deracinois de la plateforme technique REALCAT et l'ingénieure d'étude Tahiri Andriamanarivo pour leur aide dans la réalisation des analyses en spectrométrie de masse haute résolution.

- le Pr Nicolas Blanchemain, le doctorant Henry Chijcheapza-Flores et l'assistant ingénieur Mickaël Maton (INSERM U1008 "Advanced Drug Delivery Systems", site Faculté de médecine, Université de Lille) pour la conceptualisation et la mise en place des expériences de formulation topique et pour les réunions très enrichissantes. Merci beaucoup Henry pour ton investissement et ton aide. J'ai appris beaucoup de choses auprès de toi en matière de chimie des polymères.

- le Pr Nathalie Azaroual et les ingénieurs Vincent Ultré et Alexandre Rech du plateau RMN de la Faculté de Pharmacie de Lille pour leur assistance technique et la formation sur le logiciel pilotant l'équipement de la RMN.

- le Dr Moustafa Kouach du plateau de spectrométrie de masse de la Faculté de Pharmacie de Lille (ULR 7365 GRITA) pour la réalisation des analyses en HRMS des produits isolés.

Je suis infiniment reconnaissante au Pr Céline Rivière, à Jennifer Samaillie et à l'étudiante Rawen Ben Malek (actuellement en thèse en cotutelle à l'Université Paris-Saclay et Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) pour leur aide dans la conduite des expériences programmées pendant ma première année de thèse durant et après le confinement suite à la pandémie de la Covid-19. Céline, Jennifer et Thierry, je vous remercie pour l'élucidation structurale des molécules que j'ai pu isoler durant ces travaux de thèse.

Je tiens finalement à remercier le Dr Ramla Sahli (actuellement en poste de maître de conférences à l'Université de Tours) qui a été à l'initiative, avec mes encadrants, du projet PHC Utique. Je remercie tous les établissements qui ont participé au financement de ma thèse : Campus France (programme PHC Utique 2020), l'Université de Lille (bourse Moblilex), l'Université de Carthage (2 bourses d'alternance, session 2021 et session 2022) et particulièrement le Dr Christel Neut et le Pr Nicolas Blanchemain, car grâce à leur financement complémentaire, j'ai pu initier des travaux de développement d'une formulation topique à base d'une des molécules bioactives isolées. Grâce à ce travail, une perspective vers une application clinique pourrait être envisagée.

Remerciements

Je remercie aussi l'UMRt 1158 BioEcoAgro, le laboratoire de pharmacognosie et mon école doctorale SMRE de m'avoir donné l'opportunité de participer à des congrès internationaux.

Enfin, mes remerciements les plus chaleureux s'adressent à ma famille, maman, papa, mes sœurs et mon frère pour leur soutien moral et leurs encouragements tout au long de mes études. Si j'en suis arrivée là, c'est grâce à vous, vos valeurs et votre amour ! J'espère que vous êtes fiers de moi.

Un grand merci à ma meilleure copine Lamia qui m'a beaucoup soutenue. Tu as été présente dans les bons moments et dans les moins bons depuis le début de ma thèse, tu m'as aidé à relever la tête quand j'en avais besoin. Je te souhaite plein de bonheur et de réussite professionnelle ! Je me souviendrai longtemps de notre voyage à Naples ! Et je viendrai certainement te rendre visite à Munich !

Je remercie également ma deuxième famille, qui grâce à elle je ne me suis pas sentie seule en France. Victoire, Philippine, Sabrina et Pierre-Antoine merci pour votre soutien et vos encouragements. Je suis très contente d'avoir répondu à votre annonce d'emploi de baby-sitter en 2016 pour garder votre petite Victoire.

Je remercie spécialement mes propriétaires Nathalie et Joël. Je suis si contente de vivre chez vous. Je me sens vraiment comme si je suis dans ma famille en Tunisie. Nathalie, merci de m'avoir soutenue pendant les longues journées de rédaction et merci pour les petites attentions envers moi !

Un grand merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail.

Table des matières

DÉDICACES	ii
REMERCIEMENTS.....	iii
VALORISATION SCIENTIFIQUE	xxv
CONTEXTE DE L'ÉTUDE	2
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	6
1. Pathologies émergentes : cas du coronavirus SARS-CoV2	7
1.1 Historique.....	7
1.2. Epidémiologie et symptomatologie	7
1.3. Origine et transmission	9
1.4. Cycle de vie du virus.....	10
1.5. Mutations et traitements actuels.....	12
2. Résistance aux antibiotiques	17
2.1. Généralités, historique et définitions	17
2.2. Mécanismes de résistances aux antibiotiques	20
2.3. Répercussions économiques engendrées par la résistance aux antibiotiques	21
2.4. Cas de <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline (SARM)	24
3. Données botaniques et phytochimiques liées au genre <i>Juncus</i>	35
3.1. Description botanique du genre <i>Juncus</i>	35
3.2. Répartition géographique et écologie du genre <i>Juncus</i>	35
3.3. Botanique et répartition des espèces du genre <i>Juncus</i> étudiées	36
3.3.1. <i>Juncus acutus</i> L.	36
3.3.2. <i>Juncus inflexus</i> L.	38
3.3.3. <i>Juncus maritimus</i> Lam.	39
3.4. Utilisations traditionnelles des espèces du genre <i>Juncus</i>	41
3.4.1. Usages thérapeutiques traditionnels	41
3.4.2. Autres utilisations traditionnelles.....	41
3.5. Métabolites spécialisés des espèces du genre <i>Juncus</i>	42
3.5.1. Dérivés phénanthréniques	43
3.5.2. Les flavonoïdes	52
3.5.3. Les coumarines.....	53
3.5.4. Les stilbènes	54
3.5.5. Les terpènes.....	54
3.5.6. Les acides phénols.....	55

3.6. Activités biologiques des dérivés phénanthréniques isolés du genre <i>Juncus</i>	55
3.6.1. Activités antimicrobiennes des composés phénanthréniques isolés chez le genre <i>Juncus</i>	56
3.6.1.1. Activités antibactériennes	56
3.6.1.2. Activités antifongiques	61
3.6.1.3. Activités antivirales	61
3.6.2. Cytotoxicité des composés phénanthréniques	62
4. Mise en place d'une formulation topique à base de juncusol	66
4.1. Contexte : pied diabétique et <i>Staphylococcus aureus</i>	66
4.2. Les hydrogels de polymères naturels	67
4.2.1. Le chitosane	68
4.2.2. Les cyclodextrines	69
4.2.3. Les polymères de cyclodextrines (PCDs)	71
4. Étude préliminaire de la biodisponibilité des composés phénanthréniques issus des espèces de <i>Juncus</i>	74
Chapitre 2 : Résultats & Discussion	77
1. Étude de l'activité antivirale des tiges de <i>J. acutus</i> (JA2) contre le coronavirus HCoV-229E	77
1.1. Activité antivirale des 3 espèces de <i>Juncus</i> sélectionnées contre le HCoV-229E	77
1.2. Activité antivirale des sous-extraits des tiges de <i>J. acutus</i> contre le HCoV-229E	78
1.3. Analyse des différents sous-extraits des tiges <i>J. acutus</i> par UHPLC-UV-MS	79
1.4. Fractionnement bioguidé pour l'identification du(es) composé(s) responsable(s) de l'activité antivirale des sous-extraits AcOEt et Aq des tiges de <i>Juncus acutus</i> (localité 2) contre le HCoV-229E	81
1.4.1. Activité antivirale des différentes fractions pré-purifiées obtenues par HPLC semi-préparative à partir du sous-extrait AcOEt des tiges de <i>Juncus acutus</i> (localité 2)	81
1.4.2. Activité antivirale des fractions obtenues par la chromatographie de partage centrifuge (CPC) à partir du sous-extrait Aq des tiges de <i>Juncus acutus</i> (localité 2) ...	84
1.5. Activité antivirale de la lutéoline contre le HCoV-229E et sa toxicité sur les cellules Huh-7	86
1.6. Mécanisme d'action de la lutéoline contre le HCoV-229E	87
1.7. Activité antivirale de la lutéoline contre les coronavirus SARS-CoV-2 et MERS-CoV	88
1.8. Discussion et conclusions sur la partie étude de l'activité antivirale	89
2. Étude de l'activité antibactérienne des rhizomes de <i>J. inflexus</i> (JI3) contre les bactéries à Gram positif et en particulier contre l'isolat clinique résistant à la méticilline <i>Staphylococcus aureus</i> T28.1	91
2.1. Activité antibactérienne du sous-extrait CH ₂ Cl ₂ des rhizomes de <i>J. inflexus</i> (JI3) ...	94

2.2. Fractionnement et composition phytochimique du sous-extrait CH ₂ Cl ₂ des rhizomes de <i>J. inflexus</i> (JI3)	96
2.2.1. Fractionnement du sous-extrait DCM des rhizomes de <i>Juncus inflexus</i> par CPC	97
2.2.2. Activité antibactérienne des fractions pré-purifiées obtenues par CPC à partir du sous-extrait CH ₂ Cl ₂ des rhizomes de <i>J. inflexus</i> localité 3 (JI3)	100
2.2.3. Purification des composés phénanthréniques d'intérêt à partir de la fraction F'4 par HPLC préparative	104
2.2.4. Purification d'autres composés phénanthréniques à partir de la fraction F'2 obtenue par CPC à partir du sous-extrait CH ₂ Cl ₂ des rhizomes de <i>J. inflexus</i> localité 3 (JI3)	108
2.2.4.1. Optimisation de la méthode de séparation par HPLC-UV analytique des composés issus de la fraction F'2	108
2.2.4.2. Purification des composés issus de la fraction F'2 par HPLC préparative	109
2.2.5. Activité antibactérienne des composés phénanthréniques majoritaires isolés à partir de la fraction active F'4	113
2.2.5.1. Détermination des CMI et des CMBs	113
2.2.5.2. Étude des effets bactéricide et bactériostatique du juncusol et de la juncuénine B par la réalisation des courbes de croissance (<i>Kill-time assay</i>)	115
2.2.5.3. Quantification de l'effet post-antibiotique (EPA) du juncusol et de la juncuénine B sur l'isolat clinique <i>Staphylococcus aureus</i> T28.1	120
2.2.5.4. Évaluation des synergies d'association du juncusol, du 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol et de la juncuénine B sur l'isolat clinique <i>Staphylococcus aureus</i> T28.1 par la méthode de l'échiquier (<i>checkerboard method</i>)	123
2.2.5.5. Évaluation de l'activité anti-biofilm du juncusol, du 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol et de la juncuénine B sur l'isolat clinique <i>Staphylococcus aureus</i> T28.1	127
3. Mise en place d'une formulation topique : hydrogel de chitosane (CHT)/cyclodextrine (CD) chargé de juncusol	133
3.1. Étude de complexation Juncusol/β-CD : Test de solubilité	133
3.2. Hydrogels de CHT/Poly-CTR-HP-β-CD/Juncusol : formation et caractérisation macroscopique	134
3.2.1. Formation des hydrogels de CHT/Poly-CTR-HP-β-CD/Juncusol	134
3.2.2. Caractérisation macroscopique des hydrogels	135
3.2.2.1. Test du flacon retourné	135
3.2.2.2. Intégrité structurelle des hydrogels dans du PBS	136
3.3. Étude de cinétique de libération du juncusol	137
3.3.1. En condition statique par prélèvement ponctuel manuel	138

3.3.2. En condition dynamique par la méthode de dissolution en flux continu	140
3.4. Évaluation de l'activité antibactérienne de l'hydrogel de CHT/Poly-CTR-HP-β-CD/Juncusol.....	142
3.5. Conclusions et perspectives	144
4. Étude préliminaire de la biodisponibilité des composés phénanthréniques issus des espèces de <i>Juncus</i>	146
4.1. Étude de la digestion gastro-intestinale statique <i>in vitro</i> de l'extrait brut méthanolique des rhizomes de <i>J. inflexus</i> localité 3 (JI3 EBMR).....	146
4.2. Évaluation de la cytotoxicité des composés phénanthréniques : test de cytotoxicité CCK-8.....	147
4.3. Passage de barrière intestinale <i>in vitro</i> à travers le modèle cellulaire Caco2/HT29-MTX.....	151
Chapitre 3 : Matériels & Méthodes	162
1. Matériel végétal.....	162
2. Étude phytochimique des espèces de <i>Juncus</i> étudiées	163
2.1. Préparation des extraits et des sous-extraits de <i>Juncus</i>	163
2.2. Analyse par UHPLC-UV-MS des extraits, sous-extraits, fractions et composés purifiés à partir des espèces de <i>Juncus</i> étudiées.....	165
2.3. Quantification du juncusol par UHPLC-UV.....	166
2.4. Fractionnement de <i>J. acutus</i> et de <i>Juncus inflexus</i> par différentes techniques chromatographiques préparatives	168
2.4.1 Fractionnement des sous-extraits actifs des tiges de <i>Juncus acutus</i>	168
2.4.1.1. Fractionnement du sous-extrait AcOEt des tiges de <i>J. acutus</i> par HPLC semi-préparative.....	168
2.4.1.2. Fractionnement du sous-extrait aqueux (Aq) des tiges de <i>Juncus acutus</i> par chromatographie de partage centrifuge (CPC).....	169
2.4.2. Fractionnement du sous-extrait CH ₂ Cl ₂ des rhizomes de <i>Juncus inflexus</i> et purification des composés phénanthréniques d'intérêt	170
2.4.2.1. Fractionnement du sous-extrait CH ₂ Cl ₂ des rhizomes de <i>Juncus inflexus</i> par CPC	170
2.4.2.2. Purification par HPLC préparative des composés phénanthréniques à partir de la fraction la plus active F'4 (obtenue par CPC à partir du sous-extrait CH ₂ Cl ₂ des rhizomes de <i>J. inflexus</i>).....	171
2.4.2.3. Purification par HPLC préparative d'autres composés phénanthréniques à partir de la fraction F'2 (obtenue par CPC à partir du sous-extrait CH ₂ Cl ₂ des rhizomes de <i>J. inflexus</i>).....	172
2.4.2.3.1. Optimisation de la méthode de séparation des composés phénanthréniques par HPLC analytique	172

2.4.2.3.2. Purification des composés issus de la fraction F'2 par HPLC préparative	173
2.5. Éluclation structurale des dérivés phénanthréniques isolés à partir des rhizomes de <i>J. inflexus</i>	174
Composé 1 = en cours d'identification.....	176
Composé 2 = 5-éthényl-1,7-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2-ol	179
Composé 3 = Juncuénine A (= 6-éthényl-1,7-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2-ol)	183
Composé 4 = dehydrojuncuénine A (= 6-éthényl-1,7-diméthylphénanthrène-2-ol).....	187
Composé 6 = Effusol (= 5-éthényl-1-méthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol).....	190
Composé 8 = Juncusol (= 5-éthényl-1,6-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol)	194
Composé 9 = 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol	197
Composé 11 = Juncuénine B (= 8-éthényl-1,7-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,6-diol)	200
Composé 12 = dehydrojuncuénine B (= 8-éthényl-1,7-diméthylphénanthrène-2,6-diol)	203
3. Méthodologie employée pour étudier l'activité antivirale contre le coronavirus HCoV-229E et les betacoronavirus	206
3.1. Cellules et conditions de cultures	206
3.2. Virus.....	206
3.3. Essai de toxicité cellulaire	206
3.4. Évaluation de l'activité antivirale contre le HCoV-229E	207
3.5. Test d'infection par le SARS-CoV-2	207
3.6. Test d'infection par le MERS-CoV	208
4. Méthodologie employée pour étudier l'activité antibactérienne	209
4.1. Souches bactériennes et levures	209
4.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)	212
4.2.1. Détermination des CMI des extraits bruts méthanoliques et des sous-extraits de <i>J. acutus</i> et <i>J. inflexus</i> par la méthode de dilution en milieu solide sur agar (méthode de Steers).....	212
4.2.2 Détermination des CMI du sous-extrait CH ₂ Cl ₂ , des fractions prépurifiées et des composés phénanthréniques isolés à partir des rhizomes de <i>J. inflexus</i> , par la méthode de microdilution en milieu liquide	213
4.3. Détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB).....	214
4.4. Kill-time assay ou courbes de croissance	214
4.5 Évaluation de synergies d'association des composés phénanthréniques purifiés par la méthode de l'échiquier (<i>checkerboard method</i>)	215
4.6. Détermination de l'effet post-antibiotique (EPA).....	217
4.7. Évaluation de l'activité anti-biofilm des composés phénanthréniques.....	218

4.7.1. En microplaques de polystyrène 96 puits (surface inerte)	219
4.7.1.1. Inhibition de la formation du biofilm	219
4.7.1.2. Destruction du biofilm.....	220
4.7.2. En inoculateur de biofilms recouvert d'hydroxyapatite	221
4.7.2.1. Inhibition de la formation du biofilm	221
4.7.2.2. Destruction de biofilm	221
4.7.3. Analyse statistique des données de l'activité anti-biofilm.....	222
5. Formulation topique : hydrogel de chitosane/cyclodextrine/juncusol.....	223
5.1. Matériels	223
5.2. Test de solubilité	223
5.3. Préparation des poudres de chitosane (CHT) et de Poly-CTR-HP- β -cyclodextrine (Poly-CTR-HP- β -CD).....	224
5.4. Préparation des hydrogels de CHT/Poly-CTR-HP- β -CD/Juncusol.....	225
5.5. Granulation par voie humide des poudres de Poly-CTR-HP- β -CD et de juncusol	225
5.6. Caractérisation des hydrogels	226
5.6.1 Caractérisation par le test du flacon retourné	226
5.6.2. Caractérisation de l'intégrité structurale	226
5.7. Cinétique de libération du juncusol	226
5.7.1. En condition statique	226
5.7.2. En condition dynamique.....	227
5.8. Évaluation de l'activité antibactérienne de l'hydrogel CHT/Poly-CTR-HP- β -CD/Juncusol sur l'isolat clinique <i>S. aureus</i> T28.1 par la méthode du <i>kill-time assay</i>	228
6. Biodisponibilité des composés phénanthréniques issus des espèces de <i>Juncus</i>	229
6.1. Digestion gastro-intestinale statique <i>in vitro</i> de l'extrait brut méthanolique des rhizomes de <i>J. inflexus</i> (JI3)	229
6.2. Evaluation de la cytotoxicité des composés phénanthréniques purifiés sur le modèle cellulaire Caco2/HT29-MTX : kit CCK-8.....	231
6.3. Passage de barrière intestinale <i>in vitro</i> du juncusol sur le modèle de coculture cellulaire CaCo2/HT29-MTX.....	233
Conclusions générales & Perspectives.....	238
Références bibliographiques	244
ANNEXES.....	282
Résumé	289

Liste des figures

Figure 1. Le coronavirus SARS-CoV-2 (A) vu au microscope électronique. (B) Représentation schématique (niaid.nih.gov ; Hammond, 2020)	8
Figure 2. Voies d'entrée du SARS-CoV-2 dans la cellule hôte (Jackson et al., 2022)	11
Figure 3. Image au microscope électronique du coronavirus humain 229E (HCoV-229E) (cdc.gov).....	15
Figure 4. Chronologie visualisant les décennies d'apparition de nouvelles classes d'antibiotiques mises sur le marché. Les antibiotiques sont colorés selon leur origine : actinomycètes (vert), autres bactéries (bleu), champignons (violet) et synthèse (orangé et orangé marqué par un astérisque pour les antibiotiques dont la synthèse est inspirée de produits naturels). MRSA : <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline, VRE : Entérocoques résistants à la vancomycine et VRSA : <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la vancomycine (Hutchings et al., 2019).	18
Figure 5. Aperçu global à l'échelle moléculaire des différents mécanismes d'acquisition de résistance des bactéries aux antibiotiques (Darby et al., 2023).....	21
Figure 6. (A) Données brutes et (B) estimations modélisées du pourcentage d'isolats cliniques de <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline (SARM) par pays et par territoire (2019) (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022)	25
Figure 7. Aperçu schématique de la régulation du gène <i>mecA</i> chez les SARM : induction de <i>mecA</i> par <i>mecR1-mecI-mecR2</i> (Arède et al., 2012)	27
Figure 8. <i>Juncus acutus</i> L. (A) dans son habitat, (B) tige piquante avec inflorescences (Sysbio_base de données de systématique_univ-lille1)	37
Figure 9. <i>Juncus inflexus</i> L. (A) dans son habitat, (B) moelle interrompue et tige striée, (C) gaine basale foncée, (D) inflorescences, (E) capsules et tépales (Bodmin et al., 2015 ; www.orchid-nord.com)	39
Figure 10. <i>Juncus maritimus</i> Lam. (A) dans son habitat, (B) inflorescences, (C) rhizomes avec tiges parallèles, (D) tiges pleines dressées et raides (www.orchid-nord.com).....	40
Figure 11. Structure commune des monophénanthrènes : (A) dehydrophénanthrène, (B) phénanthrène et (C) 9,10-phénanthrènequinone (Bús et al., 2018b)	44
Figure 12. Structure de base des phénanthrènes dimériques connectés par une liaison en C-1-C-1' (Čáková, 2013)	47
Figure 13. Structures chimiques des flavonoïdes majoritaires décrits dans les espèces de <i>Juncus</i> (A) apigénine, (B) lutéoline et (C) quercétine (Wikimedia Commons).....	53
Figure 14. Synthèse du chitosane (CHT) à partir de la chitine	69
Figure 15. Illustration montrant le processus de formation d'un complexe d'inclusion de principe actif-cyclodextrine (Sharma and Baldi, 2016)	70
Figure 16. Différentes structures de polymères de cyclodextrines (PCDs) (Liu et al., 2021)	72
Figure 17. Réaction de polymérisation par polyestérification entre l'acide citrique (CTR) et les cyclodextrines (CDs) aboutissant à la formation d'un polymère de cyclodextrine PCD anionique (Palomino-Durand, 2019).....	73
Figure 18. Activité antivirale contre le HCoV-229E-Luc des différents extraits méthanoliques bruts des 3 espèces de <i>Juncus</i> . Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM (= erreur-type de la moyenne) de 3 expériences réalisées en triplicata et par rapport au témoin sans extrait (= DMSO) pour lequel une valeur de 100 a été attribuée (Hakem et al., 2023).	78

- Figure 19.** Activité antivirale contre le HCoV-229E-Luc de l'extrait brut méthanolique et des sous-extraits obtenus à partir des tiges de *Juncus acutus* (localité 2). Expériences réalisées sur des cellules Huh-7 exprimant à leur surface la TMPRSS2. Les différents extraits et sous-extraits ont été testés à $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM d'une ou de 2 expériences réalisées en triplicata. Ils sont exprimés par rapport au témoin DMSO (Hakem et al., 2023)..... 79
- Figure 20.** Chromatogrammes obtenus par UHPLC-UV-MS à $\lambda = 254 \text{ nm}$ des différents extraits et sous-extraits des tiges de *Juncus acutus* (localité 2) : (A) extrait brut méthanolique ; (B) sous-extrait CH_2Cl_2 ; (C) sous-extrait AcOEt ; (D) sous-extrait Aq ; ainsi que les 2 témoins de référence (E) lutéoline et (F) lutéoline-7-O-glucoside..... 80
- Figure 21.** Activité antivirale contre le HCoV-229E-Luc des différentes fractions pré-purifiées (F1 $\rightarrow$ F12) obtenues par HPLC semi-préparative à partir du sous-extrait AcOEt des tiges de *Juncus acutus* (localité 2). Expériences réalisées sur des cellules Huh-7 exprimant à leur surface la TMPRSS2. Les fractions ont été testées à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et à $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Les données sont présentées par rapport au témoin DMSO pour lequel une valeur de 100 a été attribuée. Elles sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata (Hakem et al., 2023)..... 82
- Figure 22.** Chromatogrammes obtenus par UHPLC-UV-MS à $\lambda = 254 \text{ nm}$ du (A) sous-extrait AcOEt des tiges de *Juncus acutus* (localité 2) (JA2), des différentes fractions pré-purifiées (F1 $\rightarrow$ F12) de ce sous-extrait et des témoins de référence : lutéoline-7-O-glucoside, lutéoline et juncusol (à $\lambda = 280 \text{ nm}$)..... 83
- Figure 23.** Activité antivirale contre le HCoV-229E-Luc des différentes fractions pré-purifiées (F1 $\rightarrow$ F12) obtenues à partir du sous-extrait Aq de tiges de *Juncus acutus* (localité 2) (JA2) par CPC. Expériences réalisées sur des cellules Huh-7 exprimant à leur surface la TMPRSS2. Les fractions ont été testées à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Les données sont présentées par rapport au témoin DMSO pour lequel une valeur de 100 a été attribuée. Elles sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata (Hakem et al., 2023)..... 85
- Figure 24.** Chromatogrammes obtenus par UHPLC-UV-MS à $\lambda = 254 \text{ nm}$ des fractions pré-purifiées les plus actives obtenues par CPC à partir du sous-extrait Aq de tiges de *Juncus acutus* (localité 2) (JA2), (A) fraction F3, (B) fraction F4, (C) fraction F5, (D) fraction F6 et (E) fraction F7, ainsi que les témoins de référence : (F) lutéoline-7-O-glucoside et (G) lutéoline..... 86
- Figure 25.** (A) Cytotoxicité de la lutéoline sur les cellules Huh-7 (B) Activité antivirale de la lutéoline contre le HCoV-229E-Luc dans les cellules Huh-7 exprimant (courbe en rose) ou pas (courbe en bleu) à leur surface la TMPRSS2. Les résultats sont exprimés par rapport au témoin pour lequel une valeur de 100 % (viabilité ou infection) a été attribuée. Ils sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata (Hakem et al., 2023) 87
- Figure 26.** Mécanisme d'action de la lutéoline contre le coronavirus HCoV229E (A) Représentation schématique de l'expérience de *time of addition assay* (B) Expériences de *time of addition assay*, dans des cellules Huh-7 exprimant la TMPRSS2 et inoculées avec le HCoV-229E-Luc, de la lutéoline à $10 \mu\text{M}$ et des différents témoins : camostat à $50 \mu\text{M}$, GC376 à $50 \mu\text{M}$ et remdesivir à 200 nM . Les résultats sont exprimés par rapport au témoin pour lequel une valeur de 100 % (viabilité ou infection) a été attribuée. Ils sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata (Hakem et al., 2023)..... 88
- Figure 27.** Évaluation de l'activité antivirale de la lutéoline contre les coronavirus SARS-CoV-2 et MERS-CoV. Les résultats sont présentés en pourcentage d'infection par rapport au témoin

DMSO. Ils sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM de 2 expériences indépendantes réalisées en triplicata (Hakem et al., 2023).....	89
Figure 28. Chromatogrammes obtenus par UHPLC-UV-MS à $\lambda = 280$ nm du (A) sous-extrait CH_2Cl_2 de <i>J. inflexus</i> localité 3 (JI3) et des témoins de référence (B) juncusol, (C) effusol...	97
Figure 29. Profil chromatographique de la purification du sous-extrait CH_2Cl_2 des rhizomes de <i>J. inflexus</i> (JI3) par CPC avec le système Arizona P à $\lambda = 280$ nm	98
Figure 30. Chromatogrammes obtenus par UHPLC-UV-MS à 280 nm des différentes fractions obtenues par CPC à partir du sous-extrait CH_2Cl_2 des rhizomes de <i>J. inflexus</i> localité 3 (JI3). (A) F'1, (B) F'2, (C) F'3, (D) F'4, (E) F'5, (F) F'6, (G) F'7 et (H) F'8.....	99
Figure 31. Profil chromatographique à $\lambda = 280$ nm de la fraction F'4 à partir de laquelle les différents composés phénanthréniques ont été purifiés par HPLC préparative. Le trait noir visualise le gradient employé.	104
Figure 32. Chromatogramme obtenu par HPLC-UV analytique à $\lambda = 280$ nm de la fraction F'2. Le trait noir visualise le gradient d'élution utilisé : 40% ACN à $t = 0$ min ; 60% ACN à $t = 60$ min et 100% ACN à $t = 65$ min jusqu'à $t = 75$ min.	109
Figure 33. Profil chromatographique à $\lambda = 280$ nm obtenu par HPLC préparative de la fraction F'2. Le trait noir visualise le gradient d'élution employé.	110
Figure 34. Courbes de croissance de l'isolat clinique <i>Enterococcus faecium</i> 09001 en présence du (A) juncusol et de la (B) juncuénine B. Le seuil de détection a été fixé à $1 \log_{10}$ (UFC.mL ⁻¹). Elles sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM de 3 expériences indépendantes. Le témoin utilisé est le méthanol.....	117
Figure 35. Courbes de croissance de l'isolat clinique <i>Staphylococcus aureus</i> T28-1. en présence du (A) juncusol et de la (B) juncuénine B. Le seuil de détection a été fixé à $1 \log_{10}$ (UFC.mL ⁻¹). Elles sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM de 3 expériences indépendantes. Le témoin utilisé est le méthanol.	119
Figure 36. Courbe de croissance de l'isolat clinique <i>Staphylococcus aureus</i> T28.1 après inactivation du juncusol. Le temps T _{-2 h} montre le pré-traitement avec le juncusol à différentes concentrations. Le temps T _{0 h} correspond à l'inactivation du juncusol. Les temps de latence (= effet post-antibiotique (EPA)) sont déterminés durant les premières heures de culture suivant la formule : $EPA = T - C$	122
Figure 37. Effet (A) inhibiteur et (B) destructeur des composés phénanthréniques envers le biofilm de l'isolat clinique de <i>Staphylococcus aureus</i> T28.1 sur une surface inerte. Ces données sont le résultat de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata. Ces données sont le résultat de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata. Les valeurs avec différentes lettres (a, b, c ou d) indiquent une différence significative entre les traitements selon le test ANOVA suivi de Duncan's multiple-range test ($p \leq 0.05$).	131
Figure 38. Chromatogrammes obtenus par UHPLC-UV à $\lambda = 280$ nm (mise à l'échelle Y = 0,3) du juncusol solubilisé dans (A) l'H ₂ O ultrapure ; (B) la β -CD ; (C) le Poly- β -CD ; (D) l'HP- β -CD et (E) le Poly-CTR-HP- β -CD.....	134
Figure 39. Représentation schématique des différentes étapes aboutissant à la formation des hydrogels de CHT/Poly-CTR-HP- β -CD (figure de l'article de Palomino-Durand et al., (2019) adaptée)	135
Figure 40. Observations de la formation et de la stabilité des hydrogels de CHT/Poly-CTR-HP- β -CD/Juncusol à différents ratios (3:0:0 ; 3:0:1 ; 3:3:0 ; 3:2:0 et 3:2:1) à T _{0 h} et T _{24 h} par le test du flacon retourné. La photo de la formulation (3:2:0) est absente pour T _{24 h} en raison d'un	

problème technique, mais l'aspect de l'hydrogel est le même que celui obtenu pour les formulations (3: 3:0) et (3:2:1).....	136
Figure 41. Évaluation qualitative de l'intégrité et de la stabilité structurale des cordons des hydrogels de CHT/Poly-CTR-HP- β -CD/Juncusol à différents ratios (3:0:0 ; 3:0:1 ; 3:3:0 ; 3:2:0 et 3:2:1) directement après injection (à T_0 h) dans du PBS (pH = 7,4) et après 24 h d'incubation à 37 °C	137
Figure 42. Cinétique de libération du juncusol à partir des hydrogels de CHT/Poly-CTR-HP- β -CD/Juncusol en condition statique (V_{PBS} = 30 mL, 80 rpm et 37 °C) avec (courbe bleue, n = 2) ou sans granulation humide (courbe orangée, n = 1)	139
Figure 43. Représentation schématique de la préparation de poudre de Poly-CTR-HP- β -CD/juncusol en effectuant une granulation par voie humide	140
Figure 44. Cinétique de libération du juncusol à partir des hydrogels de CHT/Poly-CTR-HP- β -CD/Juncusol en condition dynamique (SOTAX® UPSIV : V_{PBS} = 500 mL, 37 °C, flux = 5 mL.min ⁻¹ et 37 °C). Sur cette figure, un seul réplicat a été présenté pour l'hydrogel témoin (= courbe verte) et un duplicata a été présenté pour la formulation (3:2:1 ; courbe bleue).....	142
Figure 45. Courbe de croissance (n = 1) de l'isolat clinique <i>S. aureus</i> T28.1 en présence de l'hydrogel de CHT/Poly-CTR-HP- β -CD/Juncusol ou de l'hydrogel témoin sans juncusol ..	144
Figure 46. Chromatogrammes des échantillons de l'extrait brut méthanolique des rhizomes de <i>J. inflexus</i> localité 3 obtenus à λ = 214 nm par UHPLC-UV-MS (A) avant digestion gastro-intestinale statique <i>in vitro</i> ; et après digestion : (B) partie « digérée », (C) partie « non digérée » et (D) digestion blanche. L'encadré bleu en trait plein montre la présence des dérivés phénanthréniques du <i>Juncus</i> . L'encadré rouge en pointillé visualise probablement les peptides dérivant de l'autolyse des enzymes protéolytiques.	147
Figure 47. Histogrammes montrant les pourcentages de viabilité cellulaire de la monocouche Caco2/HT29-MTX (calculés par rapport au témoin DMSO) obtenu par le test CCK-8 après (A) 2 h et (B) 24 h de contact avec les différents composés phénanthréniques. Ces données sont le résultat d'un triplicata d'une seule expérience.	149
Figure 48. Détermination de la cytotoxicité du 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol sur la monocouche de coculture cellulaire CaCo2/HT29-MTX après 24 h de contact. Les données sont exprimées en moyenne de pourcentage de viabilité cellulaire $\pm$ SEM par rapport au témoin négatif contenant du milieu DMEM pour lequel une valeur de 100 a été attribuée. L'expérience a été réalisée en triplicata. La CC ₅₀ a été obtenue grâce au logiciel GraphPad Prism version 10.0.2.	151
Figure 49. Gamme étalon du <i>Lucifer Yellow</i> (LY).....	153
Figure 50. Chromatogrammes obtenus par UHPLC-UV à λ = 280 nm des différents échantillons récupérés à partir des compartiments apicaux : témoin DMSO (A) traitement T _{15 min} , (B) traitement T _{2 h} ; et juncusol (C) traitement T _{15 min} , (D) traitement T _{30 min} , (E) traitement T _{1 h} , (F) traitement T _{2 h}	154
Figure 51. Chromatogrammes obtenus par UHPLC-UV à λ = 280 nm (mise à l'échelle Y = 0,015) des différents échantillons récupérés à partir des compartiments basolatéraux : témoin DMSO (A) traitement T _{15 min} , (B) traitement T _{2 h} ; et juncusol (C) traitement T _{15 min} , (D) traitement T _{30 min} , (E) traitement T _{1 h} , (F) traitement T _{2 h}	155
Figure 52. Cinétique de passage de barrière intestinale <i>in vitro</i> du juncusol sur le modèle de monocouche de coculture cellulaire Caco2/HT29-MTX (A) dans le compartiment apical (B) dans le compartiment basolatéral. Les données à 37 °C sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM de	

5 expériences réalisées en duplicata. Les données à 4 °C sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM de 2 expériences réalisées en duplicata.	156
Figure 53. Données obtenues en HRMS et profil de fragmentation MS/MS en mode négatif obtenus par LC-HRMS (ESI-Q-TOF) des composés à (A) $t_r = 4,556$ min et (B) $t_r = 4,788$ min, identifiés dans les échantillons des compartiments apicaux et basolatéraux après passage de barrière intestinale (Caco2/HT29-MTX) <i>in vitro</i> du juncusol	159
Figure 54. Carte de localisation des différents échantillons de Juncus collectés	162
Figure 55. Photos des plantes collectées (A) <i>Juncus maritimus</i> Lam. (Bretagne, localité 1), (B) <i>Juncus acutus</i> L. (Bretagne, localité 2), (C) <i>Juncus inflexus</i> L. (Nouvelle-Aquitaine, Localité 3) (Photos prises par le Dr Gabriel Lefèvre et le Pr Céline Rivière durant Juillet 2018).....	163
Figure 56. Workflow des étapes à suivre pour établir la quantification du juncusol sur le logiciel Empower® 3 version 3.....	167
Figure 57. Courbe de calibration du juncusol crée en utilisant le logiciel Empower® 3 version 3.....	167
Figure 58. Schéma de la microplaque de test de synergies d'association avec la méthode de l'échiquier (<i>checkerboard method</i>), encadré noir : colonnes dédiées aux différents témoins, encadré bleu : colonnes dédiées à la détermination de la CMI du composé A, flèche bleue : concentrations décroissantes du composés A, encadré orangé : colonnes dédiées à la détermination de la CMI du composé B, flèche orangée : concentrations croissantes du composé B	217
Figure 59. Schéma de la microplaque pour l'évaluation de l'activité anti-biofilm des composés phénanthréniques isolés à partir des rhizomes de <i>J. inflexus</i>	220
Figure 60. (A) Appareil de dissolution en flux continu SOTAX® CE7 Smart-USP IV (SOTAX®, Aesch, Suisse) disponible au laboratoire de l'équipe INSERM U1008 "Advanced Drug Delivery Systems", Université de Lille (B) Plan d'expérience de mise des hydrogels dans les cellules de libération	228
Figure 61. Montage utilisé pour la réalisation de la digestion gastro-intestinale <i>in vitro</i> de l'extrait brut méthanolique des rhizomes de <i>J. inflexus</i> localité 3 (Boutahiri, 2022).....	229
Figure 62. Représentation schématique des différentes étapes réalisées lors des expériences de passage de barrière intestinale <i>in vitro</i> du juncusol sur le modèle de coculture cellulaire CaCo2/HT29-MTX	233
Figure 63. Plan de la microplaque 96 puits pour le calcul des coefficients de perméabilité apparente (P_{app}).....	235

Liste des tableaux

Tableau 1. Liste des antibiotiques actifs sur les souches de <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline (SARM) (Turner et al., 2019).....	29
Tableau 2. Composés phénanthréniques couramment retrouvés dans les espèces du genre <i>Juncus</i>	45
Tableau 3. Exemples de diphénanthrènes isolés à partir des espèces du genre <i>Juncus</i>	48
Tableau 4. Diphénanthrènes de structure complexe isolés à partir des espèces du genre <i>Juncus</i>	50
Tableau 5. Activité antibactérienne contre des bactéries à Gram positif de quelques composés phénanthréniques.....	58
Tableau 6. Cytotoxicité de quelques composés phénanthréniques sur différentes lignées cellulaires	64
Tableau 7. Propriétés physico-chimiques des cyclodextrines (Bezerra et al., 2020).....	69
Tableau 8. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$) déterminées pour les extraits bruts méthanoliques et les sous-extraits des rhizomes de <i>Juncus inflexus</i> localité 3 (JI3) et les tiges de <i>Juncus acutus</i> localité 2 (JA2) contre les différentes souches bactériennes et fongiques sélectionnées en utilisant la méthode de dilution en milieu solide sur agar. Les différents extraits et sous-extraits ont été testés à une gamme de concentrations finales allant de 1250 à $39,06 \mu\text{g.mL}^{-1}$ obtenue par des dilutions successives au demi.	92
Tableau 9. Concentrations minimales inhibitrices (CMI), concentrations minimales bactéricides (CMB) et rapports CMB/CMI déterminés pour le sous-extrait CH_2Cl_2 des rhizomes de <i>Juncus inflexus</i> L. (JI3) contre les isolats cliniques à Gram positif sélectionnés. Ces données sont le résultat de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata.	95
Tableau 10. Valeurs de CMI et de CMB déterminées pour les fractions pré-purifiées obtenues par CPC à partir du sous-extrait CH_2Cl_2 des rhizomes de <i>Juncus inflexus</i> L. localité 3 (JI3) contre les souches bactériennes à Gram positif sélectionnées. Les différentes fractions ont été testées à une gamme de concentrations finales comprise entre 1250 et $0,61 \mu\text{g.mL}^{-1}$ obtenue par des dilutions successives au demi.	101
Tableau 11. Données spectrales et structures des composés phénanthréniques majoritaires obtenus par HPLC préparative à partir de la fraction active F'4	106
Tableau 12. Données spectrales des composés phénanthréniques minoritaires obtenus par HPLC préparative à partir de la fraction actives F'4.....	106
Tableau 13. Données spectrales et structures des composés phénanthréniques obtenus par HPLC préparative à partir de la fraction F'2.....	111
Tableau 14. Valeurs des CMI, CMB et des rapports CMB/CMI déterminées pour les dérivés phénanthréniques majoritaires isolés par HPLC préparative à partir de la fraction F'4 (obtenue par CPC à partir du sous-extrait CH_2Cl_2 des rhizomes de <i>J. inflexus</i> localité 3 (JI3)) contre les souches bactériennes à Gram positif sélectionnées. Ces données sont le résultat de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata.	114
Tableau 15. Temps de latence maximums observés (ou effet post-antibiotique) sur une population de <i>S. aureus</i> T 28.1 après 2 h de traitement avec le juncusol ou avec la juncuénine B (testés à différentes concentrations). Seules les valeurs maximales de l'EPA des 3 expériences indépendantes réalisées sont présentées.	123

Tableau 16. Antibiotiques sélectionnés pour le test de synergies d'association par la méthode de l'échiquier sur l'isolat clinique <i>Staphylococcus aureus</i> T28.1.....	124
Tableau 17. Valeurs de FIC et type d'interactions déterminés pour les associations dérivé phénanthrénique – dérivé phénanthrénique et dérivé phénanthrénique – antibiotique. Les valeurs de l'indice FIC sont présentées sous forme d'intervalles des valeurs optimales obtenues pour les 3 expériences indépendantes réalisées.....	125
Tableau 19. Rendements des extractions solide/liquide (S/L) réalisées pour les différentes espèces de <i>Juncus</i> (%).....	164
Tableau 20. Rendements des extractions liquide/liquide (L/L) réalisées sur les extraits bruts méthanoliques de tiges de <i>J. acutus</i> localité 2 et rhizomes de <i>J. inflexus</i> localité 3 (%)	165
Tableau 21. Récapitulatif des quantités (mg) et des rendements (%) des différentes fractions obtenues par CPC à partir du sous-extrait CH ₂ Cl ₂ des rhizomes de <i>J. inflexus</i> localité 3 (JI3)	171
Tableau 22. Récapitulatif des quantités (mg) et des rendements (%) des différents composés obtenus par HPLC préparative à partir de la fraction active F'4 obtenue par CPC à partir du sous-extrait CH ₂ Cl ₂ des rhizomes de <i>J. inflexus</i> localité 3 (JI3)	172
Tableau 23. Récapitulatif des quantités (mg) et des rendements (%) des différents composés obtenus par HPLC préparative à partir de la fraction F'2 obtenue par CPC à partir du sous-extrait CH ₂ Cl ₂ des rhizomes de <i>J. inflexus</i> localité 3 (JI3)	174
Tableau 24. Liste des souches employées durant l'étude	209
Tableau 25. Concentration (% p/p) de CHT, Poly-CTR-HP-β-CD, H ₂ O et d'acide lactique pour la préparation des différentes formulations de l'hydrogel CHT/Poly-CTR-HP-β-CD/Juncusol	225
Tableau 26. Composition des différents fluides de la digestion gastro-intestinale statique <i>in vitro</i>	231

Liste des abréviations

AcOEt	Acétate d'éthyle
ACE2 (<i>Angiotensin-Converting Enzyme 2</i>)	Enzyme de conversion de l'angiotensine 2
ACN	Acétonitrile
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ala	Alanine
AMB	Amphotéricine B
AMX	Amoxicilline
ANOVA (<i>ANalysis Of Variance</i>)	Analyse de la variance
APN	Aminopeptidase N
Aq	Aqueux
ARN	Acides ribonucléiques
ARN_{db}	Acides ribonucléiques double brin
ARN_m	Acides ribonucléiques messenger
ARN_t	Acides ribonucléiques de transfert
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BI	<i>Bliss Independence theory</i>
Caco2	<i>Cancer coli</i> , "colon cancer"
CD	Cyclodextrine
CDC (<i>Centers for Disease Control et prevention</i>)	Centres pour le contrôle et la prévention des maladies
CCK-8	<i>Cell Counting Kit-8</i>
CC₅₀	Concentration cytotoxique médiane
CE₅₀	Concentration efficace médiane
CIP	Ciprofloxacine
CI₅₀	Concentration inhibitrice médiane
CH₂Cl₂	Dichlorométhane
CHT	Chitosane
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
COSY	<i>COrrrelation Spectroscopy</i>
CPC	Chromatographie partage centrifuge
CTR	Acide citrique
CycloH	Cyclohexane
CYP3A4	Cytochrome P450
DAAD (<i>Diode Array Detector</i>)	Détecteur à barrettes de diodes
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DD	Degré d'acétylation
DMAPP	Diméthylallyl-pyrophosphate
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DI	Diamètre d'inhibition
DO	Densité optique
EMA (<i>European Medicines Agency</i>)	Agence européenne du médicament
Énoyl-ACP	<i>Énoyl-Acyl-Carrier-Protein</i>

Liste des abréviations

EPA	Effet post-antibiotique
EPS (<i>Extracellular Polymeric Substance</i>)	Substances polymériques extracellulaires
ESI (<i>ElectroSpray Ionization</i>)	Ionisation par électronébuliseur
ERGIC (<i>Endoplasmic-Reticulum–Golgi Intermediate Compartment</i>)	Réticulum endoplasmique
EtOH	Éthanol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FAO (<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)	Organisation des Nations Unies pour l’agriculture et l’alimentation
FDA (<i>Food and Drug Administration</i>)	Agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux
FIC (<i>Fractional Inhibitory Concentration index</i>)	Indice de concentration d’inhibition fractionnaire
FLC	Fluconazole
GEN	Gentamicine
GGPP	Géranylgéranyl-pyrophosphate
GPP	Géranyl-pyrophosphate
GST	Glutathion S-transférases
HAS	Haute Autorité de Santé
HAT	<i>Human airway trypsin-like</i>
HBSS-Hepes	<i>HEPES-buffered Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCl	Acide chlorhydrique
HCoV-229E (<i>Human CoronaVirus 229E</i>)	Coronavirus humain 229E
HCoV-229E-Luc	Coronavirus humain 229E Luc ; un HCoV-229E recombinant avec le gène rapporteur de la luciférase
HDP-mimetics	<i>Host Defense Proteins-mimetics</i>
HERA (<i>Health Emergency preparedness and Response Authority</i>)	Autorité européenne de préparation et de réaction en cas d’urgence sanitaire
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation
HPLC (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)	Chromatographie en phase liquide à haute performance
HP-β-CD	Hydroxylpropyl β -cyclodextrine
HRMS (<i>High-Resolution Mass Spectroscopy</i>)	Spectrométrie de masse haute résolution
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
HSQC-DEPT	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation-Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
HSV-2	<i>Herpes Simplex Virus 2</i>
HT-29	Human colon cancer cell line
IHC (<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>)	Conseil international d'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain
INT	<i>p</i> -Iodonitrotétrazolium violet
IPP	Isopentényl-pyrophosphate
IS	Indice de sélectivité
JA	<i>Juncus acutus</i>

Liste des abréviations

JA1 CICE (= JA1 EBMIF)	Extrait brut méthanolique des inflorescences fermées de <i>J. acutus</i> (localité 1)
JA1 OICE (= JA1 EBMIO)	Extrait brut méthanolique des inflorescences ouvertes de <i>J. acutus</i> (localité 1)
JA2 RCE (= JA2 EBMR)	Extrait brut méthanolique de rhizomes de <i>J. acutus</i> (localité 2)
JA2 SCE (= JA2 EBMT)	Extrait brut méthanolique de tiges de <i>J. acutus</i> (localité 2)
IgG	Immunoglobuline G
JI3	<i>J. maritimus</i> (localité 3)
JI3 RCE (= JI EBMR)	Extrait brut méthanolique de rhizomes de <i>J. inflexus</i> (localité 3)
J.	<i>Juncus</i>
kb	kilobase
Kd (Distribution coefficient)	Coefficient de partage
KPC-2 (Klebsiella carbapenemase-2)	Carbapénèmase de classe A
K. pneumoniae	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LOD (Limit Of Detection)	Limite de détection
LOQ (Limit Of Quantification)	Limite de quantification
LY	<i>Lucifer yellow</i>
log₁₀	Logarithme décimal
L/L	Extraction liquide-liquide
MBEC assay (Minimum Biofilm Eradication Concentration)	Concentration minimale d'éradication de biofilm
MEM (Minimum Essential Medium Eagle)	Milieu minimum essentiel
MeOD	Méthanol deutéré
MeOH	Méthanol
MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome-Related CoronaVirus)	Coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient
MH	<i>Muller Hinton</i>
MHA	<i>Muller Hinton Agar</i>
MM	Masse molaire
MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i>
M^{pro}	<i>Main protease</i>
MRP 2	<i>Multidrug Resistance-associated Protein 2</i>
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide sous forme réduite
NIH (National Institutes of Health)	Instituts américains de la santé
OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
OMSA	Organisation Mondiale de la Santé Animale
ORF (Open Reading Frame)	Cadre ouvert de lecture
OXA	Oxacilline
PA	Principe actif
P_{app}	Coefficient de perméabilité apparente
PBP2a (Penicillin Binding Protein 2a)	Protéines 2a de liaison à la pénicilline
PBS (Phosphate-Buffered Saline)	Tampon phosphate salin

Liste des abréviations

PCDs	Polymères de cyclodextrines
PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	Réaction de polymérisation en chaîne
PDA (<i>Photo Diode Array</i>)	Détecteur à barrettes de diodes
PET	Polyester
PFA	Paraformaldéhyde
PHH	Hépatocytes Primaires Humains
Phe	Phénylalanine
PI	Post-inoculation
PIB	Produit intérieur brut
PK/PD (<i>PharmacoKinetic/PharmacoDynamic modeling</i>)	Pharmacocinétique/pharmacodynamique
PLCP	<i>Papain-Like Cysteine Peptidases</i>
PLP	<i>Papain-Like Proteases</i>
PLP	Protéines de liaison à la pénicilline
Poly-CTR-HP-β-CD (<i>Citric acid crosslinked hydroxypropyl-β-CD polymer</i>)	Polymère d'hydroxypropyl-β-cyclodextrine réticulé avec de l'acide citrique
Poly-HP-β-CD_i	Polymère d'hydroxypropyl-β-cyclodextrine insoluble
Poly-HP-β-CD_s	Polymère d'hydroxypropyl-β-cyclodextrine soluble
Poly-β-CD	Polymère de β-cyclodextrine
Protéine E	Protéine d'enveloppe
Protéine M	Protéine membranaire
Protéine N	Protéine de la nucléocapside
Protéine S (<i>Spike</i>)	Protéine spéculaire
PVDF (<i>polyvinylidene fluoride</i> ou <i>polyvinylidene difluoride</i>)	Polyfluorure de vinylidène
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
p/p	Poids par poids
RBD (<i>Receptor Binding Domain</i>)	Domaine de liaison au récepteur
RC	Ringer cystéiné
RdRp	ARN polymérase ARN-dépendante
RIF	Rifampicine
RMN	Résonance magnétique nucléaire
rpm (<i>rounds per minute</i>)	Rotation par minute
PES	Polyethersulfone
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
SARM (<i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>) (MRSA)	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
SASM (<i>Methicillin-Sensitive Staphylococcus aureus</i>) (MSSA)	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la méticilline
SARS-CoV (<i>Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus</i>)	Coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère
SARS-CoV-2 (<i>Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2</i>)	Coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère
SCCmec	<i>Staphylococcal chromosome cassette for methicillin resistance</i>
SDRA	Syndrome de détresse respiratoire aiguë
SEM (<i>Standard Error of the Mean</i>)	Erreur-type de la moyenne

Liste des abréviations

SER		Sertaconazole
SFF (<i>Simulated salivary Fluid</i>)		Fluide salivaire
SGF (<i>Simulated Gastric Fluid</i>)		Fluide gastrique
SIF (<i>Simulated Intestinal Fluid</i>)		Fluide intestinal
<i>S. aureus</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pneumoniae</i>		<i>Streptococcus pneumoniae</i>
sp. (<i>species</i>)		Espèce
spp. (<i>species plurimae</i>)		Plusieurs espèces
SRB		Sulforhodamine B
SULT		Sulfotransférases
SVF (= FBS : <i>Fetal Bovine Serum</i>)		Sérum de veau fœtal
S/L		Extraction solide-liquide
TEER (<i>TransEpithelial Resistance</i>)	<i>Electrical</i>	Résistance électrique transépithéliale
TEM-24		<i>Temoneira-24</i>
TJs (<i>Tight Junctions</i>)		Jonctions serrées
TMPRSS2 (<i>TransMembrane Serine 2</i>)	<i>Protease</i>	Protéase transmembranaire à sérine 2
Tr		Temps de rétention
TTSPs		Protéases transmembranaires à sérine de type II
Tyr		Tyrosine
UA		Unité arbitraire
UDP		Uridine diphosphate
UE		Union européenne
UFC		Unité formant colonie
UGT		UDP-glucuronosyltransférases
UHPLC-UV-MS (<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>)		Chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à un détecteur UV et à la spectrométrie de masse
UI		Unité internationale
USD (<i>United States Dollar</i>)		Dollar américain
UVA		UltraViolet A (400-315 nm)
U.mL⁻¹		Unité enzymatique par millilitre
VAN		Vancomycine
VHC		Virus de l'hépatite C
VIH (<i>Human Immunodeficiency Viruses-1</i>)		Virus de l'immunodéficience humaine
VIM		<i>Verona Integron-encoded Metallo-β-lactamases</i>
VRC		Voriconazole
VRE (<i>Vancomycin-Resistant Enterococcus/Enterococci</i>)		Entérocoques résistant à la vancomycine (ERV)
VRSA (<i>Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus</i>)		<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la vancomycine (VRSA)
WW		<i>Wilkins-West broth</i> , nommé désormais <i>Wilkins-Chalgren broth</i>
3CL^{pro} (protéase <i>3C-Like</i>)		Protéase « de type 3C »
% RVC		Pourcentage de réduction cellulaire

VALORISATION SCIENTIFIQUE

❖ Publications

Asma Hakem, Lowiese Desmarets, Ramla Sahli, Rawen Ben Malek, Charline Camuzet, Nathan François, Gabriel Lefèvre, Jennifer Samaillie, Sophie Moureu, Sevser Sahpaz, Sandrine Belouzard, Riadh Ksouri, Karin Séron et Céline Rivière. (2023) Luteolin Isolated from *Juncus acutus* L., a Potential Remedy for Human Coronavirus 229E. *Molecules*. 28(11). <https://doi.org/10.3390/molecules28114263> (publication en lien avec la thèse).

Justine Jacquin, Sophie Moureu, Caroline Deweer, Asma Hakem, Anne-Sophie Paguet, Natacha Bonneau, Simon Bordage, Charles Dermont, Sevser Sahpaz, Jérôme Muchembled et Céline Rivière. (2022) *In vitro* anti-oomycete activities of hop essential oil, extracts and some of their metabolites against *Phytophthora infestans*. *Agronomy*, 12, 2826. <https://doi.org/10.3390/agronomy12112826> (publication en lien avec le Master 2).

❖ Communications orales et affichées

Asma Hakem, Lowiese Desmarets, Ramla Sahli, Rawen Ben Malek, Nathan François, Gabriel Lefèvre, Jennifer Samaillie, Sophie Moureu, Jean Dubuisson, Sandrine Belouzard, Sevser Sahpaz, Riadh Ksouri, Karin Séron et Céline Rivière. *Juncus acutus*, a potential remedy for coronaviruses. 2nd Annual CNPD Conference 2021, Natural Products and COVID-19, Liverpool, Angleterre, 13-14 Mai 2021 (webinaire, présentation flash).

Asma Hakem, Christel Neut, Ramla Sahli, Jennifer Samillie, Sophie Moureu, Séverine Mahieux, Isabelle Houcke, Mathie Tenenbaum, Rawen en Malek, Pauline Bruniaux, Vincent Roumy, Gabriel Lefèvre, Sevser Sahpaz, Benoît Cudennec, Riadh Ksouri et Céline Rivière. *Juncus inflexus*, source de phénanthrènes à activité antibactérienne contre les bactéries à Gram positif. Journées virtuelles de l'AFERP 2021, France, 15-16 Juillet 2021 (webinaire, présentation flash et poster).

Asma Hakem, Anne-Sophie Paguet, et Justine Domont. Optimisation de la récolte à maturité des graines de bourrache pour l'entreprise EARL Saint Antoine. Challenge Doc 2021, Lille, France, 30 Juin – 2 Juillet 2021. **Obtention du prix de cohésion d'équipe.**

Asma Hakem, Christel Neut, Ramla Sahli, Jennifer Samillie, Sophie Moureu, Séverine Mahieux, Isabelle Houcke, Mathie Tenenbaum, Barbara Deracinois, Rawen en Malek, Pauline Bruniaux, Vincent Roumy, Gabriel Lefèvre, Sevser Sahpaz, Benoît Cudennec, Riadh Ksouri et Céline Rivière. *Juncus inflexus*, source de molécules au potentiel antibactérien. Demi-journée thématique du LIAAN 2021, Valorisation de co-produits alimentaires et de biomolécules à propriétés antimicrobiennes et santé, Lille, France, Québec, Canada, 28 Septembre 2021 (webinaire, présentation de 10 minutes).

Asma Hakem, Christel Neut, Ramla Sahli, Jennifer Samillie, Sophie Moureu, Séverine Mahieux, Isabelle Houcke, Mathie Tenenbaum, Rawen Ben Malek, Pauline Bruniaux, Vincent Roumy, Gabriel Lefèvre, Sevser Sahpaz, Benoît Cudennec, Riadh Ksouri et Céline Rivière. Antibacterial properties and bioavailability of natural phenanthrene derivatives from *Juncus inflexus*. *Drug Discovery Day from concept to scale-up*, Lille, France, 14 Décembre 2021 (webinaire, présentation de 10 minutes). **Obtention du prix de la meilleure présentation orale.**

Asma Hakem, Christel Neut, Ramla Sahli, Jennifer Samillie, Sophie Moureu, Séverine Mahieux, Isabelle Houcke, Mathie Tenenbaum, Rawen Ben Malek, Pauline Bruniaux, Vincent Roumy, Gabriel Lefèvre, Sevser Sahpaz, Benoît Cudennec, Riadh Ksouri et Céline Rivière. *Juncus inflexus*, a valuable source of natural phenanthrene derivatives: a promising antibacterial activity and an insight into their bioavailability. 1st Joint Meeting on Natural Products Pharmacology SIF-SIPHAR-IMGNPP, Naples, Italie, 24-26 Février 2022 (poster, congrès en présentiel).

Asma Hakem, Christel Neut, Ramla Sahli, Jennifer Samillie, Sophie Moureu, Séverine Mahieux, Mathie Tenenbaum, Rawen Ben Malek, Pauline Bruniaux, Vincent Roumy, Gabriel Lefèvre, Sevser Sahpaz, Benoît Cudennec, Riadh Ksouri et Céline Rivière. *Juncus inflexus*, une source de composés phénanthréniques : études de leur activité antibactérienne et de leur

biodisponibilité. Les journées Jeunes Chercheurs Condorcet - J2C2 - Édition 2022, France, 27-28 Janvier 2022 (webinaire, présentation orale 15 min).

Asma Hakem, Mathie Tenenbaum, Pauline Bruniaux, Barbara Deracinois, Jennifer Samaillie, Sevser Sahpaz, Rozenn Ravallec, Benoît Cudennec, Riadh Ksouri et Céline Rivière. *In vitro* transport of juncusol isolated from *Juncus inflexus* across intestinal Caco-2-HT29-MTX cells monolayer. OHID - One Health International Days (OHID) 2022, Lille, France, 27-29 Juin 2022 (présentation orale 15 minutes, congrès en présentiel).

Asma Hakem, Christel Neut, Ramla Sahli, Jennifer Samaillie, Séverine Mahieux, Isabelle Houcke, Rawen Ben Malek, Gabriel Lefèvre, Vincent Roumy, Sevser Sahpaz, Riadh Ksouri et Céline Rivière, Phenanthrene derivatives from *Juncus inflexus* : natural antibacterial products against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. 2nd webinar of the Franco-Brazilian Network on Natural Products (FB2NP), France, 11-12 juillet (webinaire, présentation orale 15 minutes).

Asma Hakem, Christel Neut, Ramla Sahli, Rawen Ben Malek, Gabriel Lefèvre, Séverine Mahieux, Jennifer Samaillie, Isabelle Houcke, Sevser Sahpaz, Vincent Roumy, Riadh Ksouri et Céline Rivière. Phenanthrene derivatives from *Juncus inflexus* as natural antibacterial agents. Phytochemical Society of Europe (PSE) Meeting 2022, Natural Products In Drug Discovery and Development - Advances and Perspectives, Iași, Roumanie, 19-22 Septembre 2022 (présentation orale 15 minutes, congrès en présentiel).

Asma Hakem, Christel Neut, Ramla Sahli, Rawen Ben Malek, Gabriel Lefèvre, Séverine Mahieux, Jennifer Samaillie, Isabelle Houcke, Sevser Sahpaz, Vincent Roumy, Riadh Ksouri et Céline Rivière. Promising antibacterial properties of phenanthrene derivatives from *Juncus inflexus*. 5th edition of the Biochemistry and Microbiology Applied Technology Congress (BMAT'2022), Hammamet, Tunisie, 4-6 Novembre 2022 (poster présenté par mon directeur de thèse en Tunisie).

Asma Hakem, Lowiese Desmarets, Ramla Sahli, Rawen Ben Malek, Charline Camuzet, Nathan François, Gabriel Lefèvre, Jennifer Samaillie, Sophie Moureu, Sevser Sahpaz, Sandrine Belouzard, Riadh Ksouri, Karin Séron and Céline Rivière. Luteolin isolated from *Juncus acutus* L. to treat human coronaviruses infections? Phytochemical Society of Europe (PSE) Meeting 2023, Natural Drug Discovery: Current Approach and Future Perspectives, Antalya, Turquie, 13-15 Octobre 2023 (présentation orale en ligne de 15 minutes, congrès en présentiel).
Obtention de la bourse de voyage de la PSE.

CONTEXTE DE L'ÉTUDE

CONTEXTE DE L'ÉTUDE

Selon l'OMS, les maladies infectieuses émergentes sont définies comme des infections qui sont nouvellement apparues au sein d'une population ou des infections qui existaient auparavant et dont l'incidence ou l'étendue géographique augmente rapidement. Elles regroupent toutes les maladies provoquées par la transmission d'un agent pathogène tel que les bactéries, les virus, les parasites, les prions et les champignons. 60% à 80% de ces maladies sont d'origine zoonotique, elles émergent de l'animal vers l'être humain (Jones et al., 2008 ; UK Health Security Agency, 2023). C'est notamment le cas des infections engendrées par les virus VIH, SARS-CoV, et la bactérie *Borrelia burgdorferi* (maladie de Lyme) et bien d'autres pathogènes. Les infections émergentes représentent au moins 15% de tous les agents pathogènes humains (McArthur, 2019). Certains scientifiques séparent les maladies émergentes des maladies réémergentes et définissent ainsi les deuxièmes comme étant des maladies réapparaissant après avoir connu un déclin significatif. Leur réémergence pourrait être due à des dérèglements dans les mesures de santé publique déjà établies pour le contrôle des maladies infectieuses ou à l'apparition de nouvelles souches plus adaptées (Petersen et al., 2018). Les maladies réémergentes comprennent par exemple le paludisme, la tuberculose et la grippe. Contrairement à d'autres maladies qui touchent la santé humaine, les maladies infectieuses peuvent être imprévisibles et peuvent dans certains cas déclencher des épidémies mondiales. Au cours des deux dernières décennies, les progrès médicaux, l'accès aux soins de santé et l'amélioration de l'assainissement ont fortement réduit la mortalité et la morbidité globales liées aux maladies infectieuses, en particulier pour les infections des voies respiratoires inférieures et les maladies diarrhéiques. Malheureusement, malgré tous ces avancées, l'éradication totale des maladies infectieuses semble impossible. Elles continuent à persister au cours du temps sous forme d'épidémie et de pandémie d'agents pathogènes émergents et ré-émergents qui se propagent d'une manière rapide favorisée par des facteurs divers et variés. La plupart de ces facteurs sont d'origine anthropique, tels que le changement et l'adaptation des pathogènes, les changements écologiques (urbanisation croissante, pratiques agricoles, déforestation, changement climatique), l'évolution des habitudes de l'être humain, la connectivité mondiale (mobilité accrue des individus), etc. Un autre enjeu concerne la problématique de la résistance aux antimicrobiens. Une revue publiée par Cassini et al., 2019, indique que 33 000 personnes décèdent annuellement dans l'Union européenne à cause de la résistance des bactéries aux antibiotiques. Il est estimé que d'ici 2025, la résistance aux antimicrobiens risque d'engendrer

10 millions de décès/an (O'Neill, 2016). Bien que l'antibiorésistance soit un phénomène naturel, l'utilisation massive et répétée des antibiotiques en santé humaine et animale favorise la création d'une pression de sélection sur les populations bactériennes et peut conduire à la prévalence de souches multi-résistantes. C'est dans ce contexte que ce projet de thèse vise à proposer de nouvelles solutions thérapeutiques à deux problématiques en lien avec l'émergence des maladies infectieuses : l'antibiorésistance et l'apparition de la pandémie de la COVID-19. Pour répondre à cet enjeu, nous avons exploré le potentiel de certaines espèces issues du règne végétal en recherchant de nouvelles substances naturelles à activités antimicrobiennes. Les plantes constituent en effet des réservoirs naturels de composés présentant une grande diversité structurale et un éventail d'activités biologiques prometteuses. Ces molécules, anciennement appelées métabolites secondaires, sont désignées maintenant comme étant des métabolites spécialisés. Elles sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques, en l'occurrence dans la croissance et le développement des plantes ainsi que leur défense et adaptation aux changements environnementaux (Chassagne et al., 2021 ; Marone et al., 2022). De nombreuses approches existent pour la recherche de substances d'origine naturelle à partir de plantes. L'approche ethnobotanique est très souvent utilisée car elle repose sur le savoir des populations locales en matière d'usage traditionnel des plantes. Pour cette étude, nous avons opté pour une approche écologique. Cette stratégie repose sur l'observation et l'intégration de critères environnementaux et d'interactions qui peuvent avoir lieu entre les organismes de l'écosystème dans lequel se développent les espèces végétales. De nombreuses études ont souligné l'importance de cette approche pour identifier des espèces d'un grand intérêt médicinal et pharmaceutique (Coley et al., 2003 ; Wagner Luiz Ramos Barbosa et al., 2012). Une collaboration antérieure entre les mêmes laboratoires d'accueil, dans le cadre des travaux de thèse en cotutelle du Dr Ramla Sahli soutenue en 2017, avait confirmé l'intérêt de cette approche par la mise en évidence du potentiel antiviral du dehydrojuncusol contre le virus de l'hépatite C. Ce métabolite spécialisé, dérivé phénanthrénique isolé à partir des rhizomes du *Juncus maritimus*, plante halophyte collectée en Tunisie et retrouvée sur le littoral du Nord de l'Europe et du bassin méditerranéen, est un inhibiteur de la réplication de ce virus (Sahli et al., 2018 ; Sahuc et al., 2019). Dans la continuité des travaux menés sur l'exploration du pouvoir antimicrobien des plantes halophytes, de nouvelles collectes d'espèces de *Juncus* ainsi que d'autres plantes halophytes tunisiennes ont été réalisées. Des espèces de *Juncus* dont *Juncus acutus* L. (2 spécimens), *J. maritimus* Lam. (1 spécimen) et *J. inflexus* L. (1 spécimen) ont été collectées en juillet 2018 en France, en Bretagne (*J. acutus* et *J. maritimus*) et dans la région Nouvelle-Aquitaine (*J. inflexus*) et identifiées par le Dr Gabriel Lefèvre et le Pr Céline Rivière.

De plus, 10 plantes halophytes tunisiennes appartenant à 5 familles botaniques différentes : Aizoaceae, Amaranthaceae (6 espèces), Nitrariaceae, Plumbaginaceae et Tamaricaceae ont été collectées par moi-même sur 3 sites différents en Tunisie durant le mois d'Août 2020 (**Annexes 1 & 2**). Suite aux résultats du premier criblage de l'ensemble des plantes (extraits bruts et sous-extraits) pour leur activité antimicrobienne (bactéries, levures et coronavirus HCoV-229E), mon projet de thèse a été orienté spécifiquement sur les espèces de *Juncus* collectées en France. En effet, seules les tiges de *J. acutus* et les rhizomes de *J. inflexus* ont été sélectionnés respectivement pour la suite des études portant sur l'activité antivirale contre le coronavirus HCoV-229E et l'activité antibactérienne contre les bactéries à Gram positif. Pour se faire, un fractionnement bioguidé, employant des techniques conventionnelles telles que l'HPLC préparative et la CPC, a été mené sur ces deux plantes afin de pouvoir isoler et identifier les composés responsables des activités mise en évidence. Souhaitant aller plus loin dans notre réflexion sur une potentielle application clinique de nos composés phénanthréniques antibactériens, nous avons orienté le projet selon deux axes en fonction de la voie d'administration potentielle. Dans le cas d'une application locale, une étude a été initiée sur la mise en place d'une formulation à base de juncusol, composé phénanthrénique antibactérien identifié dans le cadre de l'étude et purifié en quantité satisfaisante à partir de *J. inflexus*. L'hydrogel développé permettrait de proposer un traitement contre les infections aux staphylocoques dorés, qui engendrent de graves problèmes chez les patients diabétiques. Enfin, dans le cas d'une prise orale potentielle, afin d'apporter quelques éléments clés en lien avec les études de pharmacocinétique, une étude préliminaire sur la biodisponibilité du juncusol a été menée en réalisant des expériences de digestion et de passage de barrière intestinale *in vitro* sur le modèle de coculture cellulaire CaCo2/HT29-MTX.

Ce manuscrit de thèse s'articule autour de 3 grands chapitres :

Le **chapitre 1** détaille tout d'abord l'état de l'art de notre thématique de recherche à savoir les pathologies émergentes (cas du coronavirus SARS-CoV-2) et la résistance aux antibiotiques. Dans un second temps, les aspects botanique, phytochimique et pharmacologique des espèces de *Juncus* sélectionnées dans le cadre de notre étude sont présentés. Ce chapitre se termine par des données générales sur la mise en place d'une formulation de type hydrogel de cyclodextrine et sur la biodisponibilité des composés phénanthréniques bioactifs des *Juncus*.

Le **chapitre 2** s'intéresse aux différents résultats obtenus au cours de cette thèse et à une discussion associée. Il se compose de 4 sous-chapitres :

Contexte de l'étude

- **sous-chapitre 1 :** étude de l'activité antivirale des tiges de *J. acutus* contre le coronavirus HCoV-229E
- **sous-chapitre 2 :** étude de l'activité antibactérienne des rhizomes de *J. inflexus* contre les bactéries à Gram positif et en particulier contre l'isolat clinique résistant à la méticilline *Staphylococcus aureus* T28.1
- **sous-chapitre 3 :** mise en place d'une formulation topique : hydrogel de cyclodextrine à base de juncusol
- **sous-chapitre 4 :** étude préliminaire de la biodisponibilité des composés phénanthréniques issus des espèces de *Juncus* à travers des expériences de digestion gastro-intestinale statique *in vitro* et de passage de barrière intestinale sur le modèle de coculture cellulaire Caco2/HT29-MTX.

Le **chapitre 3** décrit avec précision la méthodologie et le matériel employés pour chaque sous-chapitre de la partie résultats et discussion.

Ce manuscrit s'achève par des conclusions générales et les perspectives de ce travail.

Un certain nombre d'éléments seront également apportés en annexes, en particulier le travail mené sur le screening des 10 plantes halophytes tunisiennes.

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1. Pathologies émergentes : cas du coronavirus SARS-CoV2

1.1 Historique

Les virus sont responsables de 25,4% des maladies infectieuses touchant à la santé de l'Homme (Tabish and Syed, 2015). Certains de ces virus sont exclusivement impliqués dans les infections respiratoires entraînant ainsi des taux de mortalité assez élevés surtout dans les pays en cours de développement en raison d'un accès limité aux soins de santé. Les exemples les plus connus sont l'épidémie de la grippe espagnole (H1N1) apparue en 1918 et responsable de la mort d'environ 50 millions de personnes dans le monde entier, ainsi que la grippe asiatique (H2N2) de 1957 et la grippe de Hong Kong (H3N2) de 1968, responsables respectivement de la mort de 4 millions et d'un million de personnes. Au cours des deux dernières décennies, 3 coronavirus humains, hautement pathogènes, appartenant au genre *Betacoronavirus* sont apparus : le coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV), le coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV) qui ont été à l'origine de deux épidémies respiratoires sévères (Masters and Perlman, 2013) et, dernièrement, le SARS-CoV-2.

1.2. Epidémiologie et symptomatologie

Le SARS-CoV a été associé au développement de maladies respiratoires sévères avant qu'il ne soit caractérisé (Graham et al., 2013). Il est apparu dans le sud de la Chine en 2002. Il a infecté 8437 personnes et a entraîné la mort de 813 individus (WHO, 2003). Depuis le début de l'année 2004, le SARS-CoV n'est plus réapparu. Cependant, un virus semblable à ce dernier a émergé 10 ans plus tard ; il s'agit du virus de MERS-CoV. Il a été isolé pour la première fois à partir d'un échantillon d'expectorations d'un patient souffrant d'une pneumonie sévère à Djeddah (Arabie Saoudite) (Zaki et al., 2012). Depuis son apparition, le virus de MERS-CoV a été responsable de la mort de 945 personnes avec une répartition des cas dans 27 pays à travers le monde (Asie, Afrique, Europe et Amérique du Nord) mais majoritairement recensés en Arabie Saoudite. Le taux de morbidité des cas confirmés à l'échelle mondiale est estimé à plus de 30% (Mubarak et al., 2019 ; OMS 2022 ; Petersen et al., 2020 ; ecdc.europa.eu).

En décembre 2019, le virus du SARS-CoV-2 a été identifié comme étant l'agent infectieux à l'origine de la pandémie de la COVID-19. À ce jour, on estime que le SARS-CoV-2 a causé la mort de plus de 6,9 millions de personnes (WHO, 2023). Ce virus est apparenté au coronavirus responsable du SARS, le SARS-CoV, et appartient comme celui-ci à l'espèce virale SARS-CoV, dans le sous-genre *Sarbecovirus* du genre *Betacoronavirus*. Les valeurs d'homologie nucléotidique ont été respectivement déterminées entre le SARS-CoV-2 et le SARS-CoV et entre SARS-CoV-2 et le MERS-CoV à 79,5% et 50%. Le génome du SARS-CoV-2 est constitué d'un ARN simple brin de 29 903 nucléotides codant pour 9860 acides aminés et répartis en 11 gènes (Chen et al., 2020 ; Lee et al., 2020 ; Lu et al., 2020 ; Yoshimoto, 2020).

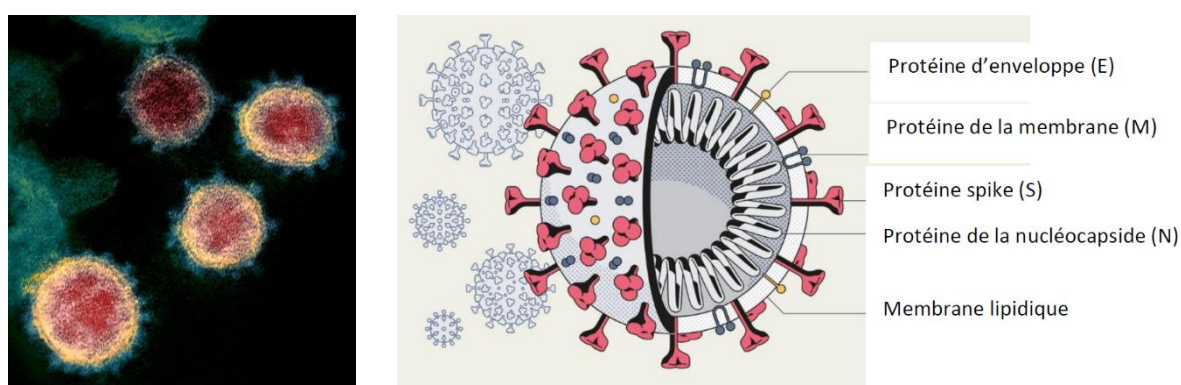


Figure 1. Le coronavirus SARS-CoV-2 (A) vu au microscope électronique. (B) Représentation schématique (niaid.nih.gov ; Hammond, 2020)

La maladie de SARS-CoV-2 se caractérise par des symptômes cliniques irréguliers. En effet, de nombreuses personnes infectées demeurent asymptomatiques ou présentent des symptômes respiratoires assez légers tandis que d'autres développent une maladie respiratoire ressemblant à des pneumonies dont les symptômes les plus courants sont la fièvre, la fatigue, la toux sèche, le manque de souffle et la dyspnée (Hui et al., 2020 ; Shereen et al., 2020 ; Zhu et al., 2020). Dans les cas les plus sévères, notamment chez certaines personnes souffrant de maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète, l'arthrite ou l'asthme, chez des personnes souffrant de comorbidités ou encore chez les personnes immunodéprimées, une pneumonie, une insuffisance respiratoire ou rénale, un sepsis ou une réponse inflammatoire systémique peuvent apparaître engendrant ainsi la mort des sujets atteints. Les études épidémiologiques suggèrent que le taux de létalité apparente (décès/cas confirmés) du SARS-CoV-2 serait autour de 2 %. Toutefois, la transmissibilité et l'infectiosité de ce virus sont très élevées (Liu et al., 2020). Il possède un tropisme particulier pour le système respiratoire supérieur et inférieur. Il se transmet d'une personne à une autre par un contact rapproché via

les microgouttelettes et les aérosols. Des études ont souligné que le SARS-CoV-2 est capable d'infecter les poumons, les intestins (Xiao et al., 2020), les vaisseaux sanguins, les voies biliaires, la conjonctive, les macrophages (Bao et al., 2020 ; Hui et al., 2020), les lymphocytes T, le cœur, le foie, les reins (Puelles et al., 2020) et les neurones (Moriguchi et al., 2020 ; Paniz-Mondolfi et al., 2020).

1.3. Origine et transmission

Les chauves-souris sont considérées comme les hôtes naturels du virus SARS-CoV-2. Au début de la pandémie, les pangolins ont été proposés comme hôte intermédiaire. Cette hypothèse a été établie sur la base du degré de similitude génétique élevé entre les coronavirus des pangolins et le SARS-CoV-2, des interactions entre les pangolins et les populations de chauves-souris et de leur présence au marché de Wuhan au moment où les premiers cas documentés de SARS-CoV-2 ont été identifiés (Li et al., 2021). Cette dernière ainsi que les rapports phylogénétiques initiaux établis ont cependant été réfutés (Schindell et al., 2022).

En terme d'homologie, la séquence génétique du SARS-CoV-2 est à 96,2% identique à celle du coronavirus de la chauve-souris chinoise : RaTG13 lié au SARS ou Bat SL-CoV RaTG13 (F. Wu et al., 2020 ; P. Zhou et al., 2020) et à 96,85% identique au virus BANAL-52, une souche de coronavirus identifiée en 2020 à partir des échantillons de chauves-souris au Laos (Gozlan, 2021a). Malgré la similitude génétique entre RaTG13 et SARS-CoV-2, la protéine S de ces deux virus est très différente. En revanche, le domaine de liaison au récepteur RBD (*Receptor Binding Domain*) du SARS-CoV-2 est très proche de celui de BANAL-52. Le virus de SARS-CoV-2 s'est bien adapté à l'Homme. Des déterminants expliquant cette adaptabilité ont été mise en exergue : le premier est la présence de la mutation T372A au niveau du récepteur RBD facilitant ainsi la liaison au récepteur ACE2 (enzyme de conversion de l'angiotensine 2) humain et le second est l'apparition d'une insertion d'une séquence de 4 acides aminés au niveau du site de clivage de la furine (Coutard et al., 2020 ; Kang et al., 2021).

À ce jour, la communauté scientifique continue de mener des études collaboratives et approfondies afin de pouvoir élucider davantage les hypothèses liées à l'origine et la transmission du SARS-CoV-2.

1.4. Cycle de vie du virus

Comme d'autres coronavirus, le virus SARS-CoV-2 possède 4 protéines fonctionnelles : S, E, M, qui constituent ensemble l'enveloppe virale et la protéine N dont le rôle est de protéger l'ARN viral (**Figure 1**). Le SARS-CoV-2 possède également des protéines non-structurales codées par la région ORF du génome telles que l'endopeptidase C30 (la protéase 3C-like ou 3CL^{pro} ou M^{pro}), la protéase *papain-like* (PLP ou PLCP) et l'ARN polymérase ARN-dépendante (Chan et al., 2020). La glycoprotéine S (péplomère, protéine spiculaire, protéine *Spike*), protéine caractéristique des coronavirus, est considérée comme l'un des principaux déterminants du tropisme du SARS-CoV-2 ; elle joue un rôle clé dans l'infection des cellules, notamment au niveau de la liaison du virus aux récepteurs présents en surface des cellules (Vabret and Miszczak, 2010 ; C. Wu et al., 2020). Elle est constituée de 2 sous-unités fonctionnelles : S1 et S2 assurant respectivement la liaison du virus au récepteur de la cellule hôte et la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire (Huang et al., 2020). Une fois fixée à l'ACE2, la spicule virale S subit deux clivages successifs par une protéase de la cellule hôte, notamment la protéase transmembranaire à sérine TMPRSS2. Durant cet évènement moléculaire, une partie de la séquence polypeptidique de la protéine S appelée peptide de fusion est exposée et s'agrège dans la membrane cellulaire. Ensuite, un rapprochement suivi d'une fusion prennent lieu entre l'enveloppe du virus et la membrane cellulaire. Une autre voie d'entrée est également possible pour le virus SARS-CoV-2 notamment dans le cas où la cellule hôte exprime des quantités faibles en TMPRSS2 ; il s'agit du processus de l'endocytose. Dans ce cas, le complexe virus-ACE2 est internalisé par endocytose médiée par la clathrine dans les endolysosomes, où le clivage de S2' est effectué par les cathepsines nécessitant un environnement acide afin de pouvoir exécuter leur activité (**Figure 2**) (Jackson et al., 2022).

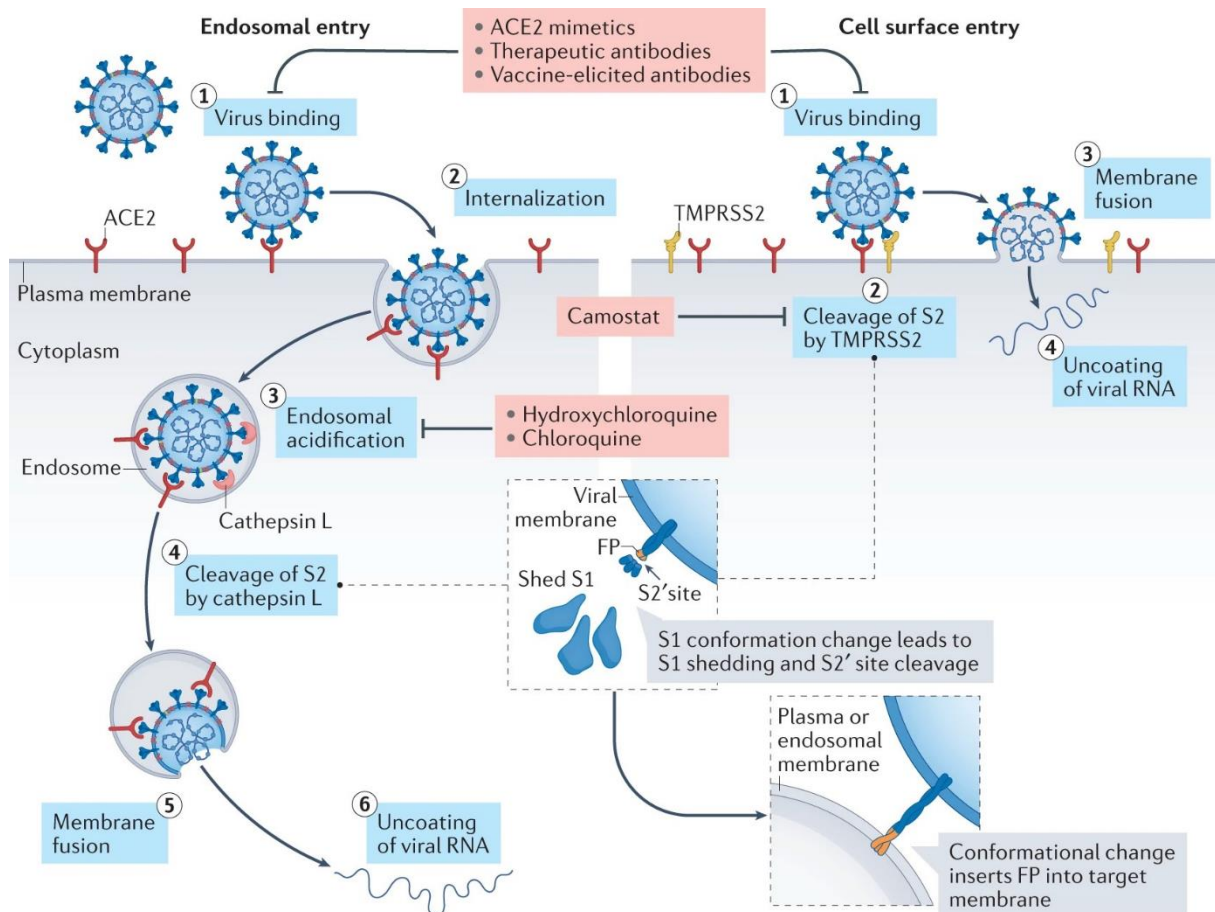


Figure 2. Voies d'entrée du SARS-CoV-2 dans la cellule hôte (Jackson et al., 2022)

Après la fusion et le largage de la nucléocapside dans le cytosol de la cellule hôte, le SARS-CoV-2 se met à détourner la machinerie cellulaire de production de protéines au profit de la synthèse de ses propres constituants. La protéine N, protégeant l'ARN viral, bloque la production des interférons dont le rôle est d'alerter les cellules voisines qu'une infection est en cours. Simultanément, les ribosomes de la cellule infectée traduisent l'ARN viral et se mettent à produire de nouvelles particules virales (Bonny et al., 2020 ; Fehr and Perlman, 2015 ; Hu et al., 2017). Le processus de bourgeonnement prend ensuite place : les vésicules, contenant les protéines virales membranaires et la nucléocapside, émergent dans le lumen du compartiment intermédiaire du réticulum endoplasmique (ERGIC ; *endoplasmic-reticulum-Golgi intermediate compartment*). Au cours de ce processus, la protéine S est incorporée dans la particule virale nouvellement formée, et les virus ainsi assemblés sont acheminés à la surface de la cellule infectée puis libérés par le mécanisme d'exocytose dans le milieu extracellulaire.

Depuis le début de la pandémie de SARS-CoV-2, la communauté scientifique s'est impliquée pour élucider le mécanisme de réplication de ce virus, décrypter la réponse immunitaire de

l'hôte et comprendre l'immunopathogénie causée par l'infection. À ce jour, des connaissances ont été acquises sur l'interaction entre les protéines virales et les facteurs de l'hôte grâce à des études exhaustives de profilage protéomique et transcriptomique. Ces données sont d'une grande importance afin de pouvoir préparer de nouvelles stratégies pour la prévention et le traitement des infections causées par le virus SARS-CoV-2.

1.5. Mutations et traitements actuels

Étant donné que le virus SARS-CoV-2 est un virus à ARN, il a tendance à fréquemment muter favorisant ainsi l'apparition d'un nombre important de variants souvent plus contagieux et plus infectieux (Sallam et al., 2021). C'est notamment le cas du variant Alpha du SARS-CoV-2, aussi appelé B.1.1.7 et surnommé « variant anglais » ou « variant britannique », du variant Bêta (501.V2 ou B.1.351) et surnommé « variant sud-africain », du variant VOC-202012/02 (B.1.1.248 réaffecté en B.1.1.28) et appelé « variant brésilien » et du variant omicron (B.1.1.529). Ces derniers semblent être capables d'affaiblir l'efficacité des anticorps des vaccins de première génération et de faciliter les réinfections au SARS-CoV-2 (Andreano et al., 2020 ; Deluzarche, 2021 ; Gozlan, 2021b). Ainsi le développement d'un vaccin efficace s'avère assez compliqué. L'efficacité des vaccins à ARN développés est limitée à prévenir des complications graves qui peuvent avoir lieu chez certains patients. Ces derniers reposent sur l'activation du système immunitaire adaptatif moyennant de l'ARN messenger (ARN_m) correspondant à une protéine virale ou une protéine semblable à l'antigène de l'agent pathogène

Ainsi peu d'options thérapeutiques semblent réduire de manière significative la symptomatologie causée par le SARS-CoV-2. Outre les vaccins, la communauté scientifique mondiale a mis en œuvre de nombreuses stratégies pour affronter les infections engendrées par le SARS-CoV-2. Les anticorps monoclonaux (Lee et al., 2022 ; Pokhrel et al., 2020), employés pour le blocage de l'entrée du virus, les inhibiteurs de polymérase ou de protéase utilisés pour l'inhibition de sa réplication (Wang et al., 2022), le repositionnement de certains antiviraux déjà existants sur le marché et le développement de traitements thérapeutiques et prophylactiques tel que le Paxlovid® sont des exemples de ces stratégies (Aldea et al., 2021 ; Wang and Yang, 2022). D'autres approches thérapeutiques prometteuses existent, comme l'utilisation des interférons (interférons de type I et III) de par leur rôle clé dans les réponses immunitaires innées lors d'une infection virale (Beucher et al., 2022) ou l'emploi de la thérapie plasmique de convalescence (Senefeld et al., 2023).

De nombreuses études, y compris des essais cliniques, ont mis en exergue l'efficacité des anticorps monoclonaux contre les infections dues au SARS-CoV-2, comme le Ranopreve® (casirivimab/imdevimab) (HAS, 2022). Cependant, l'activité attendue s'est montrée considérablement variable en fonction du variant circulant (Deb et al., 2021 ; Plichta et al., 2022). L'agent antiviral Paxlovid®, prescrit dès l'apparition des premiers signes d'infection par la COVID-19 et mis sur le marché dans l'Union européenne le 28 janvier 2022, a démontré son efficacité clinique en réduisant le risque de progression vers une infection plus sévère chez des patients adultes symptomatiques, non vaccinés et non hospitalisés (89,1%) (Hammond et al., 2022). L'efficacité de cet antiviral pour réduire le développement des formes graves de la maladie de la COVID-19 et pour réduire le taux de mortalité chez les patients à haut risque a été également soulignée dans le cadre d'une étude menée en Israël (Najjar-Debbiny et al., 2023). Le Paxlovid® est une association de 2 molécules : le nirmatrelvir, un inhibiteur de la protéase virale M^{pro} disponible par voie orale, et le ritonavir, un inhibiteur de cytochrome P450 (CYP3A4) capable de diminuer le métabolisme du nirmatrelvir et d'augmenter ses taux sériques (Hammond et al., 2022 ; US Food and Drug Administration, 2023). L'étude clinique de Liu et al., 2023, réalisée sur des patients hospitalisés suite à une infection au variant Omicron BA.2.2 et ayant de sévères comorbidités, a montré que le Paxlovid® n'induit aucune réduction significative des risques chez les patients atteints. Ce résultat confirme ainsi l'usage recommandé de l'antiviral Paxlovid® seulement dans le cas de traitement des infections légères et modérées au coronavirus SARS-CoV-2.

D'autres antiviraux contre SARS-CoV-2, dont le mode d'action cible l'ARN polymérase ARN-dépendante virale, sont disponibles. Il s'agit du remdesivir et du molnupiravir (prodrogue). Les bénéfices thérapeutiques du remdesivir sont assez faibles ; un faible effet thérapeutique a été décrit chez les patients hospitalisés qui n'ont pas encore été placés sous ventilation, mais aucun effet significatif n'a été observé chez les patients sous ventilation (WHO Solidarity Trial Consortium, 2022). Le molnupiravir a montré une activité anti-SARS-CoV-2 dans des modèles animaux (Cox et al., 2021 ; Rosenke et al., 2021 ; Wahl et al., 2021). De plus, administrée à 800 mg deux fois par jour dans le cadre d'essais cliniques de phase 1 et d'essais de phase 2 et 3 chez les patients ambulatoires, cette prodrogue s'est révélée être à la fois sûre et bien tolérée dans certaines études (Caraco et al., 2022 ; Fischer et al., 2022 ; Jayk Bernal et al., 2022 ; Khoo et al., 2021 ; Painter et al., 2021). L'étude de Mali et al., 2022 a également souligné le fait que le molnupiravir entraînerait plutôt une réduction significative du risque d'hospitalisation ou de décès des patients à haut risque et atteints d'une infection modérée au SARS-CoV-2. Toutefois, l'étude de Butler et al., 2023, a montré que le traitement au molnupiravir n'induit pas de

diminution de la fréquence des hospitalisations liées au SARS-CoV-2, ni de réduction du taux de mortalité des patients vaccinés et à haut risque. Sur la base des données recueillies, l'Agence Européenne du Médicament (EMA) a estimé qu'il n'était pas possible de conclure que le Lagevrio® pouvait réduire le risque d'hospitalisation ou de décès, ni raccourcir la durée de la maladie ou le délai de guérison chez les adultes présentant un risque de maladie grave. En outre, il n'a pas été possible d'identifier un groupe spécifique de patients chez lesquels un bénéfice cliniquement pertinent du Lagevrio® avait été démontré. Ainsi, l'EMA a recommandé de refuser son autorisation de mise sur le marché et la société a retiré récemment sa demande (EMA, 2023). La Haute Autorité de Santé a également refusé son utilisation en France en 2021 (HAS, 2021).

Des options thérapeutiques développées ont certes montré une efficacité pour prévenir ou traiter les infections dues au SARS-CoV-2 ; c'est notamment le cas des vaccins et du Paxlovid®. Cependant, la propagation rapide de ce virus ainsi que sa capacité élevée à muter (apparition de nouveaux variants) ont souligné le besoin d'un médicament spécifique. C'est dans ce contexte que notre étude propose d'explorer le potentiel d'espèces végétales, et en particulier d'espèces du genre *Juncus* pour trouver des composés d'origine naturelle dotés d'une activité antivirale prometteuse contre les coronavirus. Comme ce projet a été initié un peu avant la pandémie de la COVID-19, il n'a pas été possible de réaliser des essais *in vitro* directement sur le SARS-CoV-2 au début du projet. Ainsi, le coronavirus HCoV-229E a été sélectionné par nos collaborateurs de l'Institut Pasteur de Lille (Dr Karin Séron et son équipe, U1019-UMR 9017, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL)) comme modèle pour l'évaluation de l'activité antivirale des espèces de *Juncus* sélectionnées. Ce virus est caractérisé par un faible pouvoir pathogène et il est souvent associé à des rhumes bénins.

Le coronavirus humain 229E

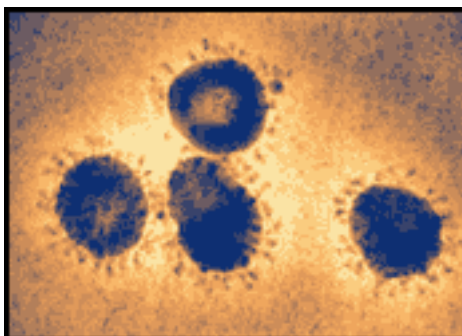


Figure 3. Image au microscope électronique du coronavirus humain 229E (HCoV-229E) (cdc.gov)

Avant l'émergence des coronavirus hautement pathogènes, d'autres coronavirus humains existaient. Cependant, en raison de leur potentiel pathogène jugé mineur, peu d'attention a été accordée à ces derniers. Le coronavirus 229E (HCoV-229E) est un exemple de ces coronavirus moins pathogènes (**Figure 3**). C'est un alphacoronavirus qui a été découvert dans des lavages nasaux de patients, ayant un rhume, au Royaume Uni durant les années 1960 (Hamre and Procknow, 1966). Le HCoV-229E appartient au sous-genre *Duvinacovirus* et est caractérisé par un seul brin d'ARN d'environ 27,7 kb chargé positivement (Corman et al., 2016). Le génome de ce dernier présente une similitude de séquence à 48,09% avec celle du SARS-CoV-2 (Y. Zhou et al., 2020). Avec d'autres coronavirus peu pathogènes comme le HCoV-OC43, le HCoV-NL63 et le HCoV-HKU1, le HCoV-229E provoque des symptômes plutôt bénins mais des complications respiratoires graves peuvent survenir chez les personnes âgées ou atteintes d'une maladie chronique (Bonnin, 2018). Sa présence dans des infections ne doit pas être sous-estimée car ce virus peut devenir problématique dans le cas de co-infections avec d'autres microorganismes ou encore dans des infections des voies respiratoires inférieures. En 2018, un cas d'infection des voies respiratoires inférieures et de syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) dus à une infection à HCoV-229E a d'ailleurs été rapporté chez un adulte, en bonne santé et ne souffrant pas de comorbidités (Vassilara et al., 2018). Les raisons pour lesquelles le HCoV-229E provoquent des manifestations cliniques différentes chez différents groupes de patients restent à élucider.

Le HCoV-229E est bien adapté à l'Homme et ne semble pas avoir besoin d'un réservoir animal pour sa transmission, contrairement aux virus MERS-CoV, SARS-CoV et SARS-CoV-2. Toutefois, le SARS-CoV-2 a dernièrement présenté une transmission interhumaine très efficace. Les épidémies, apparues au cours des 20 dernières années, mettent en évidence la capacité des coronavirus à franchir les barrières entre les espèces et à provoquer des pathologies

graves chez l'homme. Ceci souligne clairement que cette famille de virus constitue un réservoir de pathogènes émergents (Corman et al., 2016 ; Sabir et al., 2016 ; Su et al., 2016).

Comme tous les coronavirus, la protéine S du HCoV-229E joue un rôle clé au niveau de l'entrée du virus dans la cellule hôte. Cette protéine se compose d'une sous-unité de surface N-terminale, S1, abritant le site de liaison pour le récepteur cellulaire CD13 (appelé aussi aminopeptidase N (APN)) et d'une unité transmembranaire C-terminale, S2, englobant les éléments structuraux nécessaires pour la fusion membranaire. La protéine S du HCoV-229E est activée par la cathepsine L, protéase à cystéine dépendante du pH endosomal/lysosomal, lors de l'entrée du virus dans les cellules cibles (Kawase et al., 2009). Par ailleurs, l'activation de la protéine S peut s'opérer grâce à d'autres protéases transmembranaires à sérine de type II (TTSPs), notamment l'HAT (*Human airway trypsin-like*) qui clive la protéine S au niveau de la jonction S1/S2 et la TMPRSS2 (Glowacka et al., 2011 ; Matsuyama et al., 2010) qui clive la protéine S à de multiples sites. Il a été démontré que seule la TMPRSS2 était capable d'induire l'infection des cellules à la surface cellulaire. La protéase HAT intervient plutôt dans le processus de propagation du virus en facilitant la formation de *syncytia* (Belouzard et al., 2012 ; Bertram et al., 2013).

2. Résistance aux antibiotiques

2.1. Généralités, historique et définitions

Outre les pathogènes d'origine virale, l'Homme est continuellement confronté à d'autres pathogènes, notamment ceux d'origine bactérienne. Les autorités sanitaires, notamment l'OMS et les centres pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC : *Centers for Disease Control et Prevention*), ont déclaré la résistance aux antimicrobiens comme l'une des dix principales menaces mondiales pour la santé publique du 21^{ème} siècle, induisant ainsi de nombreuses répercussions socio-économiques négatives (CDC, 2022 ; WHO, 2021). En juillet 2022, l'autorité européenne de préparation et de réaction en cas d'urgence sanitaire (HERA : *Health Emergency Preparedness et Response Authority*) a classé la résistance aux antibiotiques parmi les trois menaces sanitaires prioritaires (HERA, 2022). Plus récemment, une étude menée régulièrement sur la résistance aux antimicrobiens a mis en exergue des chiffres alarmants : 4,95 millions et 1,27 millions sont les chiffres correspondant respectivement aux décès associés et attribués à la résistance des bactéries aux antibiotiques (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022). Face à ces chiffres, l'ampleur de l'antibiorésistance pourrait être comparée à celle de maladies majeures telles que le VIH et le paludisme. La même étude a mis en évidence les trois principaux syndromes infectieux associés à la résistance aux antibiotiques en 2019, incluant les infections des voies respiratoires inférieures et du thorax, les infections sanguines ainsi que les infections intra-abdominales.

La découverte des antibiotiques a radicalement changé la médecine humaine moderne et ceci en prolongeant la durée de vie moyenne de l'Homme de 23 ans. Le salvarsan (ou arsphénamine), premier antibiotique à base d'arsenic, a été introduit en 1910 comme remède contre la syphilis et la trypanosomiase. Mais, c'est la découverte de la pénicilline qui a marqué le début de l'âge d'or de la découverte d'antibiotiques d'origine naturelle (**Figure 4**). Cet événement a été un réel tournant pour la thérapie des maladies infectieuses bactériennes touchant à la santé de l'Homme et de l'animal, surtout au milieu des années 1950 où de nombreuses classes d'antibiotiques ont été découvertes (Hutchings et al., 2019). Parallèlement au traitement des maladies infectieuses, les antibiotiques ont rendu possible de nombreuses procédures médicales modernes, comme par exemple le traitement du cancer, les greffes d'organes et la chirurgie à cœur ouvert. Cependant, un déclin progressif a été noté dans le développement de nouveaux antibiotiques face à l'évolution et à l'émergence des souches bactériennes résistantes, conduisant à la problématique actuelle de la résistance aux

antibiotiques. Bien qu'il soit un phénomène naturel, l'émergence de l'antibiorésistance est très probablement le résultat de l'inefficacité de certains antibiotiques, de leur utilisation massive et répétée ou de leur mauvaise utilisation, ainsi qu'à la persistance des infections conduisant à de graves maladies transmissibles graves (Micoli et al., 2021).

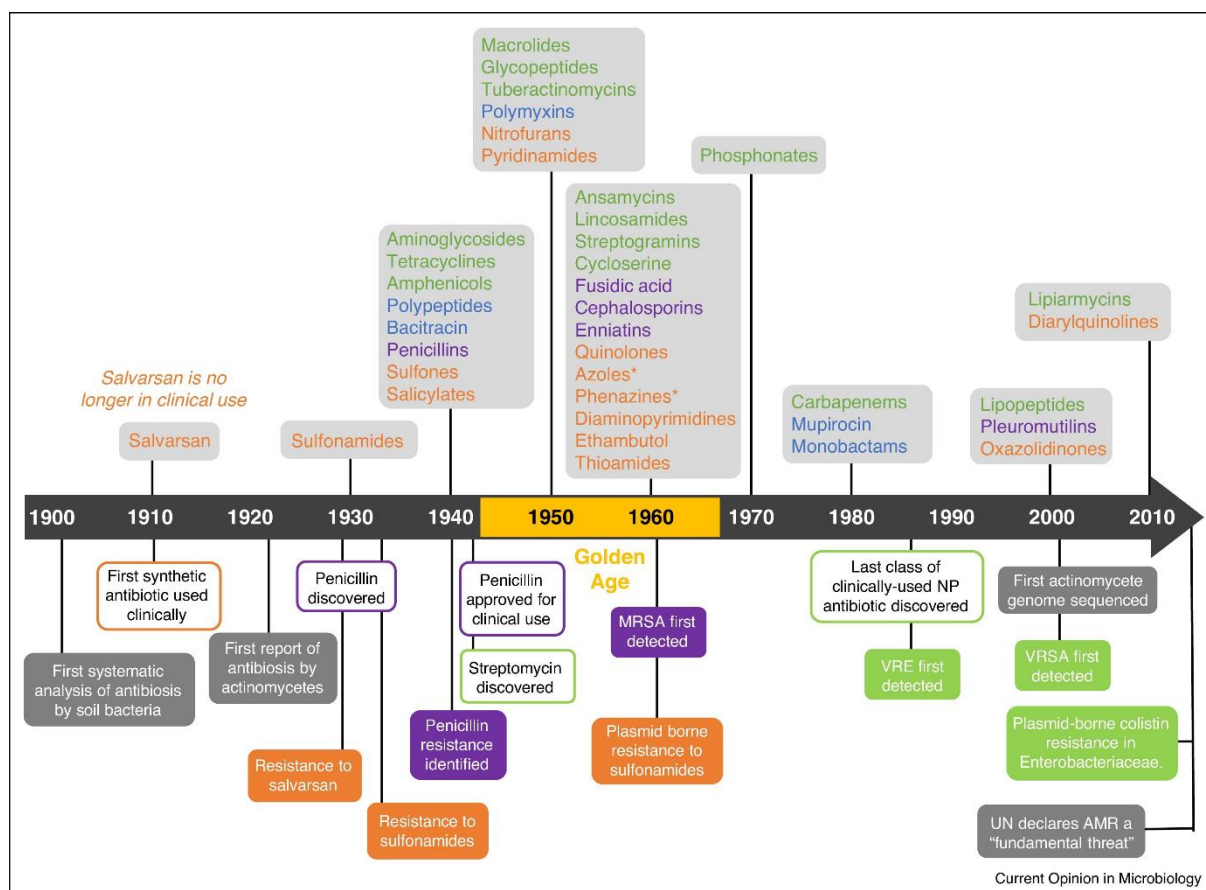


Figure 4. Chronologie visualisant les décennies d'apparition de nouvelles classes d'antibiotiques mises sur le marché. Les antibiotiques sont colorés selon leur origine : actinomycètes (vert), autres bactéries (bleu), champignons (violet) et synthèse (orange et orange marqué par un astérisque pour les antibiotiques dont la synthèse est inspirée de produits naturels). MRSA : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline, VRE : Entérocoques résistants à la vancomycine et VRSA : *Staphylococcus aureus* résistant à la vancomycine (Hutchings et al., 2019).

La résistance des bactéries aux antibiotiques peut être définie comme étant la capacité des bactéries à survivre suite à l'exposition d'une substance antibactérienne à une concentration donnée. Selon la discipline scientifique et les objectifs attendus, ce terme peut avoir de multiples définitions (Acar et Röstel, 2001) :

- en clinique : la bactérie survit à un traitement adéquat impliquant l'utilisation d'un antibiotique ;

- en pharmacologie : la bactérie survit à une gamme de concentrations exprimant les quantités d'un antibiotique présentes dans les différents compartiments de l'organisme lorsque l'antibiotique est administré à la dose recommandée ;
- en microbiologie et en microbiologie moléculaire : la bactérie possède un mécanisme conduisant à une concentration minimale inhibitrice (CMI) plus élevée que les bactéries de phénotype sauvage ;
- en épidémiologie : tout groupe de souches bactériennes qui peut être distingué de la distribution normale (Gauss) des valeurs de CMI déterminées suite à l'application d'un antibiotique.

Le phénomène de résistance aux antibiotiques est un phénomène à la base naturel car les bactéries mettent à profit des stratégies phénotypiques et génétiques grâce à leur patrimoine génétique et deviennent insensibles à certains groupes d'antibiotiques. C'est par exemple le cas d'*Escherichia coli* face à la vancomycine, ou encore de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis de l'ampicilline. On parle ainsi ici de la résistance naturelle. Ce type de résistance pourrait être lié à une caractéristique intrinsèque de l'organisme comme par exemple l'absence d'un récepteur spécifique pour un antibiotique donné, la faible affinité, l'imperméabilité de la paroi cellulaire (cas des bactéries à Gram négatif face à certains antibiotiques de poids moléculaire élevé comme les glycopeptides) ou l'absence de production de certaines enzymes.

Le phénomène le plus préoccupant est celui de la résistance acquise. Elle se produit quand une bactérie donnée acquiert une aptitude à résister contre un antibiotique auquel elle était sensible auparavant. Selon l'article de revue de Urban-Chmiel et al., 2022, l'acquisition de la résistance chez une bactérie peut être primaire ou secondaire. La résistance primaire résulte d'une mutation spontanée et peut avoir lieu même sans contact avec un antibiotique. Elle est également qualifiée de résistance chromosomique. Cette dernière n'est pas transmise à d'autres souches bactériennes. En présence d'un antibiotique, les mutants ont un avantage sur le reste de la population ; ils survivent et deviennent plus nombreux que les populations sensibles. Ainsi, ces mutants peuvent se propager à d'autres niches écologiques au sein du même individu mais également chez d'autres macro-organismes. La résistance secondaire survient au contact de la bactérie avec l'antibiotique. Cette résistance est qualifiée de résistance extra-chromosomique. Les gènes responsables de ce phénomène sont localisés au niveau du plasmide qui se trouve dans le cytoplasme. La transmission des éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons, intégrons), favorisant l'acquisition des résistances par les bactéries, s'effectue via le processus

de transfert horizontal de gènes notamment via les processus de conjugaison, de transduction et de transformation. En effet, au cours de la conjugaison, les plasmides sont transférés par contact direct entre deux ou plusieurs bactéries par l'intermédiaire de structures protéiques filamenteuses appelées pilis. Durant le processus de transduction, le transfert du plasmide de la bactérie donneuse à la bactérie receveuse se fait par l'intermédiaire de bactériophages. La transformation bactérienne consiste en l'absorption du matériel génétique extracellulaire libre se trouvant dans l'environnement et par son incorporation au patrimoine génétique de la bactérie.

2.2. Mécanismes de résistances aux antibiotiques

Au cours de leur évolution, les bactéries ont pu développer divers mécanismes pour se défendre contre les antibactériens d'une manière générale, y compris les antibiotiques. Suite à l'acquisition des gènes de résistance, les bactéries deviennent partiellement au totalement résistantes à un antibiotique. De nombreuses hypothèses ont été décrites pour essayer d'expliquer les mécanismes d'acquisition de résistance aux antibiotiques chez les bactéries. Les différents mécanismes évoqués (**Figure 5**) sont : (i) l'élimination active de l'antibiotique de la cellule bactérienne par le biais des pompes à efflux protéiques, (ii) les modifications enzymatiques de l'antibiotique, (iii) les modifications des composants cellulaires qui souvent sont des cibles de l'antibiotique, (iv) la surexpression d'une enzyme inactivée par l'antibiotique, (v) l'altération de la perméabilité des membranes cellulaires des bactéries, (vi) la création d'une voie métabolique alternative, (vii) l'augmentation de la concentration d'un métabolite ayant un effet antagoniste à l'antibiotique, (viii) la réduction de la quantité ou de l'activité d'une enzyme responsable de l'activation du précurseur de l'antibiotique, (ix) la mise en place de modifications au niveau des systèmes de régulation associées indirectement au mécanisme d'action de l'antibiotique, (x) ou encore la réduction de production d'un produit impliqué dans la voie métabolique inhibée (Darby et al., 2023 ; Giedraitienė et al., 2011 ; van Hoek et al., 2011 ; Zhang et Cheng, 2022).

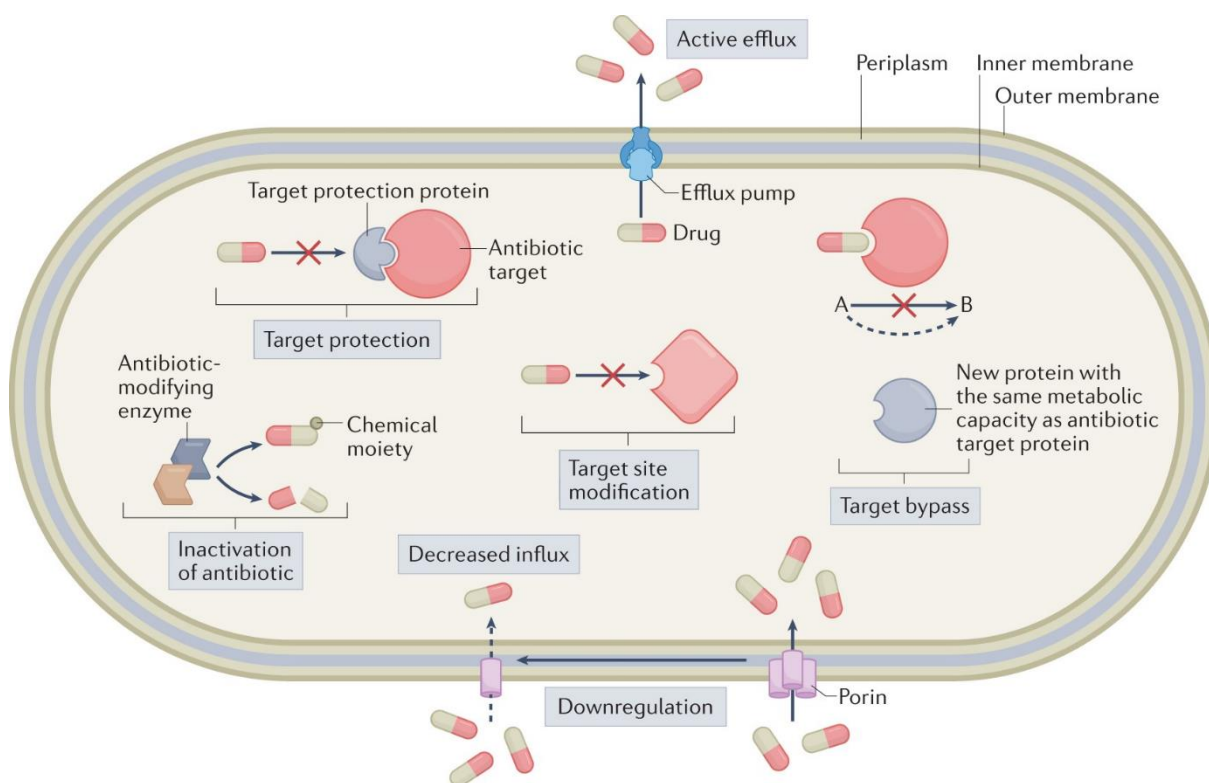


Figure 5. Aperçu global à l'échelle moléculaire des différents mécanismes d'acquisition de résistance des bactéries aux antibiotiques (Darby et al., 2023)

2.3. Répercussions économiques engendrées par la résistance aux antibiotiques

Les infections bactériennes liées à la résistance aux antibiotiques sont par conséquent difficiles à traiter et contribuent à l'augmentation générale de la morbidité et de la mortalité. Elles entraînent également des coûts extrêmement élevés pour les systèmes de santé, notamment via l'augmentation du nombre d'admissions dans les hôpitaux et la hausse de consommation de médicaments dans le monde entier. De nombreuses études ont mis en évidence les conséquences économiques désastreuses liées à cette problématique. Par exemple, le rapport d'O'Neill, 2014 a estimé que l'antibiorésistance pourrait entraîner une perte de 100 000 milliards de dollars pour l'économie mondiale. Un autre rapport a estimé que dans le cas d'un scénario de faible impact, la résistance aux antibiotiques engendrerait une réduction de 1,1% du produit intérieur brut (PIB : un indicateur économique qui permet de mesurer les richesses créées dans un pays au cours d'une période donnée), et par conséquent un déficit dépassant les 1000 milliards USD/an dans le monde entier après l'année 2023 (Jonas et al., 2017). De plus, l'organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) a estimé dans son rapport de 2017 que la résistance aux antibiotiques aurait coûté environ 3,5 milliards de dollars

par an au système de santé des 33 pays étudiés dont les États-Unis avec 2 milliards USD par an (OECD, 2018).

Le problème de la résistance aux antibiotiques a soulevé beaucoup d'inquiétudes dans le monde entier, l'OMS a, de ce fait, émis en mai 2015 un plan d'action global recommandant à tous les États membres d'élaborer un plan national intersectoriel de maîtrise de l'antibiorésistance. Les premiers rapports de OCDE ont souligné que seulement un quart des pays dans le monde dispose d'un plan national de lutte contre la résistance aux antimicrobiens (Cecchini et al., 2015). Le problème d'antibiorésistance a toujours été traité d'une manière conventionnelle et ceci en abordant seulement le cadre clinique de la santé humaine. Plus récemment, l'approche pluridisciplinaire de « One Health » ou « une seule santé » a commencé à prendre de l'ampleur car ce concept tient en compte la complexité des liens étroits entre la santé humaine, celle des animaux et la situation écologique global. Ce concept met en exergue la nécessité de décroiser les approches sanitaires. La stratégie de « One Health » a été mise en avant depuis le début des années 2000 et elle a fait l'objet d'un accord tripartite entre l'OMS, l'organisation mondiale de la santé animale (OMSA) et l'Organisation des Nations Unies pour l'agriculture et l'alimentation (FAO) en 2010 (EUR-Lex, 2001 ; Anses 2023). Cette stratégie a d'abord été renforcée par le plan d'action 2011-2016 de la Commission Européenne qui visait à encourager l'action des États membres (EUR-Lex, 2011), puis par le plan d'action de résistance aux antibiotiques de 2017 (Commission européenne).

Toujours en cohérence avec l'approche « One Health », des avancées considérables ont été réalisées dans le secteur vétérinaire en Europe grâce notamment aux règlements (UE) 2019/6 et (UE) 2019/4 visant à limiter ou à supprimer l'utilisation des antibiotiques. L'utilisation de ces derniers dans les élevages contribue fortement au phénomène de la résistance aux antibiotiques chez l'Homme. En effet, il est estimé qu'environ 80% des antibiotiques vendus sont utilisés comme promoteurs de croissance pour les animaux aux États-Unis. En plus de leur utilisation pour traiter les animaux malades, les antibiotiques sont également largement ajoutés à des niveaux sous-thérapeutiques dans l'alimentation des animaux sains (aliments et eau) durant toute la période de production en mesure prophylactique pour aider à leur croissance et pour augmenter l'efficacité de l'alimentation. C'est le cas par exemple de la colistine, de la classe des polymyxines, utilisée dans le monde entier à la fois pour favoriser la croissance du bétail et comme antibiotique de dernier recours pour traiter les infections graves chez l'Homme (Lekagul et al., 2019 ; Rhouma et al., 2016 ; “United Nations meeting on antimicrobial resistance,” 2016). Cette utilisation favorise le développement et la propagation de bactéries

résistantes aux antibiotiques chez les animaux et entre les groupes d'animaux. Ces pathogènes peuvent ensuite affecter l'Homme par l'intermédiaire de l'environnement ou de la chaîne alimentaire animale (McEwen et Collignon, 2018). En outre, un certain nombre d'éléments démontrent que l'environnement (sols, eaux, hôpitaux, industries, déchets agricoles...) joue un rôle très important en tant que source et voie de dissémination de la résistance aux antibiotiques. Par exemple, les métaux lourds, abondamment utilisés dans les pays développés et sous-développés en guise d'additifs alimentaires pour la production d'animaux destinés à l'alimentation, peuvent persister longtemps dans l'environnement. Ces facteurs environnementaux participent ainsi avec d'autres biocides à la pression de sélection, à la stimulation du transfert horizontal de gènes entre les pathogènes, à la modification des modes d'action des antibiotiques dans un écosystème naturel donné (Fang et al., 2016 ; Herneto-Amado et al., 2019 ; Jutkina et al., 2018), et également à l'accumulation des pathogènes résistants, excrétés par les selles humaines et animales, dans les écosystèmes naturels (Agramont et al., 2020 ; Fang et al., 2016 ; Karkman et al., 2019). Les phénomènes naturels tels que les conditions météorologiques, les variations de niveaux des eaux côtières, les inondations et les catastrophes naturelles peuvent aussi participer à la dissémination des pathogènes multi-résistants (Martinez-Urtaza et al., 2016 ; Yu et al., 2018). Afin de mieux comprendre le rôle de chacun de ces facteurs dans la dissémination des pathogènes résistants et multi-résistants, des études compréhensives sont nécessaires. De plus, les facteurs socio-économiques à savoir la mondialisation des marchés, les conflits, les flux de personnes, les migrations humaines et animales sont des moteurs importants de la diffusion mondiale de l'antibiorésistance, de la propagation des gènes résistants aux antibiotiques et de la dissémination des pathogènes multi-résistants dans les communautés (Cycoń et al., 2019 ; Herneto-Amado et al., 2019 ; McMichael, 2015).

Les antibiotiques ont toujours été les principaux acteurs de la lutte contre les bactéries pathogènes. Face à l'urgence de réduire la résistance des bactéries résistantes et multirésistantes, il est devenu essentiel de diminuer l'utilisation des antibiotiques et de développer de nouvelles stratégies de lutte en essayant d'accroître le potentiel de recherche dans divers domaines. À titre d'exemples, on peut citer la génétique des animaux pour l'identification des marqueurs associés à la résistance innée aux agents pathogènes, la recherche et le développement de nouveaux antimicrobiens ainsi que la détermination du rôle des bactéries dans la transmission de la résistance à la flore microbienne de l'Homme et des animaux. Actuellement, les stratégies innovantes utilisées reposent sur l'utilisation des

bactériophages ou de leurs enzymes, sur l'emploi de nanoparticules ainsi que sur le développement de vaccins de nouvelle génération. Les composés d'origine végétale, microbienne ou fongique restent une alternative prometteuse pour le développement d'antimicrobiens de nouvelle génération de par leur diversité chimique.

2.4. Cas de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM)

D'après l'étude menée par l'Antimicrobial Resistance Collaborators en 2022, 6 principaux pathogènes sont responsables des décès associés à la résistance aux antibiotiques à savoir *Escherichia coli* (*E. coli*), suivi de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) et *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Ces derniers ont été, en effet, identifiés comme agents pathogènes prioritaires d'après l'OMS (WHO, 2017). Quel que soit le type de résistance (à la méticilline ou à la vancomycine), *S. aureus* est considéré comme une priorité « élevée ». En effet, avec *E. coli*, *S. aureus* semble être responsable d'environ la moitié de la charge de morbidité liée à la résistance aux antibiotiques dans les pays à revenus élevés. L'émergence de *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) a été bien documentée depuis sa première apparition en 1960, juste après l'introduction des antibiotiques de type β -lactame de deuxième génération dans la pratique clinique. Le SARM est un microorganisme commensal qui se transmet fréquemment dans les établissements de soins de par son association aux maladies nosocomiales. Aujourd'hui, il émerge d'une manière non contrôlée dans les collectivités et les exploitations animales (Cuny et al., 2010). Ce dernier est souvent à l'origine des infections de la peau, des plaies, des os et des articulations, de pneumonies, de bactériémies et d'endocardites (CDC, 2019 ; Turner et al., 2019).

La **Figure 6**, tirée de l'article de revue Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022, montre la répartition des SARM dans le monde entier selon les données collectées pour l'année 2019. Cette répartition semble varier considérablement d'un pays à l'autre et d'un territoire à l'autre. Les pays d'Afrique et du Moyen-Orient, comme par exemple l'Irak et le Koweït, comptent 60% à 80% d'isolats cliniques résistants à la méticilline. À l'inverse, plusieurs pays d'Europe et d'Afrique subsaharienne recensent moins de 5% d'isolats cliniques de SARM.

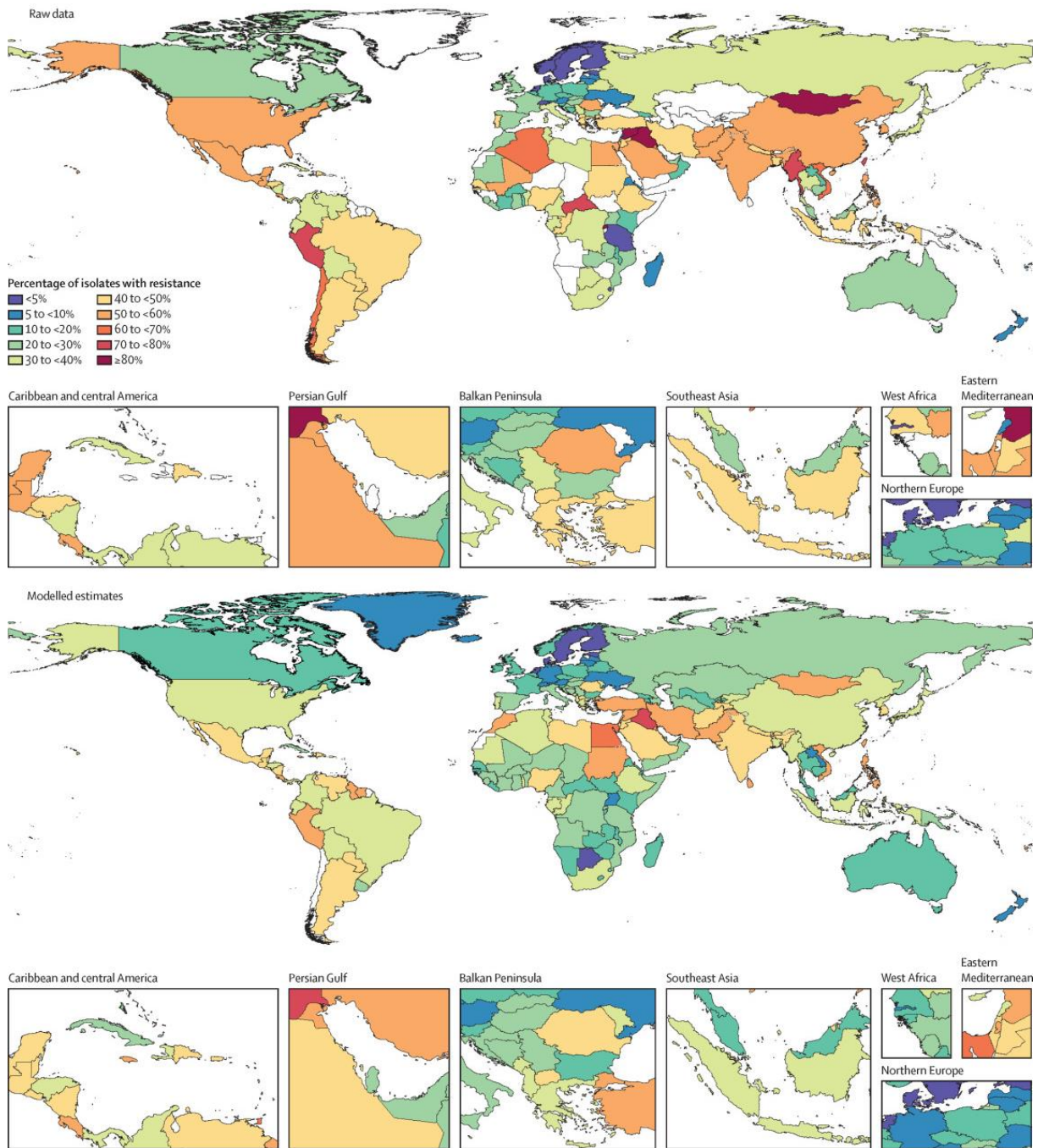


Figure 6. (A) Données brutes et (B) estimations modélisées du pourcentage d'isolats cliniques de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) par pays et par territoire (2019) (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022)

La résistance aux β -lactamines chez les staphylocoques repose sur deux principaux types de mécanisme : un mécanisme de résistance extrinsèque par production d'enzymes inactivant l'antibiotique, et un mécanisme de résistance intrinsèque par modification des protéines de liaison à la pénicilline (PLP) ou par acquisition de nouvelles PLP dotées d'une faible affinité pour la plupart des β -lactamines. La β -lactamase, codée par le gène *blaZ*, localisé généralement

sur un transposon de grande taille sur un plasmide, est une enzyme qui hydrolyse le cycle β -lactame des pénicillines. Les PLP sont des protéines possédant une activité enzymatique (transpeptidases, carboxypeptidases ou glycosyltransférases) impliquée dans la synthèse de la paroi bactérienne et possédant une affinité pour les β -lactamines (Quincampoix et Mainardi, 2001).

La méticilline est un antibiotique semi-synthétique du genre β -lactamine et de la famille des pénicillines résistant à la pénicillinase. Elle a été développée en réponse à l'émergence et à la propagation de la résistance à la pénicilline. Elle a été introduite en clinique en 1959 et commercialisée sous le nom de Celbenin®. Très rapidement, des isolats cliniques de *S. aureus* résistants à la méticilline ont été reportés entre juillet et octobre 1960 à Guildford au Royaume-Uni (Jevons, 1961). Ainsi, les premières épidémies induites par des souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline sont apparues à la fin des années 1970 et au début des années 1980. La production d'une PLP modifiée : la PLP2a ou PBP2a en anglais (*Penicillin binding protein 2a*) est à l'origine de cette résistance car elle est responsable de la réticulation des peptidoglycanes de la paroi cellulaire bactérienne et elle empêche les β -lactamines de se lier au site d'action cible. Grâce à sa faible affinité, elle rend ainsi les antibiotiques, ayant un noyau β -lactame dans leur structure, inefficaces. Contrairement aux β -lactamases, le gène responsable de la résistance à la méticilline est localisé au niveau du chromosome de *S. aureus* (Sjöström et al., 1975). La résistance à la méticilline est médiée par le gène *mecA* et acquise par transfert horizontal d'un élément génétique mobile appelé la cassette mobile SCCmec (*Staphylococcal Chromosome Cassette for methicillin resistance*) (Katayama et al., 2000). Cette cassette se trouve dans le génome bactérien accessoire de la bactérie qui dans le cas de *S. aureus* représente approximativement 25% du génome total. Une grande partie de la diversité génétique des souches SARM et d'autres agents pathogènes se trouve dans le génome accessoire qui apporte généralement des médiateurs de virulence, de l'évasion immunitaire et de la résistance aux antibiotiques (Turner et al., 2019). Dans le cas de SARM, la cassette mobile SCCmec, insérée à la position attBsc située à proximité du gène *orfX* (origine de réplication), a une taille qui varie entre 21 et 67 kb (Hiramatsu et al., 2001 ; Ito et al., 2001). La transcription du gène *mecA* peut être régulée par les gènes régulateurs *mecR1* et *mecI*, codant respectivement pour le promoteur et le répresseur transcriptionnel. En présence d'un antibiotique β -lactame dans l'environnement extracellulaire, le gène *mecR1* est activé et induit rapidement l'expression des gènes *mecA* et de *mecR1-mecI-mecR2*. L'activité antirépressive de *mecR2* est essentielle pour maintenir l'induction de *mecA* puisqu'elle favorise l'inactivation de *mecI* par clivage protéolytique. En revanche, en absence d'antibiotique β -lactame, le gène *mecR1* n'est pas

activé. Un état d'équilibre est alors atteint grâce à la liaison de la protéine répressive *mecI* à son site promoteur : des dimères *mecI* se lient au promoteur *mecA* (ils sont ainsi protégés de la protéolyse) et des copies résiduelles de *mecR1* se lient à la membrane cellulaire (**Figure 7**) (Arède et al., 2012).

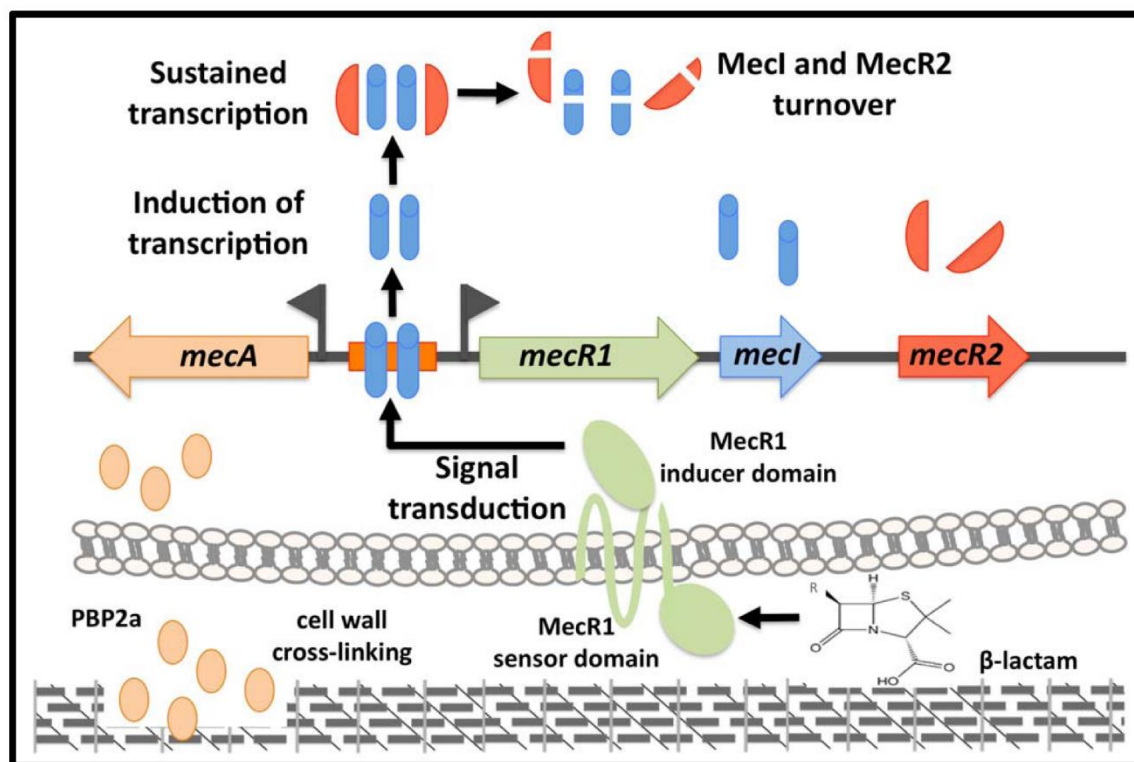


Figure 7. Aperçu schématique de la régulation du gène *mecA* chez les SARM : induction de *mecA* par *mecR1*-*mecI*-*mecR2* (Arède et al., 2012)

Suite à la découverte des SARM, l'une des premières solutions a été de remplacer la mêtécilline par un autre antibiotique. Depuis des décennies, la vancomycine a été sélectionnée comme étant un traitement de première intention de la bactériémie due à SARM et de l'endocardite infectieuse (Mermel et al., 2009). Cependant, la posologie de la vancomycine peut s'avérer difficile car elle varie en fonction du poids et de la fonction rénale de chaque patient. De plus, elle présente un véritable risque de néphrotoxicité (Neely et al., 2014). La daptomycine, un antibiotique lipopeptide cyclique présentant un effet bactéricide *in vitro* contre la plupart des bactéries à Gram positif cliniquement pertinentes, est également prescrite en traitement de première intention. Elle a montré une efficacité comparable à celle de la vancomycine (Fowler et al., 2006). D'autres antibiotiques sont également approuvés pour le traitement des infections causées par les souches de SARM (**Tableau 1**). Cependant leur utilisation varie en fonction de

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique : Résistance aux antibiotiques

l'indication clinique. Ces antibiotiques ne sont pas forcément utilisés en monothérapie ; ils peuvent être utilisés en association avec d'autres antibiotiques ou composés d'origine naturelle à partir de plantes ou de bactéries. Cette application permet d'augmenter l'efficacité des antibiotiques à des doses faibles.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique : Résistance aux antibiotiques

Tableau 1. Liste des antibiotiques actifs sur les souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) (Turner et al., 2019)

Classe d'antibiotique	Mode d'action	Antibiotique	Indications approuvées par la FDA	Utilisations hors indication	Essais cliniques en cours
Glycopeptides	Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne Inhibition de la transglycosylation et la transpeptidation bactérienne	Vancomycine	- Bactériémie - Pneumonie - Infections ostéoarticulaires - Infections bactériennes aiguës de la peau et des structures cutanées	—	—
		Oritavancine	- Infections bactériennes aiguës de la peau et des structures cutanées	—	—
Lincosamides	Inhibition de la synthèse des protéines bactériennes en se liant à la sous-unité 50S du ribosome bactérien	Clindamycine	—	- Infections bactériennes aiguës de la peau et des structures cutanées - Ostéomyélite - Pneumonie	—
Lipopeptides	Fixation sur la membrane des cellules bactériennes → entraînement d'une dépolarisation rapide par fuite de potassium. <u>Résultat</u> : perturbation de la synthèse de l'ADN, de l'ARN et des protéines → mort cellulaire bactérienne	Daptomycine	- Bactériémie - Infections bactériennes aiguës de la peau et des structures cutanées	- Ostéomyélite	—
Oxazolidinones	Inhibition de la synthèse protéique en se fixant sur la sous-unité 50S du ribosome bactérien	Linézolide	- Pneumonie - Infections ostéoarticulaires	- Bactériémie due à SARM liée au cathéter	—

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique : Résistance aux antibiotiques

			- Infections bactériennes aiguës de la peau et des structures cutanées		
		Tédizolide	- Infections bactériennes aiguës de la peau et des structures cutanées	- Infections ostéoarticulaires - Pneumonie nosocomiale	—
Sulfamides + Diaminopyrimidines	Blocage simultané des deux enzymes catalysant les réactions successives dans la chaîne métabolique de l'acide folique, essentielle à la survie de nombreux micro-organismes	Cotrimoxazole = Sulfaméthoxazole + Triméthoprime	—	- Infections bactériennes aiguës de la peau et des structures cutanées non sévères - Ostéomyélite	—
Diaminopyrimidines	Inhibiteur de la dihydrofolate réductase, une enzyme responsable de la synthèse de la thymidine, nécessaire à la synthèse des folates et à la réplication de l'ADN (Noviello et al., 2018)	Iclaprim	—	- Infections bactériennes aiguës de la peau et des structures cutanées - Pneumonie	—
Céphalosporines (3^{ème} génération)	Inhibition de la synthèse du peptidoglycane des bactéries en s'intercalant dans les protéines de liaison à la protéine, notamment les PBP2a de SARM qui participent à la construction de la paroi cellulaire bactérienne	Ceftaroline	- Pneumonie (uniquement pour les pneumonies communautaires et non pas les pneumonies dues à SARM) - Infections bactériennes aiguës de la peau et des structures cutanées	- Thérapie de sauvetage pour la bactériémie et l'endocardite	- Ostéomyélite - Hématogène - Pneumonie - Bactériémie
Céphalosporines (5^{ème} génération)	Liaison aux protéines de liaison à la pénicilline et inhibition de leur activité transpeptidase, essentielle à	Ceftobiprole	—	- Pneumonie sévère	- Bactériémie

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique : Résistance aux antibiotiques

	la synthèse des parois cellulaires bactériennes			- Infections bactériennes aiguës de la peau et des structures cutanées	
Lipoglycopeptides	Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne par liaison au résidu terminal D-Ala-D-Ala du peptide précurseur du peptidoglycane de la paroi cellulaire bactérienne en cours de croissance → inhibition de transpeptidation et transglycosylation et mort cellulaire bactérienne	Télavancine	- Pneumonie - Infections bactériennes aiguës de la peau et des structures cutanées	- Bactériémie	- Bactériémie
		Dalbavancine	- Infections bactériennes aiguës de la peau et des structures cutanées	- Bactériémie due à SARM liée au cathéter	- Infections ostéoarticulaires
Fluoroquinolones	Inhibition de l'activité de l'ADN topoisomérase IV et de l'ADN gyrase (topoisomérase II) des bactéries, nécessaires à la synthèse des ARNm bactériens (transcription) et à la réplication de l'ADN	Délaflaxacine	- Infections bactériennes aiguës de la peau et des structures cutanées	—	- Pneumonie communautaire
Streptogramines	Inhibition des phases précoces et tardives de la synthèse des protéines bactériennes de manière synergique par le changement de conformation stable du ribosome (fixation de la dalfopriline favorise la liaison indépendante de la quinupristine au ribosome)	Dalfopriline (streptogramine du groupe A) + Quinupristine (streptogramine du groupe B) = Synercid®	- Infections bactériennes aiguës de la peau et des structures cutanées	- Pneumonie	—

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique : Résistance aux antibiotiques

Glycylcyclines	Inhibition de la synthèse protéique des bactéries : fixation sur la sous-unité ribosomale 30S et blocage de l'entrée de l'ARNt amino-acyl dans le site A du ribosome → inhibition de l'incorporation des résidus d'acides aminés dans les chaînes peptidiques en cours de formation	Tigécycline	- Pneumonie - Infections bactériennes aiguës de la peau et des structures cutanées	- Bactériémie	—
Tétracyclines	Inhibition de la synthèse des protéines bactériennes en liant le site primaire de liaison de la tétracycline sur la sous-unité 30S du ribosome bactérien, même en présence de la protéine ribosomique de protection Tet(o)	Omadacycline	- Infections bactériennes aiguës de la peau et des structures cutanées	—	—
Quinolones (sous-classe des benzoquinolizines)	Inhibition de l'ADN gyrase (Mehta et al., 2022)	Alalevonadifloxacin = prodrogue de la levonadifloxacin	—	—	Essais de phase I
Mimétiques de la protéine de défense de l'hôte (HDP-mimetics)	Dépolarisation de la membrane bactérienne. Ils imitent les mécanismes de défense qui jouent un rôle dans l'immunité naturelle (Butler et Cooper, 2011 ; Mensa et al., 2014)	Brilacidine	—	—	- Infections bactériennes aiguës de la peau et des structures cutanées
Premier antibactérien ciblant l'enzyme FabI	Inhibition de la synthèse des acides gras chez les <i>Staphylococcus</i> spp., en ciblant l'enzyme FabI, une énoyl-[acyl-carrier-protein] réductase à NADH catalysant l'étape finale de l'élongation de la chaîne des acides gras en réduisant l'énoyl-ACP en acyl-ACP (Debiopharm TM , 2022 ; Wittke Frederick et al., 2020)	Afabicine (Debio 1450) = prodrogue de la desphosphono-afabicine	—	—	- Infections bactériennes aiguës de la peau et des structures cutanées

— : non testé ou non étudié

Ainsi, les infections dues aux SARM sont difficiles à éradiquer car ces souches sont souvent multirésistantes et l'efficacité des antibiotiques conventionnels pourrait vraisemblablement être compromise (Rukavina et al., 2018). À ce problème de résistance s'ajoute la capacité des souches de SARM à former des biofilms sur des surfaces biotiques et abiotiques (Cascioferro et al., 2021). Ils sont, en effet, responsables de plus de 80% des infections bactériennes et considérés comme étant la cause principale des infections chroniques graves en milieu hospitalier de par leur formation sur les cathéters, les prothèses articulaires, les valves mécaniques et les implants (Balaure et Grumezescu, 2020 ; ECDC, 2018 ; Kwiecinski et al., 2019 ; Lebeaux et al., 2013). Contrairement à la forme planctonique, les biofilms de SARM sont plus résistants aux antibiotiques, aux défenses immunitaires de l'hôte, aux désinfectants et au stress environnemental (Lebeaux et al., 2013 ; Penesyan et al., 2015). Cette résistance est due à de nombreux facteurs : la matrice extracellulaire de mucopolysaccharides qui limite l'entrée des antibiotiques et la présence des cellules bactériennes métaboliquement inactives et intrinsèquement résistantes aux antibiotiques au niveau des couches les plus profondes du biofilm (Cascioferro et al., 2021 ; Kwon et al., 2008 ; Vermote et al., 2017). De plus, la proximité des cellules bactériennes au sein du biofilm favorise le transfert génétique horizontal, la conjugaison et la mobilisation des gènes de résistance aux antimicrobiens (Cascioferro et al., 2021). Au cours de la dernière décennie, de nombreux efforts ont été déployés pour identifier de nouveaux agents actifs capables d'interférer avec le cycle de vie du biofilm formé par des souches de *Staphylococcus aureus*. Les mécanismes identifiés sont notamment l'inhibition de la formation du biofilm en interférant à l'étape de l'adhésion bactérienne ou la perturbation des biofilms préformés en dissolvant l'architecture de leur matrice. En outre, certains agents anti-biofilm ont montré leur capacité à tuer les cellules persistantes des couches les plus profondes du biofilm et ainsi de l'éradiquer. La plupart des études menées *in vitro* ont montré des résultats assez intéressants à l'égard du potentiel anti-biofilm des composés étudiés. Cependant, aucun de ces composés n'a atteint le stade des essais cliniques (Carbone et al., 2018 ; Cascioferro et al., 2020, 2019 ; Kayumov et al., 2015 ; Noviello et al., 2018 ; Parrino et al., 2019 ; Sommer et al., 2019).

Face au phénomène accru de la résistance aux antibiotiques au niveau mondial qui ne semble pas faiblir, une seconde partie de ce projet de thèse propose d'étudier *in vitro* le potentiel antibactérien des 3 espèces de *Juncus* sélectionnées contre plusieurs pathogènes humains (levures, bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif) avec un accent porté aux souches de *Staphylococcus aureus* résistantes et sensibles à la méticilline. La méthodologie du

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique : Résistance aux antibiotiques

fractionnement bioguidé a été adoptée tout au long de cette partie dans le but d'identifier et d'isoler la ou les molécules responsable(s) de l'activité étudiée. Ce travail a été réalisé en collaboration avec notre regrettée collègue, le Dr Christel Neut, et son équipe (Inserm U1286 Infinite, Université de Lille).

3. Données botaniques et phytochimiques liées au genre *Juncus*

3.1. Description botanique du genre *Juncus*

La famille des Juncaceae comportent de 400 à 500 espèces selon les sources, réparties en 8 genres dont les plus importants sont *Juncus* et *Luzula* (www.worldfloraonline.org). Les 6 autres genres ne renferment que 18 espèces. Les deux genres, *Juncus* et *Luzula*, sont facilement distinguables en se basant sur l'aspect de leurs feuilles ainsi que sur le nombre de loges et de graines présentes dans les fruits secs de type capsule (Cuénod et al., 1954 ; Lambinon and Verloove, 2015 ; Tison and De Foucault, 2014). En effet, le genre *Juncus* est caractérisé par la présence de feuilles glabres, cylindriques ou linéaires-canaliculées ou réduites à des gaines. Par opposition, les feuilles du genre *Luzula* sont munies de longs poils au moins à la gorge. Elles sont également planes et graminiformes. Quant aux capsules, elles se composent de 3 loges et produisent de nombreuses graines dans le cas du *Juncus* ; elles sont uniloculaires et renferment 3 graines dans le cas de *Luzula*. Les plantes du genre *Juncus* sont des plantes herbacées vivaces, plus rarement annuelles, à rhizomes souvent sympodiaux avec des pousses chaumes généralement minces, non ramifiées et sans nœuds (Mansour et al., 1986). Elles se développent généralement sous formes de touffes et leur croissance est considérée plus au moins lente.

D'un point de vue étymologique, le mot *Juncus* vient du Latin *jungere* qui signifie « attacher ou lier » ; les tiges de certaines de ces espèces sont en effet utilisées pour faire des cordes (Johnson and Smith, 1972).

3.2. Répartition géographique et écologie du genre *Juncus*

Les espèces du genre *Juncus* prospèrent au bord des étangs, des tourbières, des marais salés, des sols mal drainés ainsi que des zones basses et humides. Elles préfèrent les sols humides engorgés d'eau tout au long de l'année et riches en chlorures, notamment en NaCl, et en carbonates alcalins (Fernández, 1982). Leur répartition est plutôt cosmopolite car on trouve des espèces dans le monde entier mais elles sont plus rares en zones tropicales. La plupart des espèces du genre *Juncus* sont des plantes héliophytes halotolérantes, c'est-à-dire des espèces hygrophiles, dont les bases des tiges sont le plus souvent non immergées, qui tolèrent d'importantes variations de la teneur en sel de l'eau. Cependant, certaines espèces sont des halophytes strictes. Bien que la définition des halophytes soit encore discutée, ces plantes sont

souvent considérées comme ayant la capacité de survivre dans des environnements très salins avec des concentrations en NaCl autour de 85 mM ou plus (jusqu'à 2 M dans le cas d'espèces du genre *Tecticornia*) (Chapman, 1942 ; Cheeseman, 2015 ; Merchaoui et al., 2022 ; Santos et al., 2016).

3.3. Botanique et répartition des espèces du genre *Juncus* étudiées

3.3.1. *Juncus acutus* L.

L'espèce *J. acutus* L., communément appelée aussi jonc aigu ou jonc piquant, est une plante vivace qui pousse en touffes très denses, presque hémisphériques, caractérisées par une couleur vert foncé. Ses rhizomes sont courts, robustes et fibreux. Ses tiges, pourvues d'écailles à la base, sont nombreuses, nues, dures, cylindriques, piquantes et mesurent 50 à 80 cm de longueur mais peuvent parfois atteindre 2 m (Boscaiu et al., 2011). Elles sont un peu plus grosses, plus foncées et plus courtes que celles de *J. maritimus*. Les inflorescences en panicules sont pseudo-latérales, denses et compactes. Les bractées involucrales à limbe cylindrique sont spathiformes à la base, piquantes et ont des longueurs variables (2-20 cm) (**Figure 8**). Le périanthe, verdâtre à divisions internes, a une forme ovale-obtuse. Les capsules mûres mesurent normalement moins de 4 mm et plus de 1,5 fois le péricône. Les graines sont appendiculées aux deux extrémités (Cuénod et al., 1954 ; Tison and De Foucault, 2014).

J. acutus existent sous deux sous-espèces : *J. acutus* subsp. *acutus* et *J. acutus* subsp. *leopoldii* (Parl.) Snogerup. La sous-espèce *acutus*, présente en France et récoltée dans le cadre de notre étude, s'oppose à la sous-espèce *leopoldii* africaine, macaronésienne et américaine. Par simplification, nous avons utilisé uniquement l'espèce *J. acutus* dans le cadre de notre étude, sous-entendu la sous-espèce *acutus*. *J. acutus* est présente sur tout le littoral français sauf en mer du Nord et à l'Est de la Manche (Tison and De Foucault, 2014).

Dans leur livre « Flore analytique et synoptique de la Tunisie: Cryptogames vasculaires gymnospermes et monocotylédones », Cuénod et al., 1954 ont mentionné que la croissance végétative de *J. acutus* s'étend de décembre à mars, tandis que la floraison et la nouaison ont lieu entre avril et juin. Cependant, la floraison de *J. acutus* semble varier selon l'endroit géographique, les caractéristiques météorologiques et climatiques et les caractéristiques du sol, nous retrouvons ainsi dans la littérature d'autres périodes de floraison :

- de mai à juillet en France (www.tela-botanica.org)
- début juin jusqu'à début juillet en Angleterre (Jones and Richards, 1954)
- entre les mois de mai et juin dans la région nord-méditerranéenne (Montpellier) (Rikli, 1943)
- d'avril à juillet en Afrique du Nord-Ouest (Rikli, 1943)

L'aire de répartition de *J. acutus* est vaste. En revanche, dans des conditions d'inondation et d'humidité édaphique, cette espèce semble être moins tolérante au sel et moins compétitive en comparaison avec l'espèce *J. maritimus*. Elle tolère les sols à forte teneur en sulfates et en chlorures (Rivas Goday 1945), les sols à texture sableuse et le stress hydrique qui survient dans les régions méditerranéennes durant la saison sèche en été. En outre, *J. acutus* peut apparaître avec certaines communautés de *Juncetea maritima* (Bolós, 1967). Il pousse fréquemment sur les dunes dans les zones d'estuaires (Fernández, 1982) et dans les eaux des marais salés. En France, on la trouve principalement dans les prairies maritimes et hygrophiles intradunaires (Tison and De Foucault, 2014). *J. acutus* est également utilisé pour lutter contre l'érosion. Dans certains pays comme l'Australie, cette espèce est considérée comme une espèce envahissante (Victorian Ressources Online Statewide). Elle se trouve en Europe (Angleterre, Crète, Espagne, France), en Asie, en Afrique (Tunisie) (Syranidou et al., 2017) ainsi qu'en Amérique (www.tela-botanica.org).



Figure 8. *Juncus acutus* L. (A) dans son habitat, (B) tige piquante avec inflorescences (Sysbio_base de données de systématique_univ-lille1)

3.3.2. *Juncus inflexus* L.

J. inflexus L. 1753 appelé aussi jonc glauque ou jonc arqué, jonc courbé ou jonc des jardiniers est une plante qui tend à pousser en monoculture de touffes denses. Elle possède des rhizomes traçants et des tiges qui ont une longueur entre 40 à 80 cm et 50 à 120 cm respectivement (Cuénod et al., 1954 ; Tóth, 2016). De plus, ses tiges de couleur gris-verdâtre sont raides, nues, glauques, fortement striées, difficilement brisables et à moelle interrompue par des lacunes. *J. inflexus* ne possède que des feuilles basales, réduites et mesurant entre 4 à 10 cm. Elles sont couvertes d'une gaine foliaire inférieure d'un pourpre noir luisant. Les inflorescences en panicules sont pseudo-latérales, rameuses, lâche et à rameaux inégaux. Les segments du périanthe, mesurant entre 2,5 à 4 mm, ont une couleur verdâtre. Ils sont à divisions lancéolées, très aigues et subulées. Les capsules, ayant presque la même longueur que le périanthe, sont mucronées, apiculées et caractérisées par une couleur brune-noirâtre brillante. Leur forme varie du trigonale-ovoïde à trigonale ellipsoïde. Les graines brunes, obliquement ovoïdes et réticulées mesurent 0,5 mm (**Figure 9**). La floraison de *J. inflexus* en France s'étend de juin à août (Lambinon and Verloove, 2015 ; Tison and De Foucault, 2014).

J. inflexus est une espèce sensible à la salinité ; elle est donc glycophyte, Elle tolère légèrement la salinité. De plus, elle est considérée comme indicateur de sites humides. On la retrouve dans des prairies humides, principalement sur des sols argileux et piétinés, fossés, bord des chemins dans les sites mouilleux, sur des substrats non fortement acides (Lambinon and Verloove, 2015). Cette dernière est présente dans toute l'Europe (Angleterre, Crète, France et Europe centrale) (Syranidou et al., 2017) ainsi qu'en Afrique du Nord et en Asie.

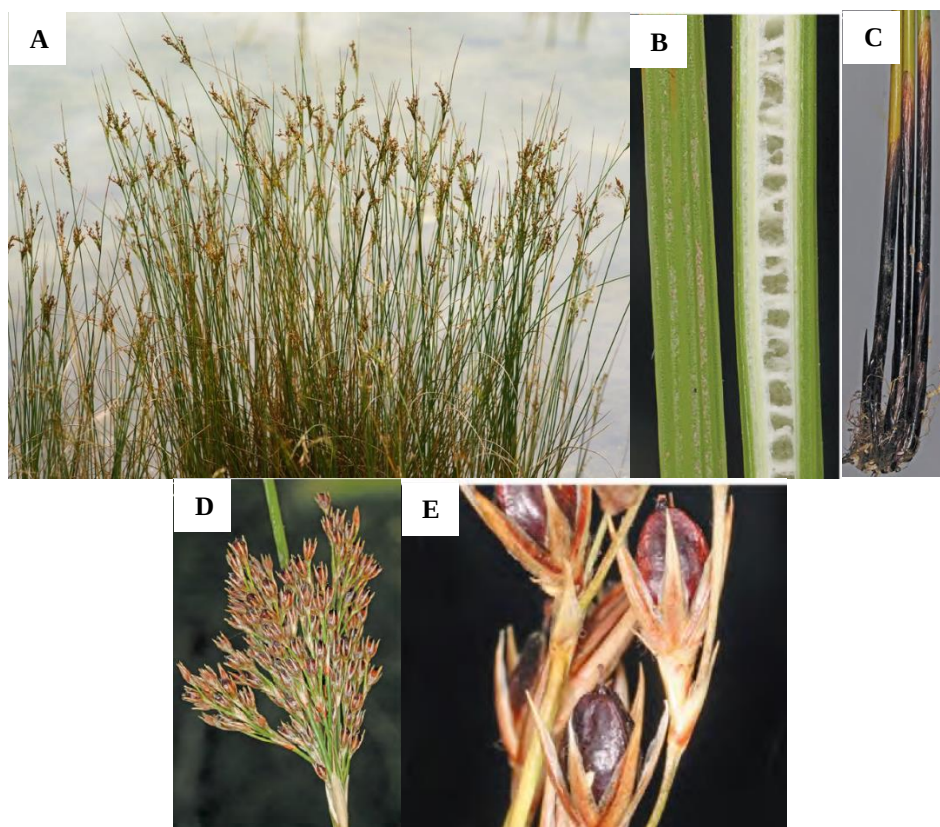


Figure 9. *Juncus inflexus* L. (A) dans son habitat, (B) moelle interrompue et tige striée, (C) gaine basale foncée, (D) inflorescences, (E) capsules et tépales (Bodmin et al., 2015 ; www.orchid-nord.com)

3.3.3. *Juncus maritimus* Lam.

J. maritimus Lam., est une plante vivace qui atteint 1 mètre de hauteur. Elle se distingue par ses rhizomes traçants qui émettent des tiges parallèles, longues et rectilignes. Les tiges sont toutes radicales, dures, glauques, nues dans le bas, les feuilles y étant réduites à leur gaine. Les tiges sont toutefois feuillées dans le haut, où les feuilles possèdent un limbe développé un peu piquant au sommet. Les inflorescences de *J. maritimus* sont pseudo-latérales, rameuses et lâches avec une longueur pouvant dépasser les 20 cm. On observe également une bractée inférieure dressée, un peu plus courte à un peu plus longue que l'inflorescence, également piquante au sommet. Le périanthe, quant à lui, est d'une couleur jaune verdâtre et à divisions lancéolées. Les pétales sont subaigus et ont la même longueur que le périanthe. Les graines sont pourvues d'un appendice blanchâtre (Cuénod et al., 1954 ; Lambinon and Verloove, 2015 ; Tison and De Foucault, 2014) (**Figure 10**).

Selon Cuénod et al., 1954, la croissance végétative de *J. maritimus* s'étend de décembre à mars, tandis que la floraison et la nouaison ont lieu entre juillet et novembre en Tunisie. En France,

la floraison a lieu entre juin et septembre (Larroque and Favennec, 2016 ; www.tela-botanica.org et www.orchid-nord.com).

La distribution de *J. maritimus* est qualifiée de paléotempérée-méditerranéenne. Il se trouve souvent dans les zones marécageuses côtières soumises à des inondations temporaires, notamment en Europe centrale durant le printemps (Woodell, 1985) et dans la région méditerranéenne durant l'automne et le printemps (Boira, 1988). L'espèce se trouve sur tout le littoral français, dans les prairies maritimes et hygrophiles intradunaires. On peut la retrouver dans les zones inondées lors des plus fortes marées (Lambinon and Verloove, 2015 ; Tison and De Foucault, 2014). La plante se trouve également en abondance dans les zones côtières et dans les prés salés et les sebkhas en Tunisie (Sahli, 2017). *J. maritimus* est une espèce méso- à polyhaline qui tolère bien la salinité (Boira, 1988), elle peut pousser dans des sols contenant des concentrations élevées en sel comme les communautés halophytes méditerranéennes du genre *Arthrocnemum* (Böhling, 2004 ; Boscaiu et al., 2011 ; Hill et al., 1999 ; Syranidou et al., 2017). Elle se trouve aussi en Asie et en Amérique.



Figure 10. *Juncus maritimus* Lam. (A) dans son habitat, (B) inflorescences, (C) rhizomes avec tiges parallèles, (D) tiges pleines dressées et raides (www.orchid-nord.com)

3.4. Utilisations traditionnelles des espèces du genre *Juncus*

3.4.1. Usages thérapeutiques traditionnels

Les espèces du genre *Juncus* sont connues pour avoir diverses vertus thérapeutiques en médecine traditionnelle. *Juncus effusus* est très utilisé traditionnellement en Chine pour lutter contre la fatigue, l'insomnie, les problèmes de miction douloureuse et les ulcères de la bouche et de la langue. Ce jonc est également utilisé en Chine et au Japon pour ses propriétés sédatives, antipyrétiques et antiphlogistiques (Hanawa et al., 2002 ; Miles et al., 1977 ; Shima et al., 1991). D'ailleurs, sa partie médullaire est inscrite à la pharmacopée chinoise (Chinese Pharmacopoeia Commission, 2005 ; Editorial Committee of Chinese Herbal Medicine, 1999). *J. effusus* est également utilisé pour le traitement de certaines maladies, notamment la pharyngite, l'aphte et les hémorragies traumatiques (Ma et al., 2016).

D'autres espèces de *Juncus* sont également reconnues traditionnellement médicinales. Les graines de *J. rigidus* sont consommées en Egypte pour traiter les diarrhées et les troubles diurétiques (Mahmoud and Sanjay, 2013). Les tiges de *J. conglomeratus*, *J. effusus* et *J. inflexus* ont été utilisées comme verrucides et pour soigner d'autres maladies de la peau dans la région de Gorbeialdea en province d'Alava en Espagne (Menendez-Baceta et al., 2015, 2014). L'usage de la décoction des graines de *J. acutus* et de *J. maritimus*, en association avec les stigmates de maïs, les fleurs de figuier de barbarie et les rhizomes de chiendent, a été également rapporté dans la région de Zaër au Maroc. Cette préparation est utilisée comme agent diurétique mais aussi pour soigner l'oligurie et les calculs rénaux. Les graines de *J. maritimus* sont également employées pour soulager les maux d'estomac et les troubles hépatiques. La prise d'infusion de fruits de *J. acutus* avec les graines d'orge a été également rapportée efficace contre le rhume (Bellakhdar, 1997, 1978 ; Lahsissene et al., 2009). Les fleurs de *J. maritimus* sont recommandées dans la médecine traditionnelle tunisienne pour soulager les hémorroïdes et pour traiter la blennorragie (Boukef, 1986). Ses rhizomes sont employés pour traiter les insomnies (Ouarghidi et al., 2013). L'utilisation de ses feuilles en cataplasme a été mentionné par (Lakhdari et al., 2016).

3.4.2. Autres utilisations traditionnelles

Les pousses précoces de *J. balticus* et *J. effusus* ainsi que les racines de *J. ensifolius* étaient parfois consommées sous plusieurs formes (crues, rôties et bouillies) par les populations

indigènes du Canada et des États-Unis pour leurs apports nutritifs (Gunther, 1973 ; Kuhnlein and Turner, 1991 ; Strike, 1994). Les tiges blanches et tendres des *Juncus* ont été également consommées crues par les populations habitant les campagnes du Maroc durant les périodes de disette (Bellakhdar, 1997). L'espèce *J. effusus* sert de pâturage pour le bétail aux États-Unis (Stevens, 2000). De plus, les plantes du genre *Juncus* sont d'une grande importance économique. En effet, elles ont été utilisées depuis la période néolithique pour le tressage des nattes, des matelas, des sandales et des paniers dans toute l'Afrique ainsi qu'en Amérique du Sud (Macía, 2001 ; Sen and Rajpurohit, 1982 ; Traynor, 2008). Dans l'Égypte ancienne, les chaumes de *J. rigidus* ont été utilisés en tant qu'outil d'écriture. Les tiges de *J. rigidus* sont également utilisées au Tibesti, une région du Tchad, pour la fabrication des brosses et des tamis (Brink and Achigan-Dako, 2012). Les chaumes de *J. acutus* et *J. rigidus* sont également valorisés par l'industrie papetière (Abd El-Sayed, 2004 ; Boyko, 1966 ; Traynor, 2008 ; Zahran et al., 1993). En effet, l'étude de Singh et al., 2019 a montré que *J. rigidus* pouvait être une source potentielle de cellulose ; les rendements respectifs en cellulose (44%) et α -cellulose (33%) ont été déterminés. Le potentiel des espèces de *Juncus* en phytoremédiation a été souligné dans plusieurs travaux (Almeida et al., 2006, 2004 ; Nunes da Silva et al., 2014 ; Syranidou et al., 2017). En effet, ces espèces sont capables d'accumuler des métaux lourds au niveau de leurs rhizomes et d'empêcher leur translocation vers les parties aériennes par le biais de différents mécanismes métaux-dépendants. L'exploitation des *Juncus* dans les stations d'épuration traitant les déchets industriels, les eaux d'exhaure et les eaux de ruissellement urbaines a été largement étudiée (Coleman et al., 2001 ; Khan et al., 2009 ; Ladislav et al., 2013 ; Menon and Holland, 2013 ; Miguel et al., 2013 ; Syranidou et al., 2017). Les *Juncus* sont aussi utilisés pour contrôler le phénomène d'érosion (Stevens, 2000).

3.5. Métabolites spécialisés des espèces du genre *Juncus*

Les profils phytochimiques du genre *Juncus* ont été largement décrits (Bús et al., 2018b ; Elshamy et al., 2012 ; Kovács et al., 2008). Ces espèces synthétisent de nombreux métabolites spécialisés : des flavonoïdes, des coumarines, des terpènes de type cycloartane, des stérols, des acides phénoliques, des stilbènes, des caroténoïdes, ainsi que des dérivés phénanthréniques caractéristiques du genre *Juncus*. Ces composés sont d'ailleurs responsables de la plupart des activités biologiques mises en évidence dans la littérature.

3.5.1. Dérivés phénanthréniques

Les dérivés phénanthréniques sont considérés comme une classe de composés aromatiques assez rare dans la nature. Ils sont synthétisés par quelques familles botaniques issues des Embryophytes, depuis les Marchantophytes (Hepaticae) jusqu'aux Angiospermes incluant des monocotylédones (Juncaceae, Orchidaceae, Dioscoreaceae) et des dicotylédones (Betulaceae et Combretaceae). Les dérivés phénanthréniques isolés des espèces de *Juncus* ont une particularité structurale qui les distingue ; il s'agit de la présence du groupe vinyle en C-5 sur le squelette phénanthrénique. Ils sont ainsi considérés comme des marqueurs chimiotaxonomiques du genre *Juncus*. Des substitutions par des groupes hydroxyle, méthyle ou vinyle sont souvent présents en C-5, C-6 ou C-8 (Bús et al., 2018b ; Li et al., 2022 ; Vasas, 2020).

Deux principales hypothèses ont été établies quant aux voies de biosynthèse des dérivés phénanthréniques : la première suggère que leur formation est le résultat du couplage oxydatif des noyaux aromatiques des précurseurs du stilbène, et la deuxième suggère que les dérivés phénanthréniques proviennent d'un précurseur des diterpènes (Fritzsche and Kindl, 1983 ; Kovács et al., 2008 ; Morgan et al., 1970). Une étude allemande des années 70 a postulé que les alcaloïdes de la morphine pouvaient aussi être des précurseurs biosynthétiques des dérivés phénanthréniques (Reisch et al., 1974).

Les dérivés phénanthréniques sont divisés en trois groupes principaux : les mono-, di- et triphénanthrènes. Les monophénanthrènes représentent la forme la plus abondante dans la nature. Ils sont classifiés, en fonction de la saturation de la liaison existante entre le C-9 et le C-10 : on parle de dehydrophénanthrènes si cette double liaison est présente et de phénanthrènes lorsqu'elle n'existe pas (**Figure 11**). Leur grande diversité structurale est liée aux nombres (3 à 6) et aux positions (C-2, C-3, C-5, C-6, C-7) des groupements hydroxyle et méthoxyle pouvant être présents sur les cycles A et C. D'une manière générale, les substitutions en C-9 et C-10 peuvent parfois exister sur les structures des composés phénanthréniques mais elles sont très rares. D'ailleurs, aucune de ces substitutions n'a été signalée dans la famille des Juncaceae. De la même façon, les composés phénanthréniques monosubstitués sont moins fréquents dans la nature mais certains ont été identifiés dans la famille des Orchidaceae (Bruneton, 2016 ; Bús et al., 2018b ; Kovács et al., 2008). En complément des substitutions hydroxyle et méthoxyle, d'autres substitutions peuvent être observées dans les structures des monophénanthrènes par des groupements méthyle, hydroxyméthyle, carboxyle, formyle, prényle (Kovács et al., 2008). Les monophénanthrènes peuvent également exister sous leur forme hétérosidique mais c'est

relativement rare d'en trouver. Seulement 5 phénanthrènes glycosylés ont été décrits à partir de l'espèce *J. effusus* ; il s'agit des effusides I–V (Della Greca et al., 1995). Les phénanthrènequinones sont aussi des monophénanthrènes (**Figure 11**). Jusqu'à présent, 19 composés de ce groupe ont été isolés à partir des espèces appartenant majoritairement à la famille des Orchidaceae, mais également à la famille des Dioscoreaceae et des Lamiaceae.

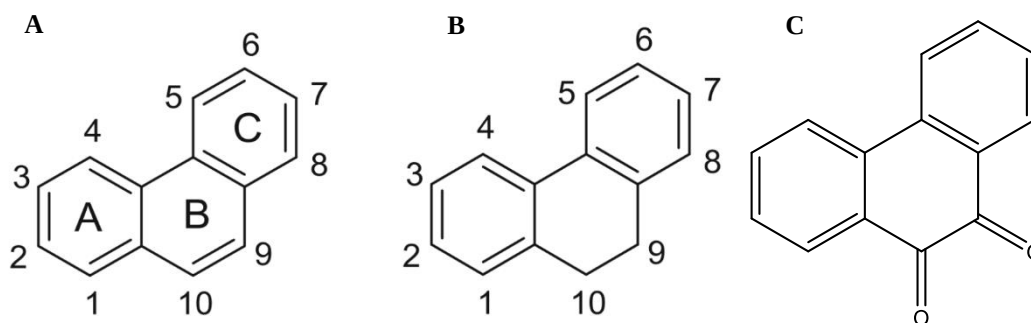
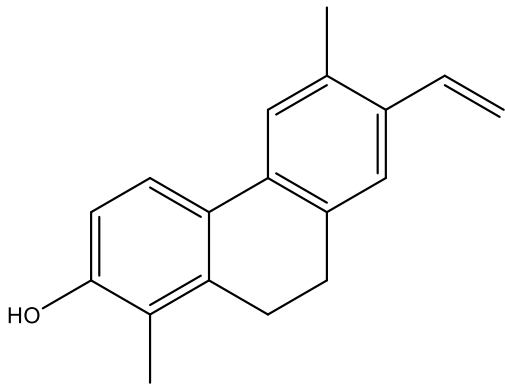
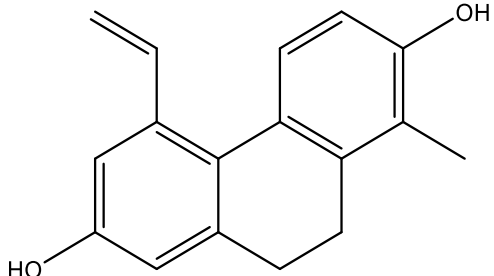
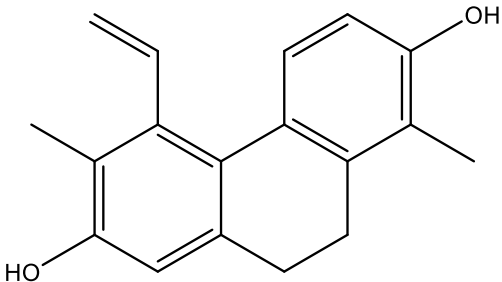
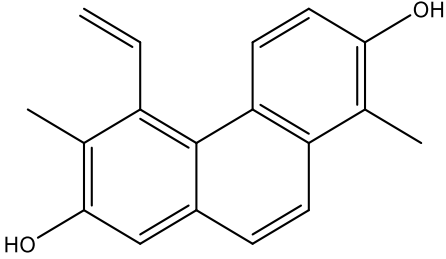


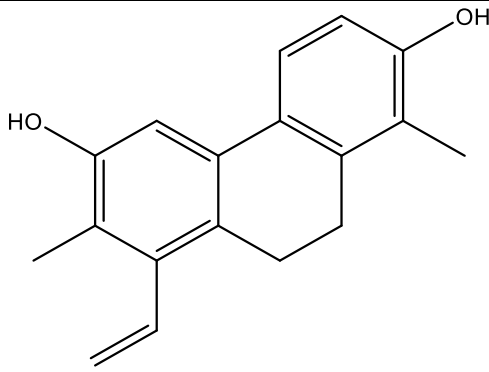
Figure 11. Structure commune des monophénanthrènes : (A) dehydrophénanthrène, (B) phénanthrène et (C) 9,10-phénanthrènequinone (Bús et al., 2018b)

Selon les données de la littérature, plus de 67 composés phénanthréniques ont été isolés à partir des différentes espèces du genre *Juncus*, notamment à partir de *J. acutus*, *J. effusus*, *J. inflexus*, *J. maritimus*, *J. roemerianus*, *J. setchuensis*, *J. subulatus*, et de certaines espèces du genre *Luzula*. Parmi ces derniers, on compte 43 composés sous la forme dehydrophénanthrène (Li et al., 2022). Toutefois, l'espèce de *J. effusus* qui est l'espèce emblématique de la pharmacopée chinoise, demeure la source la plus riche en composés phénanthréniques. Elle a fait l'objet de nombreuses études approfondies au cours des 10 dernières années. À ce jour, 58 composés phénanthréniques ont été isolés à partir de cette dernière (partie médullaire, rhizomes et plante entière). À un moindre degré en terme de nombres de composés phénanthréniques isolés, nous retrouvons l'espèce *J. acutus* avec 41 composés phénanthréniques isolés (Bús et al., 2018b). Les composés phénanthréniques les plus couramment retrouvés dans le genre *Juncus* sont le juncunol, l'effusol, la juncuénine B, le juncusol et le dehydrojuncusol (**Tableau 2**).

Tableau 2. Composés phénanthréniques couramment retrouvés dans les espèces du genre *Juncus*

Composé	Espèces	Références
 Juncunol	<i>J. acutus</i>	(Behery et al., 2013 ; DellaGreca et al., 2002a, 2004)
	<i>J. effusus</i>	(Della Greca et al., 1992 ; DellaGreca et al., 2001)
	<i>J. roemerianus</i>	(Sarkar et al., 1988)
	<i>J. subulatus</i>	(Abdel-Razik et al., 2009)
 Effusol	<i>J. acutus</i>	(DellaGreca et al., 2004, 2002a, 2002b)
	<i>J. effusus</i>	(Della Greca et al., 1992 ; DellaGreca et al., 2001 ; Ishiuchi et al., 2015a ; Ma et al., 2016 ; Mody et al., 1982 ; Wang et al., 2014, 2012)
	<i>J. maritimus</i>	(Sahli et al., 2018)
	<i>J. setchuensis</i>	(Sun et al., 2016 ; Wang et al., 2010)
	<i>J. subulatus</i>	(Abdel-Razik et al., 2009)
	<i>J. acutus</i>	(DellaGreca et al., 2004, 2002a, 2002b)
	<i>J. effusus</i>	(Behery et al., 2007 ; Della Greca et al., 1992 ; DellaGreca et al., 2001 ;

 Juncusol	<i>J. inflexus</i> <i>J. maritimus</i> <i>J. roemerianus</i> <i>J. setchuensis</i> <i>J. subulatus</i>	Ishiuchi et al., 2015b ; Ma et al., 2016 ; Mody et al., 1982 ; Wang et al., 2014, 2012) (Tóth et al., 2017, 2016) (Chapatwala et al., 1981 ; Miles et al., 1977 ; Sarkar et al., 1988) (Sahuc et al., 2019) (Sarkar et al., 1988) (Sun et al., 2016 ; Wang et al., 2010) (Abdel-Razik et al., 2009)
 Dehydrojuncusol	<i>J. acutus</i> <i>J. effusus</i> <i>J. inflexus</i> <i>J. maritimus</i> <i>J. roemerianus</i>	(Behery et al., 2007 ; DellaGreca et al., 2004, 2002a) (Ishiuchi et al., 2015b ; Ma et al., 2016 ; Shima et al., 1991 ; Wang et al., 2012) (Tóth et al., 2016) (Sahuc et al., 2019) (Sarkar et al., 1988)

 Juncuénine B	<i>J. effusus</i>	(Ishiuchi et al., 2015a ; Tóth et al., 2017, 2016)
	<i>J. inflexus</i>	(Tóth et al., 2016)
	<i>J. setchuensis</i>	(Wang et al., 2010, 2009)

Les monophénanthrènes peuvent se dimériser ou trimériser, le plus souvent par couplage C-C en position C-1-C-1' (**Figure 12**) pour former des di-ou des triphénanthrènes. Toutefois, d'autres liaisons peuvent exister dans la nature telles que les liaisons en C-1-C-3', C-1-C-8' et C-3-C-3' (effususine A (Ma et al., 2015)), C-7-C-7' (effususine C et effususine D (Ma et al., 2015)), C-8-C-3' (effususine B (Ma et al., 2015)), C-8-C-8' (8,8'-bidehydrojuncusol (Behery et al., 2013)) et C-8-C-11' (juncusine (Wang et al., 2014)) dans le cas des diphénanthrènes (Bús et al., 2018b). Selon Qi et al., (2020), des liaisons en C-6-C-8', C-3-C-5' et C-8-C-11' (juncusine (Wang et al., 2014)) sont également possibles. De plus, l'étude de Xiao et al., (2016) a rapporté l'isolement de 2 diphénanthrénoïdes à partir de l'extrait éthanolique de *J. effusus* qui présentaient des liaisons en C-14-C-3' et en C-14-C-8' pour la dijuncuénine A et la dijuncuénine B respectivement (**Tableau 3**). L'ensemble de ces études a souligné le fait que d'autres motifs de liaison sont possibles, ainsi de nouveaux diphénanthrènes pourraient se former. Il a été également signalé qu'en plus du couplage C-C, la dimérisation entre 2 monophénanthrènes peut se faire aussi via une structure carbonée en forme de cage avec une stéréochimie complexe. C'est en effet le cas de 7 phénanthrènes dimériques isolés à partir des rhizomes de *J. acutus* par l'équipe de DellaGreca (DellaGreca et al., 2002b, 2003b ; Dellagreca et al., 2005) (**Tableau 4**).

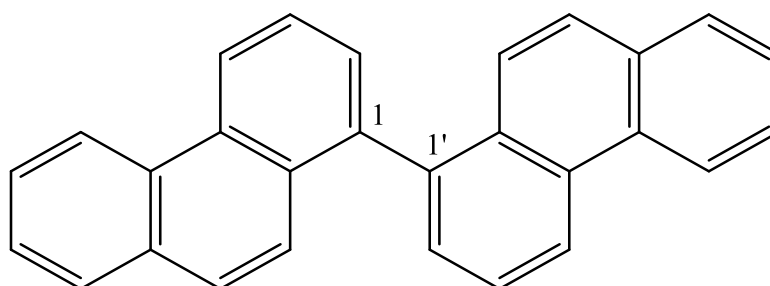
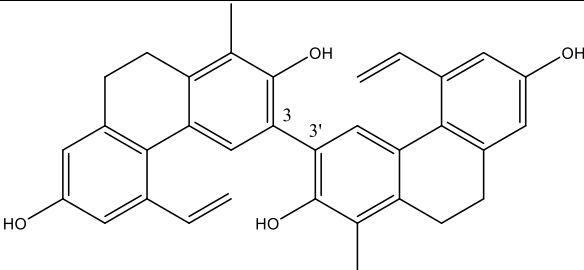
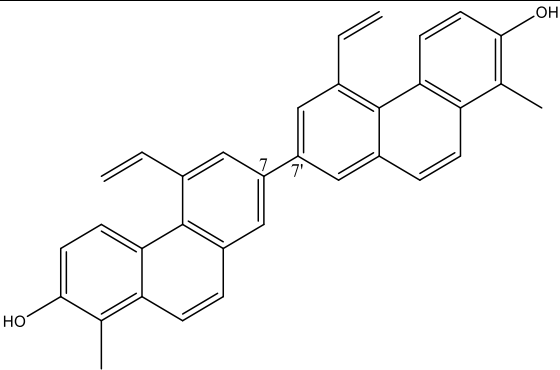
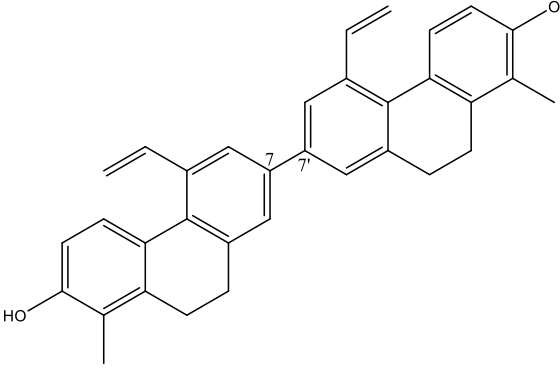


Figure 12. Structure de base des phénanthrènes dimériques connectés par une liaison en C-1-C-1' (Čáková, 2013)

L'occurrence des dérivés phénanthréniques sous la forme dimérique reste toutefois moins fréquente par rapport à la forme monomérique. À ce jour, seulement une quarantaine de ces composés a été identifiée principalement chez des plantes appartenant à la famille des Orchidaceae. Les phénanthrènes dimériques et trimériques sont souvent substitués par des groupements hydroxyle et méthoxyle (Kovács et al., 2008). Finalement, un seul triphénanthrène a été isolé à partir de l'extrait éthanolique de tubercules de *Cremastra appendiculata* (Orchidaceae) (Xue et al., 2006).

Tableau 3. Exemples de diphénanthrènes isolés à partir des espèces du genre *Juncus*

Couplage C-C	Composé	Espèces	Références
C-3-C-3'	 Effusine A	<i>J. effusus</i>	(Ma et al., 2015)
C-7-C-7'	 Effusine C	<i>J. effusus</i>	(Ma et al., 2015)
	 Effusine D	<i>J. effusus</i>	(Ma et al., 2015)
		<i>J. effusus</i>	(Ma et al., 2015)

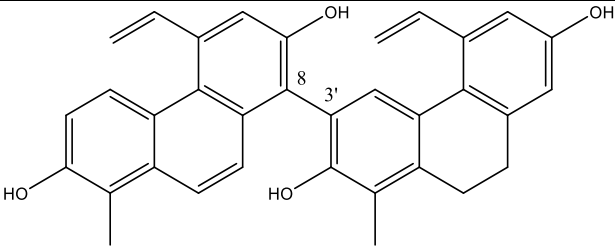
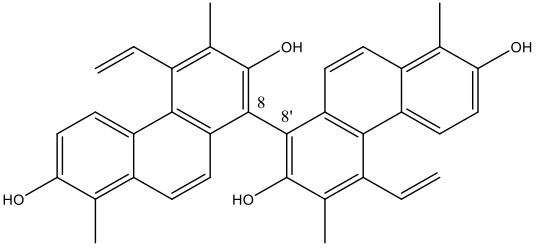
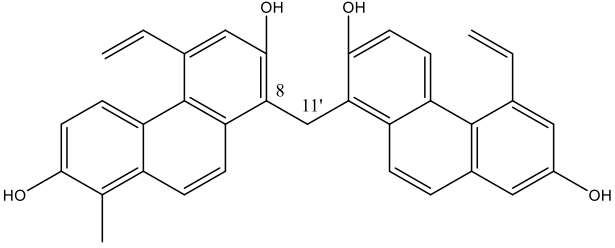
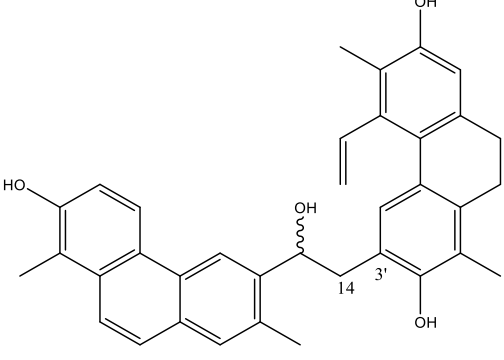
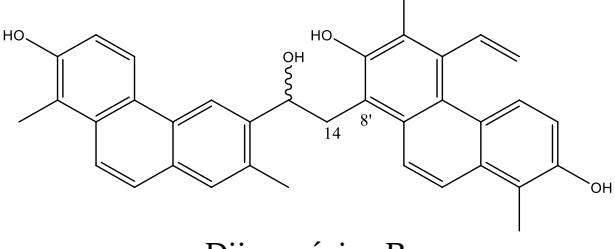
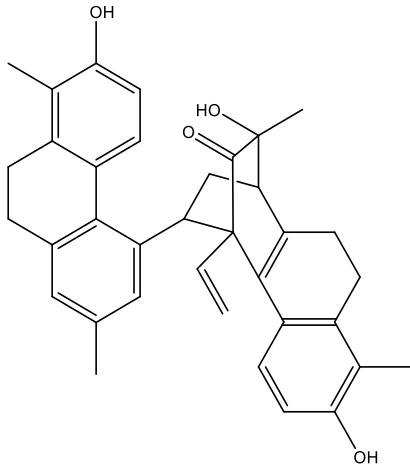
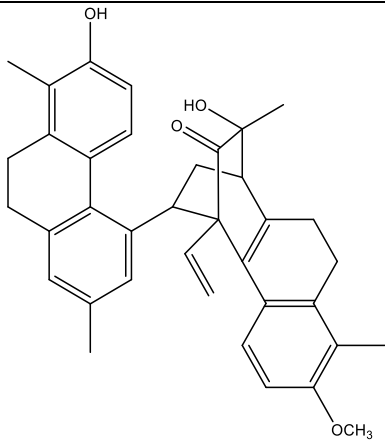
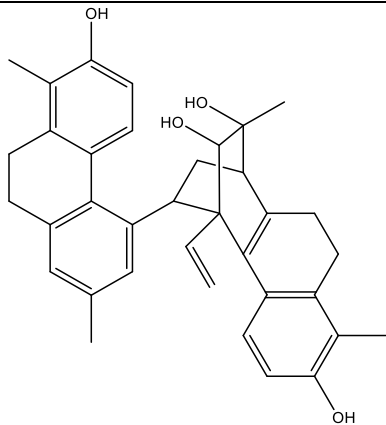
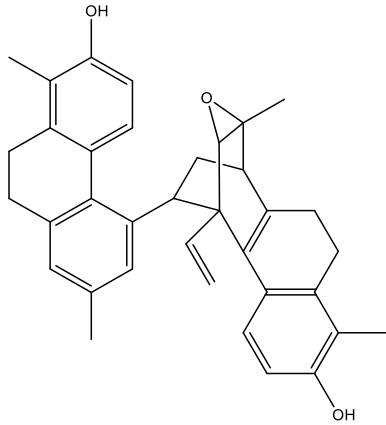
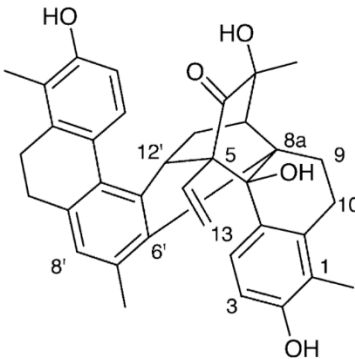
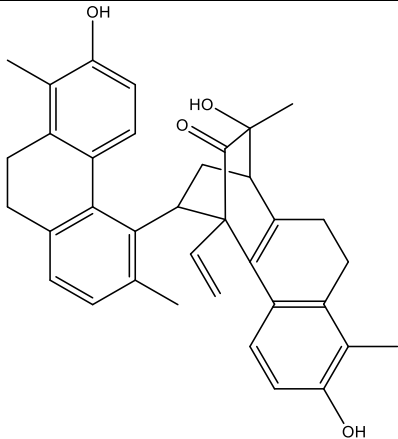
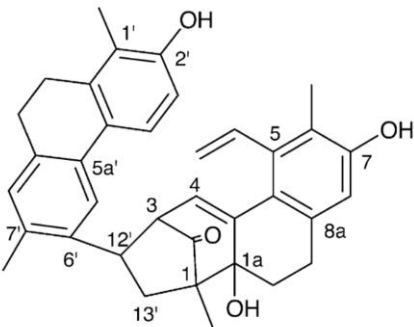
C-8-C-3'	 Effusine B		
C-8-C-8'	 8,8'-Bidehydrojuncusol	<i>J. acutus</i>	(Behery et al., 2013)
C-8-C-11'	 Juncusine	<i>J. effusus</i>	(Wang et al., 2014)
C-14-C-3'	 Dijuncuénine A	<i>J. effusus</i>	(Xiao et al., 2016)
C-14-C-8'	 Dijuncuénine B	<i>J. effusus</i>	(Xiao et al., 2016)

Tableau 4. Diphénanthrènes de structure complexe isolés à partir des espèces du genre *Juncus*

Composé	Espèce	Références
 (1R,3S,4S,12R)-7,12-dihydroxy-3-(7-hydroxy-2,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-4-yl)-8,12-diméthyl-4-vinyl-1,2,3,4,9,10-hexahydro-1,4-ethanophénanthrène-11-one	<i>J. acutus</i>	(DellaGreca et al., 2002b, 2003b)
 (1R,3S,4S,12R)-12-hydroxy-3-(7-hydroxy-2,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-4-yl) 7-methoxy-8,12-diméthyl-4-vinyl-1,2,3,4,9,10-hexahydro-1,4-ethanophénanthrène-11-one	<i>J. acutus</i>	(DellaGreca et al., 2002b)

 (1R,3S,4S,11S,12R)-3-(7-hydroxy-2,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-4-yl)-8,12-diméthyl-4-vinyl-1,2,3,4,9,10-hexahydro-1,4-ethanophénanthrène-7,11,12-triol	<i>J. acutus</i>	(Dellagreca et al., 2005)
 (7R,7R,9S,10S)-10-(7-hydroxy-2,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-4-yl)-4,7a-diméthyl-9-vinyl-5,6,7,7a,8a,9-hexahydro-9,7-ethanophénanthro[2,3-b]oxiren-3-ol	<i>J. acutus</i>	(Dellagreca et al., 2005)
 3,12,16a,18-tetrahydroxy-4,7,11,18-tetraméthyl-16-vinyl-5,9,10,15,16,16a-hexahydro-6H-15,6a,16-(epibutane[1,2,4]triyl)benzo[a]picen-17-one	<i>J. acutus</i>	(DellaGreca et al., 2003b)

 (1R,3S,4S,12R)-7,12-dihydroxy-3-(7-hydroxy-3,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-4-yl)-8,12-diméthyl-4-vinyl-1,2,3,4,9,10-hexahydro-1,4-ethanophénanthrène-11-one	<i>J. acutus</i>	(DellaGreca et al., 2003b)
 3,6a-dihydroxy-9-(7-hydroxy-2,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-3-yl)-2,7-diméthyl-1-vinyl-6,6a,7,8,9,10-hexahydro-5H-7,10-methanocyclohepta[a]naphthalène-12-one	<i>J. acutus</i>	(DellaGreca et al., 2003b)

3.5.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments ubiquitaires dans le règne végétal et structurellement très variables. Certains ne sont pas visibles mais peuvent jouer le rôle de co-pigments. Ces molécules sont souvent impliquées dans le processus de protection des plantes contre le stress oxydatif, les herbivores et les attaques microbiennes et elles sont souvent responsables de l'activité antioxydante. Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement 2-phénylchromane (Bruneton, 2016). Leur structure est basée sur un squelette en C-6 – C-3 – C-6. On distingue 6 groupes majeurs en fonction de leur degré d'oxydation du pont en C3 : chalcones, flavanones

(hespérétine, naringénine), flavones (apigénine, lutéoline), flavonols (quercétine, kaempférol, myricétine), iso-flavanols et anthocyanidines. Les flavonoïdes ont été rarement isolés des espèces du genre *Juncus*. Les deux flavones, apigénine (Abdel-Mogib, 2001 (parties aériennes de *J. acutus*) ; Stefkó et al., 2019a (plante entière de *J. atratus*) et lutéoline (Abdel-Mogib, 2001 ; Abdel-Razik et al., 2009 (rhizomes de *J. subulatus*) ; Hakem et al., 2023 (tiges de *J. acutus*) ; Ishiuchi et al., 2015 (partie médullaire de *J. effusus*) ; Mansour et al., 1986 (parties aériennes de *J. rigidus* ; Shan et al., 2008 (*J. effusus*) ; Stefkó et al., 2019 (plante entière de *J. atratus*), ainsi que le flavonol, quercétine (Abdel-Razik et al., 2009 (rhizomes de *J. subulatus*) ; Jin Dong-Zhe et al., 1996 (partie médullaire de *J. effusus*) ; Mansour et al., 1986 (parties aériennes de *J. rigidus*)) sont ainsi les plus cités dans les espèces de *Juncus* (**Figure 13**). Les flavonoïdes sont présents sous leur forme libre, leurs formes *O*- ou *C*-glycosylées et glucuronidées, ainsi que sous des formes *O*- ou *C*-alkylées (Elshamy et al., 2012). Ils sont souvent présents au niveau des parties aériennes mais on peut les trouver au niveau des inflorescences, des tiges, de la partie médullaire ainsi qu'au niveau des rhizomes (Elshamy et al., 2012).

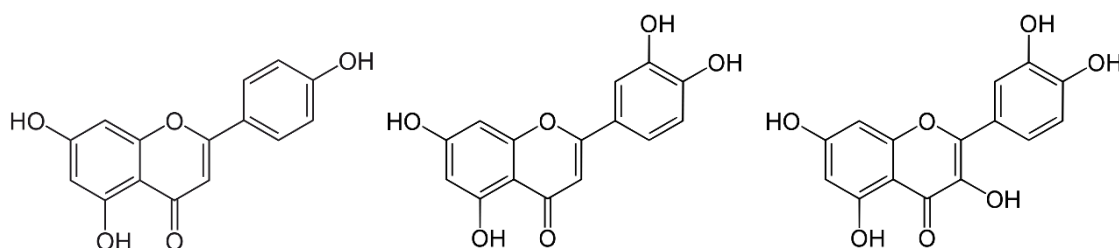


Figure 13. Structures chimiques des flavonoïdes majoritaires décrits dans les espèces de *Juncus* (A) apigénine, (B) lutéoline et (C) quercétine (Wikimedia Commons)

3.5.3. Les coumarines

Les coumarines sont des métabolites spécialisés largement présents dans de nombreuses familles botaniques. C'est une classe de composés phénoliques dérivant de la structure de base correspondant à la coumarine (2H-1-benzopyran-2-one). Elles sont considérées comme étant des lactones des acides 2-hydroxy-*Z*-cinnamiques. Sauf exceptions, toutes les coumarines sont substituées en C-7 par un hydroxyle. Elles sont issues du métabolisme de la phénylalanine via un acide cinnamique, l'acide 4-coumarique. Une hydroxylation en C-2 est une des spécificités de la biogénèse des coumarines simples (Bruneton, 2016). Des coumarines plus complexes existent telles les furanocoumarines, les pyranocoumarines et les coumarines substituées par

des pyrones. Pour les furanocoumarines et les pyranocoumarines, la prénylation en C-6 ou en C-8 d'une 7-hydroxycoumarine est à l'origine du cycle supplémentaire qui caractérise ce type de coumarines (Zou et al., 2023). La littérature mentionne peu la présence des coumarines dans les espèces du genre *Juncus*. En effet, seuls 7 dérivés de benzocoumarines ont été isolés de la fraction acétate d'éthyle des rhizomes de *J. acutus* (DellaGreca et al., 2003a)

3.5.4. Les stilbènes

La classe des stilbénoides a une parenté biogénétique avec les flavonoïdes. Ce sont des composés phénoliques qui possèdent deux noyaux benzéniques séparés par un pont éthane ou éthène, c'est-à-dire les bibenzyls et les stilbènes, ainsi que les produits qui leur sont biosynthétiquement rattachés, à savoir les phénanthrènes, les 9,10-dihydrophénanthrènes et les phényldihydroisocoumarines (Bruneton, 2016).

Les stilbènes dérivent de la voie des phénylpropanoïdes, et leur synthèse est initiée par une enzyme caractéristique des plantes productrices de stilbènes (la vigne, l'arachide...) : la stilbène synthase (Chong et al., 2009). Ils ont une structure en C-6 – C-2 – C-6 : deux cycles benzéniques sont reliés par deux carbones, eux-mêmes unis par une double liaison. Ils existent sous deux formes : *trans*-1,2-diphényléthylène (*E*-stilbène) et *cis*-1,2-diphényléthylène (*Z*-stilbène) ; la première étant la forme la plus courante dans la nature de par sa stabilité. Ils peuvent également être libres ou hétérosidiques, parfois polymériques.

Tout comme les flavonoïdes et les coumarines, les stilbènes sont très peu présents dans les plantes du genre *Juncus*. Les stilbènes identifiés dans la famille des Juncaceae sont principalement des dérivés du resvératrol, notamment l'oxyresvératrol 2-*O*- β -D-glucopyranoside et le resvératrol 3',4'-*O,O'*-di- β -D-glucopyranoside, isolés des parties aériennes de *J. acutus* et possédant une activité antieczématique (Awaad, 2006).

3.5.5. Les terpènes

Les terpènes constituent un très vaste ensemble de métabolites spécialisés chez les végétaux. Leur synthèse se fait à partir du précurseur, l'isopentényl-pyrophosphate (IPP) qui peut réagir avec le diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP), le géranyl-pyrophosphate (GPP) ou encore le géranylgéranyl-pyrophosphate (GGPP). En fonction du nombre d'unités isopréniques,

constituant leur squelette carboné, on distingue les monoterpènes ($C_{10}H_{16}$), les sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$), les diterpènes ($C_{20}H_{32}$), les triterpènes ($C_{30}H_{48}$) et les caroténoïdes en $C_{40}H_{64}$.

Peu de travaux décrivent l'identification de composés terpéniques dans la famille des Juncaceae. Des monoterpènes monocycliques incluant la β -ionone, le thymol, la pulégone et le camphre, ont été décrits dans l'huile essentielle de *J. roemerianus* collecté dans le golfe du Mississippi (Miles et al., 1973). Des esters de monoterpène, comme l'acétate de *p*-cymen-7-ol et l'acétate d' α -cyclogéraniol, ainsi que la *E*-ionone et le diterpène kaurène ont été également rapportés parmi les constituants volatils de l'huile essentielle de *J. subulatus* (Abdel-Razik et al., 2009). Le diterpène, effusenone A, a été décrit quant à lui dans les tiges de *J. effusus* (Yang et al., 2007). L'équipe de Corsaro et al., 1994 a mis en évidence la présence de 5 triterpènes glycéridés nommés Juncoside I–V dans l'espèce *J. effusus*. L'isolement de triterpènes de type cycloartane, à partir de l'extrait étheré (Et_2O) de *J. effusus*, a été reporté par l'équipe de Della Greca (Corsaro et al., 1994).

3.5.6. Les acides phénols

Les acides phénols sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et une fonction phénolique. Ils sont présents dans les plantes sous leur forme libre ou liée. Ils sont représentés par deux sous-classes, les acides hydroxybenzoïques avec une structure de base de type C-6 – C-1 et les acides hydroxycinnamiques ayant une structure de base de type C-6 – C-3 (Bruneton, 2016 ; Ignat et al., 2011). Leur biosynthèse passe principalement par les voies des shikimates et des phénylpropanoïdes à partir de deux acides aminés aromatiques, L-Phe et/ou L-Tyr, via 3 réactions clés : la désamination, l'hydroxylation et la méthylation (Al Jitan et al., 2018).

Dans leur article de revue sur le genre *Juncus*, Elshamy et al., 2012 ont rapporté la présence de plusieurs acides phénoliques dans la partie médullaire de *J. effusus* et dans les parties aériennes de *J. acutus*, incluant l'acide *p*-coumarique et certains de ses esters (Jin Dong-Zhe et al., 1996 ; Shima et al., 1991), l'acide vanillique, le méthyl-*p*-benzoate (Shan et al., 2008), le markhamioside F, le canthoside B et l'acide caféique-3'-*O*'-glucorhamnoside (Awaad, 2006).

3.6. Activités biologiques des dérivés phénanthréniques isolés du genre *Juncus*

Les composés phénanthréniques des Juncaceae présentent une diversité structurale. De par leur originalité, ils ont fait l'objet de nombreuses études s'intéressant particulièrement à leurs activités biologiques : antiproliférative, antimicrobienne, anti-inflammatoire, antioxydante, sédative, spasmolytique, anticholinestérase, antioxydant, etc. L'ensemble de ces activités ont été recensées et synthétisées dans trois articles de revue, ceux d'Elshamy et al., 2012 et de Bús et al., 2018 et plus récemment celui de Jiabin et al., 2020. Comme notre étude porte spécifiquement sur les activités antimicrobiennes de quelques espèces de *Juncus*, cette synthèse bibliographique s'attache uniquement à réaliser un état de l'art de ce type d'activités. Quelques données de cytotoxicité sont également apportées dans cette étude bibliographique.

3.6.1. Activités antimicrobiennes des composés phénanthréniques isolés chez le genre *Juncus*

3.6.1.1. Activités antibactériennes

Les études existantes portant sur l'activité antibactérienne de certaines espèces de *Juncus* (*J. effusus*, *J. roemerianus* et *J. inflexus*) et de leurs composés phénanthréniques (**Tableau 5**), ont mis en évidence l'absence d'effet sur des souches à Gram négatif telles qu'*Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas sp.* et *Escherichia coli* même aux concentrations les plus élevées. Ils se montrent par contre particulièrement actifs contre les souches bactériennes à Gram positif. Cet effet antibactérien suggère ainsi que les composés phénanthréniques sont capables d'inhiber un mécanisme d'action ou une réaction spécifique que l'on ne trouve que chez les micro-organismes à Gram positif. De plus, l'étude de Hanawa et al., 2002 a souligné que le potentiel antimicrobien du dehydroeffusol et du juncusol a été nettement amélioré en appliquant des irradiations UVA. En effet, l'activité antimicrobienne du dehydroeffusol contre *S. aureus* (résistant et sensible à la méticilline) est 16 fois plus importante en présence d'UVA.

Dans l'étude de l'équipe hongroise, Tóth et al., (2016), il a été montré que la jinflexine B, le juncusol, la juncuénine D et la dehydrojuncuénine B, composés phénanthréniques isolés à partir des rhizomes de *J. inflexus*, sont dotés d'une bonne activité antibactérienne contre des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline, en l'occurrence contre la souche SARM ATCC43300, avec des CMIs comprises entre 12,5 µg.mL⁻¹ et 100 µg.mL⁻¹. Dans la même étude, d'autres composés phénanthréniques : jinflexine A, jinflexine C, jinflexine D, juncuénine A, juncuénine B, dehydrojuncuénine A et dehydrojuncusol ont été testés mais ils n'ont pas montré d'activité antibactérienne contre la même souche.

En outre, les travaux de Zhao et al., (2018) ont souligné que le 2-methoxy-1,6-diméthyl-5-vinyl-9,10-dihydrophénanthrène-7-ol, composé phénanthrénique isolé à partir des parties aériennes de *J. effusus*, a été actif contre 2 pathogènes humains : *Bacterium paratyphosum* B et *Micrococcus lysodeikticus* avec des CMI respectives de 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tableau 5. Activité antibactérienne contre des bactéries à Gram positif de quelques composés phénanthréniques

Composé	Méthodes	Souches bactériennes	DI (mm)	CMI ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	Références
Juncusol	Diffusion sur disque	<i>Bacillus</i> V	3,05		(Chapatwala et al., 1981)
		<i>Bacillus</i> II	2,28		
		<i>Bacillus</i> IV	2,08		
		<i>Bacillus subtilis</i> ATCC-6051	1,90		
		<i>S. aureus</i> ATCC-12600	1,86		
		<i>Mycobacterium phlei</i> ATCC-I1758	1,49		
	Dilution sur gélose	<i>S. aureus</i> 13709		25	(Boger et al., 1985)
		<i>M. smegmatis</i> 607		12,5	
	Diffusion sur disque	SARM ATCC43300	12		(Tóth et al., 2016)
	Microdilution			25	
	Microdilution	SASM		12,5 (+UVA)	(Hanawa et al., 2002)
				25	
		SARM		25 (+UVA)	
				25	
		<i>B. subtilis</i>		12,5 (+UVA)	
				12,5	

Dehydroeffusol		MSSA		1,6 (+UVA) 25	
		SARM		1,6 (+UVA) 25	
		<i>B. subtilis</i>		3,1 (+UVA) 12,5	
Juncuénine D	Diffusion sur disque	SARM ATCC43300	12	12,5	(Tóth et al., 2016)
Dehydrojuncuénine B	Microdilution		10	25	
Jinflexine B			7	100	
2-méthoxy-1,6-diméthyl-5-vinyl-9, 10-dihydrophénanthrène-7-ol	Microdilution	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Verticillium dahliae</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Gibberella saubinetii</i> <i>Bipolaris zeicola</i> <i>Phytophthora parasitica</i> <i>Bacterium paratyphosum</i> B nommé désormais <i>Salmonella enterica</i> sérotypes Paratyphi B <i>Micrococcus lysodeikticus</i>		3,125 6,25 6,25 12,5 6,25 6,25 12,5 25	(Zhao et al., 2018)

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique : Les espèces du genre *Juncus* étudiées

1-(3,7-dihydroxy-2,8-diméthyl-9, 10-dihydrophénanthrène-1-yl)-ethanone		<i>Rhizoctonia solani</i>	25		
		<i>Verticillium dahliae</i> Kleb	25		
		<i>Phytophthora parasitica</i>	25		
		<i>Colletotrichum acutatum</i> Simmonds	25		
		<i>Bacterium paratyphosum</i> B	25		
2,7-dihydroxy-3,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène (= desvinyljuncusol)	Dilution sur gélose	<i>S. aureus</i> 13709		12,5	(Boger et al., 1985)
		<i>K. penumoniae</i> 10031		50	
		<i>M. smegmatis</i> 607		6,25	
2-hydroxy-3-méthyl-9,10-dihydrophénanthrène		<i>S. aureus</i> 13709		25	
		<i>M. smegmatis</i> 607		3,12	

DI : diamètre d'inhibition, CMI : concentration minimale inhibitrice, MSSA : *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline, SARM : *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline, +UVA : irradiation aux ultraviolets A

3.6.1.2. Activités antifongiques

En santé humaine, l'activité antifongique de certains composés phénanthréniqes a été mise en évidence contre des souches de *Candida albicans*. Le juncusol a montré une valeur de CMI 2 fois plus basse contre *C. albicans* en présence d'UVA ($12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ **versus** $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour le même test réalisé dans l'obscurité) (Hanawa et al., 2002). Dans la même étude, le dehydroeffusol a présenté une activité plus puissante contre la même souche : la CMI déterminée en présence d'UVA a été presque 16 fois plus basse qu'à l'obscurité ($1,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ **versus** $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Des anciens travaux ont déterminés une valeur de CMI égale à $6,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour le 2-hydroxy-3-méthyl-9,10-dihydrophénanthrène contre la souche de *C. albicans* 10231 (Boger et al., 1985).

En santé du végétal, l'activité antifongique de l'effusol isolé à partir des rhizomes de *J. maritimus* a été mise en évidence contre le champignon *Zymoseptoria tritici*, agent responsable de la maladie de la septoriose de blé. Les valeurs suivantes ont été obtenues : CMI = $19 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $\text{CI}_{50} = 9,98 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Sahli et al., 2018). D'après l'étude de Zhao et ses collaborateurs (2018), les 2 composés phénanthréniqes : le 2-méthoxy-1,6-diméthyl-5-vinyl-9,10-dihydrophénanthrène-7-ol et le 1-(3,7-dihydroxy-2,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-1-yl) éthanone, isolés à partir des parties aériennes de *J. effusus* ont également montré une activité antifongique. Des valeurs de CMI comprises entre $3,125$ et $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ont été déterminées pour le premier composé contre 6 champignons phytopathogènes : *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Gibberella saubinetii*, *Bipolaris zeicola* et *Phytophthora parasitica*.

3.6.1.3. Activités antivirales

Par ailleurs, l'activité antivirale du juncusol et du dehydrojuncusol, isolés respectivement de *J. compressus* et des rhizomes de *J. maritimus*, a été étudiée. Le juncusol à une concentration égale à $0,78 \mu\text{M}$ a entraîné une réduction de $3,66 \log_{10}$ du titre viral du virus Herpès simplex 2 (HSV-2), contre une réduction comprise entre 1 et $5,06 \log_{10}$ pour le témoin acyclovir testé à $6,25 \mu\text{M}$. Ce résultat a été confirmé par des expériences de PCR quantitative (Bús et al., 2018a). Dans le cadre de travaux menés antérieurement au sein de mon équipe, le dehydrojuncusol a montré également une activité antivirale significative contre le virus de l'hépatite C (VHC). En effet, l'ajout de ce phénanthrène aux cellules Huh-7 infectées par le VHC à différentes étapes du cycle viral a montré que ce dernier était particulièrement actif pendant l'étape de post-inoculation avec plus de 95% d'inhibition de l'infection. À partir d'expérimentations dose-

réponse, une concentration efficace médiane (CE₅₀) de 1,53 μ M a été déterminée dans les cellules Huh-7 infectées. Le dehydrojuncusol a montré également une activité virale contre le VHC dans un modèle préclinique utilisant des hépatocytes primaires humains (PHH) avec une CE₅₀ de 1,14 μ M. De plus, la cytotoxicité du dehydrojuncusol a été relativement faible pour les cellules Huh-7 (CC₅₀ = 75,6 μ M) et quasi inexistante pour les PHH aux concentrations actives. Cette même étude a mis en évidence que le dehydrojuncusol était un inhibiteur de réplication ciblant la protéine NS5A et qu'il était actif contre différents génotypes du VHC, incluant des variants résistants (Sahuc et al., 2019).

3.6.2. Cytotoxicité des composés phénanthréniques

Il est toujours important d'évaluer la toxicité des composés bioactifs étudiés car malgré leurs potentialités thérapeutiques, ces derniers peuvent présenter des effets secondaires comme par exemple des effets génotoxiques, carcinogènes ou immunotoxiques. Des cellules exposées à des composés cytotoxiques peuvent finir par se nécroser, subir une mort programmée (apoptose), s'autolyser (autophagie) ou cesser de croître et de se diviser activement afin de réduire leur prolifération cellulaire. Pour qu'il soit considéré comme un candidat dans les préparations pharmaceutiques ou cosmétiques, un composé doit toujours avoir une toxicité minimale voire nulle (Çelik, 2018). En outre, l'indice de sélectivité (IS), défini comme étant le rapport de la dose cytotoxique d'un composé à sa dose active, est un paramètre assez important. En effet, le composé idéal est celui qui possède à la fois une concentration cytotoxique relativement élevée et une concentration active très basse. Autrement dit, plus les valeurs de l'indice de sélectivité sont élevées, plus l'effet du composé est intéressant. Un composé actif aura un effet thérapeutique d'intérêt quand son indice de sélectivité sera au moins supérieur ou égal à 10 (Caamal-Fuentes et al., 2011).

Comme les dérivés phénanthréniques isolés à partir des espèces de *Juncus* possèdent diverses activités biologiques, de nombreuses études se sont intéressées à fournir des informations sur la toxicité de ces derniers et ceci par le biais de différents tests colorimétriques *in vitro*, au cours desquels l'activité métabolique est utilisée comme indicateur de viabilité. De nombreux tests existent tels que le 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), le Cell Counting Kit-8 (CCK-8), la Sulforhodamine B (SRB) ou l'Alamar Blue.

Dans la littérature disponible, l'évaluation de la cytotoxicité des composés phénanthréniques a été principalement réalisée sur des lignées cellulaires cancéreuses car ces dernières sont plus

faciles à cultiver en laboratoire que les cellules saines. Il a été souligné que la présence ou l'absence de l'insaturation en C-9 – C-10 pourrait avoir un effet sur le pouvoir cytotoxique du composé phénanthrénique étudié. En effet, Ishiuchi et al., 2015 ont trouvé que dans certains cas, la forme 9,10-dihydrophénanthrène est plus cytotoxique sur les cellules HT22 que la forme 9,10-dehydrophénanthrénique ; c'est notamment le cas de l'effusol **versus** le dehydroeffusol et le juncusol **versus** le dehydrojuncusol (**Tableau 6**). En revanche, dans la même étude, un effet inversé a été déterminé pour la juncuénine B et la dehydrojuncuénine B. Un effet similaire à ce dernier a été également retrouvé dans l'étude de l'équipe de Ma et al., (2016) : des valeurs de CI_{50} (μM) plus basses ont été déterminées pour le 5-(1-méthoxyethyl)-1-méthyl-phénanthrène-2,7-diol (= dérivé 9,10-dehydro de l'effususol A) contre celles de l'effususol A (**i.e** un pouvoir cytotoxique plus important) sur de nombreuses lignées cellulaires (31,89 **versus** 43,59 μM sur SHSY-5Y ; 42,94 **versus** 62 sur SMMC-7721 ; 37,03 **versus** 51,29 sur HepG-2 et 10,87 **versus** 26,68 sur MCF-7). Au sein de la même étude, des résultats similaires ont été obtenus pour le dehydroeffusol **versus** l'effusol, le dehydroeffusol **versus** le 2, 7-dihydroxy-1-méthyl-5-aldehyde-9,10-dihydrophenanthrene et le 5-hydroxyéthyl-1-méthylphénanthrène-2,7-diol **versus** 2,7-dihydroxy-5-hydroxyméthyl-1-méthyl-9, 10-dihydrophénanthrène.

En plus de l'insaturation en C-9 – C-10, la position des groupements méthyle, vinyle et hydroxyle attachés aux carbones C-5, C-6, C-7 et C-8 semble avoir un impact sur l'activité cytotoxique des composés phénanthréniques. C'est notamment le cas de la juncuénine B et de la dehydrojuncuénine B qui ont présenté un effet cytotoxique plus important sur les cellules HT22 que le juncusol et le dehydrojuncusol (Ishiuchi et al., 2015). Par ailleurs, selon les travaux de Su et al., 2013, les composés phénanthréniques possédant des substitutions hydroxyle ou méthoxyle au niveau du C-2 et n'ayant pas de substitution en C-8 présentent un effet cytotoxique plus important.

Afin de pouvoir établir des relations structure-activité, des recherches supplémentaires seront nécessaires.

Tableau 6. Cytotoxicité de quelques composés phénanthréniques sur différentes lignées cellulaires

Composé	Lignées cellulaires	Tests	Valeurs	Références
Dehydroeffusal	HepG2 HeLa	CCK-8	CI ₅₀ = 12,43 µM CI ₅₀ = 13,07 µM	(Ma et al., 2016)
Dehydroeffusol	HT22 SGC-7901 AGS-7901	MTT Alamar Blue	*% RVC = 46,4 CI ₅₀ = 35,89 µM CI ₅₀ = 32,92 µM	(Ishiuchi et al., 2015) (Liu et al., 2015)
Dehydrojuncuénine A	THP-1	Résazurine	CI ₅₀ = 5 µM	(Gainche et al., 2020)
Dehydrojuncuénine B	HT22	MTT	*% RVC = 8,4	(Ishiuchi et al., 2015)
Dehydrojuncusol	HT22 THP-1	MTT Résazurine	*% RVC = 13,6 CI ₅₀ = 3 µM	(Ishiuchi et al., 2015) (Gainche et al., 2020)
Effusol	HT22 HeLa	MTT	*% RVC = 9,9 CI ₅₀ = 3,68 µM	(Ishiuchi et al., 2015) (Stefkó et al., 2019b)
Effususine B	SHSY-5Y SMMC-7721 HepG2 HeLa MCF-7	CCK-8	CI ₅₀ = 32,64 µM CI ₅₀ = 13,60 µM CI ₅₀ = 12,93 µM CI ₅₀ = 25,09 µM CI ₅₀ = 12,49 µM	(Ma et al., 2015)
Juncatrin B	HeLa	MTT	CI ₅₀ = 3,48 µM	(Stefkó et al., 2019b)
Juncuénine A	THP-1	Résazurine	CI ₅₀ = 6 µM	(Gainche et al., 2020)
Juncuénine B	HT22 HeLa	MTT	*% RVC = 13,6 CI ₅₀ = 2,91 µM	(Ishiuchi et al., 2015) (Stefkó et al., 2019b)
Juncuénine D	HT22	MTT	*% RVC = 23,7	(Ishiuchi et al., 2015)
Juncuénine E	MCF-7 HeLa	Sulforhodamine B (SRB) MTT	CI ₅₀ = 21,3 µM CI ₅₀ = 60,5 µM	(Su et al., 2013) (Stefkó et al., 2019b)
Juncunol	HepG2 MDA-MB-468	MTT	CI ₅₀ = 4,6 µg.mL ⁻¹ CI ₅₀ = 5, µg.mL ⁻¹	(Rodrigues et al., 2014)

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique : Les espèces du genre *Juncus* étudiées

	HeLa		CI ₅₀ = 6,9 µg.mL ⁻¹	
Juncusol	HT22 B-16 THP-1 NC/90 KB	MTT Résazurine	*% RVC = 25,4 CI ₅₀ = 12,5 µg.mL ⁻¹ CI ₅₀ = 13,8 µg.mL ⁻¹ CI ₅₀ = 10 µM ED ₅₀ = 0,3 µg.mL ⁻¹	(Ishiuchi et al., 2015) (Boger et al., 1985) (Gainche et al., 2020) (Miles et al., 1977)
2,7-dihydroxy-1-méthyl-5-aldehyde-9,10-dihydrophénanthrène	MCF-7 HeLa	Sulforhodamine B (SRB)	CI ₅₀ = 9,17 µM CI ₅₀ = 19,6 µM	(Su et al., 2013)
5-hydroxyméthyl-1-méthylphénanthrène-2, 7-diol	HeLa	CCK-8	CI ₅₀ = 16,35 µM	(Ma et al., 2016)
5-(1-methoxyethyl)-1-méthyl-phénanthrène-2, 7-diol	MCF-7	CCK-8	CI ₅₀ = 10,87 µM	(Ma et al., 2016)
2,7-dihydroxy-3,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène (= desvinyljuncusol)	CCRF-CEM B-16 L-1210	Hématimètre ou Compteur Coulter	CI ₅₀ = 9,3 µg.mL ⁻¹ CI ₅₀ = 17,5 µg.mL ⁻¹ CI ₅₀ = 10,2 µg.mL ⁻¹	(Boger et al., 1985)
2-hydroxy-3-méthyl-9,10-dihydrophénanthrène	B-16 L-1210	Hématimètre ou Compteur Coulter	CI ₅₀ = 27,5 µg.mL ⁻¹ CI ₅₀ = 24,5 µg.mL ⁻¹	

HepG2 : lignée cellulaire immortelle de cancer du foie humain ; HT22 : une lignée cellulaire immortalisée dérivée de neurones hippocampiques primaires de souris ; HeLa : lignée cellulaire humaine d'adénocarcinome du col de l'utérus ; SGC-7901 : lignée cellulaire humaine de cancer gastrique ; AGS : cellules dérivant d'adénocarcinome gastrique humain caucasien ; THP-1 : lignée cellulaire monocyttaire humaine ; SHSY-5Y : lignée cellulaire humaine de neuroblastome ; SMMC-7721 : lignée cellulaire humaine de carcinome hépatocellulaire ; MCF-7 : lignée cellulaire humaine de cancer du sein ; MDA-MB-468 : lignée cellulaire de carcinome mammaire ; B-16 : culture cellulaire de mélanome de souris ; NC/90 KB : carcinome épidermoïde nasopharyngé humain ; L-1210 : culture cellulaire de leucémie lymphoïde de souris ; CCRF-CEM : culture cellulaire de leucémie lymphoblastique humaine ; CI₅₀ : concentration inhibitrice médiane ; % RVC : pourcentage de réduction cellulaire ; * : les composés phénanthréniques ont été testés à 100 µM

4. Mise en place d'une formulation topique à base de juncusol

4.1. Contexte : pied diabétique et *Staphylococcus aureus*

Les ulcères du pied diabétique sont des plaies chroniques assez graves qui concernent tous les types de diabète. En raison de l'irrigation sanguine limitée des membres inférieurs, les ulcères du pied diabétique sont sujets à des nécroses et à des infections, et sont susceptibles d'atteindre les tissus profonds, notamment les os. Cette affection touche environ 6,8% de la population mondiale (Zhang et al., 2017). Les infections du pied diabétique sont particulièrement handicapantes pour les patients sur le plan physique et psychologique surtout pour ceux ayant des plaies qui se mettent en décharge pendant de longues périodes (Raspovic and Wukich, 2014). Ainsi, si elles ne sont pas prises en charge de manière adéquate, les ulcères du pied diabétique peuvent induire d'assez graves répercussions telles que l'installation de la gangrène, l'hospitalisation, l'amputation des extrémités (Lipsky et al., 2016) ou un décès.

Comme souligné dans le chapitre précédent, les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline font partie des souches les plus problématiques car elles expriment des facteurs de virulence et des protéines de surface empêchant la cicatrisation des plaies cutanées et des tissus (Talan et al., 2011). Il a été reporté dans l'étude de Dunyach-Remy et al., (2016) que les souches de *S. aureus* (sensibles et résistantes à la méticilline) sont les souches les plus fréquemment isolées des infections du pied diabétique avec notamment une forte prévalence des souches SARM. Quelle que soit la profondeur de l'infection, les *S. aureus* peuvent se trouver seuls ou en association avec d'autres bactéries comme par exemple les bactéries à Gram négatif et les bactéries anaérobiques (Raspovic and Wukich, 2014). Une des particularités des souches de *S. aureus* est le fait qu'elles soient à la fois des bactéries commensales (30% de la population humaine est colonisée par ces souches (Wertheim et al., 2005)) et des pathogènes humains opportunistes qui persistent dans les cellules de la peau et les ostéoblastes, contribuant ainsi à la chronicité des plaies. En outre, les souches SARM expriment des facteurs de virulence et des protéines de surface empêchant la cicatrisation des plaies cutanées et des tissus (Talan et al., 2011). L'installation des biofilms a été constatée dans la plupart des plaies chroniques dont l'ostéite et les ulcères infectés aigus ou chroniques du pied diabétique (Hurlow et al., 2018 ; Johani et al., 2019, 2017). Cette forme de résistance, développée par les bactéries, est responsable de nombreux échecs thérapeutiques.

Les principales stratégies de gestion des plaies consistent à maintenir un environnement humide autour des plaies, à traiter et à prévenir le plus tôt possible les infections, à décharger la zone infectée, à débrider les tissus nécrotiques et les biofilms, à maximiser la perfusion et à assurer un bon apport en nutriments et en oxygène (Murphy-Lavoie et al., 2022). Toutefois, ces stratégies restent insuffisantes pour assurer une bonne cicatrisation et éviter les rechutes. C'est pour cela que les professionnels de santé sont constamment à la quête de nouvelles solutions thérapeutiques innovantes pour gérer au mieux ce type d'infection. L'instauration d'une antibiothérapie empirique couvrant les pathogènes les plus communs est indispensable. La voie orale est fréquemment recommandée car elle présente plusieurs avantages tels que la réduction du temps d'hospitalisation et le coût amoindri de traitement. Toutefois, cette dernière n'est pas toujours la voie d'administration la plus idéale car une bonne disponibilité orale du principe actif n'est pas systématiquement garantie. Une des approches les plus recherchées par la communauté scientifique est la mise en place d'un système qui permettra d'assurer une libération locale du principe actif (antibiotiques ou antibactériens), directement au niveau du site infecté, à des doses importantes, sans effet toxique pour l'organisme et sans passer par la voie d'administration orale. Ainsi, une meilleure biodisponibilité du principe actif et une fréquence réduite de son administration peuvent être atteintes.

C'est dans ce contexte que nous avons envisagé dans cette partie de notre étude de mettre en application le potentiel antibactérien du juncusol, notamment contre l'isolat clinique de *S. aureus* T28.1 et de l'intégrer dans une formulation topique biocompatible. La formulation ainsi développée pourrait être utilisée comme une option thérapeutique aidant à la cicatrisation des infections des ulcères diabétiques. Pour cette partie, nous avons collaboré avec l'équipe du Pr Nicolas Blanchemain, et avec le doctorant Henry Chijcheapaza-Flores (INSERM U1008 "Advanced Drug Delivery Systems", Faculté de médecine, Université de Lille) pour la conceptualisation et la mise en place des expériences de formulation.

4.2. Les hydrogels de polymères naturels

Face au caractère hydrophobe de notre principe actif (= le juncusol), il a été décidé de partir sur une formulation topique type hydrogel à base de chitosane (CHT) et de polymère de cyclodextrine (CD). Les hydrogels sont des réseaux tridimensionnels de chaînes polymères enchevêtrés gonflés par l'eau. Grâce à leurs caractéristiques uniques et leurs propriétés viscoélastiques ajustables, ces derniers sont très étudiés en ingénierie des dispositifs médicaux.

Ils peuvent être utilisés comme supports aux cellules exogènes pour la régénération tissulaire ou encore comme véhicules pour la libération de principes actifs (Bai et al., 2018 ; Fasiku et al., 2021 ; Morteza Bahram et al., 2016 ; Zahedi et al., 2017). La forme de l'hydrogel envisagé dans notre étude est un hydrogel injectable, basé sur un système « sol-gel » à partir d'un mélange polymère (CHT et CD).

Les hydrogels peuvent être formés de 2 manières soit par des interactions physiques ou des interactions chimiques. Les hydrogels physiques sont basés sur l'auto-association de macromolécules par le biais d'interactions faibles réversibles (principalement ioniques ou hydrophobes) (Flores et al., 2017). Par opposition, les hydrogels chimiques sont obtenus grâce à des liaisons covalentes irréversibles formées entre les groupements réactifs de molécules bifonctionnelles et la fonction amine ou le groupement hydroxyle du chitosane (Bhattacharai et al., 2010 ; Koetting et al., 2015 ; Muzzarelli, 2009). Même s'ils présentent de faibles propriétés mécaniques, les hydrogels physiques présentent l'avantage d'être non toxiques. De plus, ils sont caractérisés par une biocompatibilité élevée (Zarrintaj et al., 2021).

4.2.1. Le chitosane

Le chitosane (CHT) est un polysaccharide cationique composé d'unités de D-glucosamine et de N-acétyl glucosamine, reliées par des liaisons glycosidiques de type β -(1-4) (**Figure 14**). Il est obtenu par désacétylation chimique (en milieu alcalin) ou enzymatique de la chitine (Croisier and Jérôme, 2013 ; Muxika et al., 2017 ; Venkatesan and Kim, 2014), qui est un composant structural des parois cellulaires des champignons et des exosquelettes des crustacés. Le CHT possède des propriétés chimiques et biologiques particulières liées à sa structure chimique. Lors de sa solubilisation, les groupes amine libres ($-NH_2$) subissent une protonation et génèrent des groupes ammonium ($-NH_3^+$). Ainsi, le CHT devient un polyélectrolyte cationique. De plus, grâce à l'ensemble de ses fonctions amines ($-NH_2$) et hydroxyles ($-OH$), ce dernier est capable d'interagir avec d'autres polymères (Ahmed et al., 2018 ; Tchobanian et al., 2019 ; Vunain et al., 2017). Par ailleurs, le CHT est largement utilisé dans le développement des biomatériaux de par ses propriétés intrinsèques (biodégradabilité et biocompatibilité) (Djekic et al., 2020). Grâce à ses propriétés physico-chimiques, il peut être employé sous diverses formes : microsphères, hydrogels, nanofibres, ou éponges, notamment pour la régénération tissulaire et osseuse (Aussel et al., 2017 ; Ouerghemmi et al., 2016 ; Shamekhi et al., 2017 ; Zhou et al., 2016).

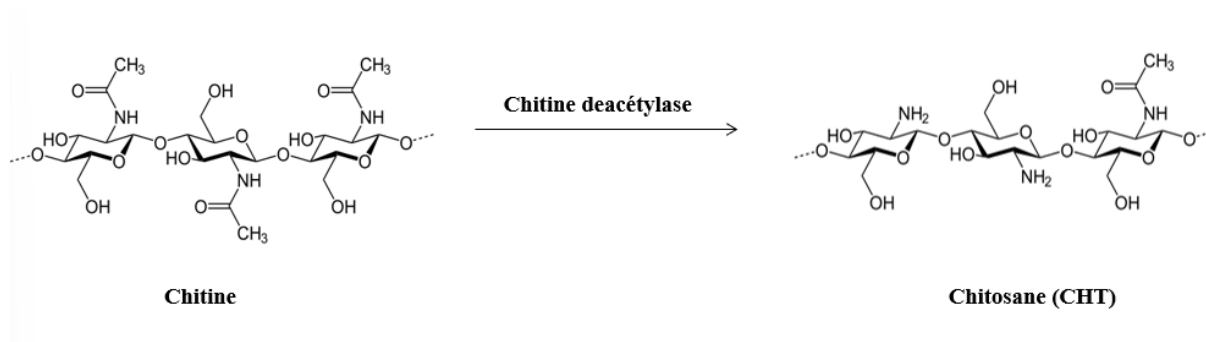


Figure 14. Synthèse du chitosane (CHT) à partir de la chitine

4.2.2. Les cyclodextrines

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques naturels provenant de la dégradation enzymatique de l'amidon. L' α -CD, la β -CD et la γ -CD sont respectivement composées de 6, 7 ou 8 unités de D-(+)-glucopyranose liées en α -1,4 (**Tableau 7**). Ce sont des molécules-cages appelées aussi cages moléculaires qui permettent d'encapsuler diverses molécules dans leur cavité hydrophobe en solution aqueuse (Menuel et al., 2007). Les cyclodextrines sont couramment utilisées dans le domaine pharmaceutique comme excipient de formulation dans les médicaments en raison de leurs diverses caractéristiques et propriétés : une capacité à former des complexes, une cavité apolaire apportant un micro-environnement lipophile et extérieur hydrosoluble (**Figure 15**), une absence de toxicité et une amélioration des caractéristiques physico-chimiques des principes actifs. Elles permettent d'améliorer la biodisponibilité des principes actifs, de vectoriser les médicaments et de prolonger leur libération (Kono and Teshirogi, 2015 ; Mogrovejo-Valdivia et al., 2019 ; Pinho et al., 2014).

Tableau 7. Propriétés physico-chimiques des cyclodextrines (Bezerra et al., 2020)

Propriétés	α -CD	β -CD	γ -CD
Formule brute	$C_{36}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{40}$
Masse moléculaire	972	1135	1297
Nombre d'unité de glucopyranose	6	7	8
Diamètre de la cavité (nm)	0,47-0,57	0,60-0,78	0,83-0,95
Volume intérieure de la cavité (nm ³)	1740	2620	4720

Nombre de molécules d'eau dans la cavité	6	11	17
Solubilité dans l'eau (g.L⁻¹)	129,5	18,4	249,2
Température de dégradation (°C)	278	298	267

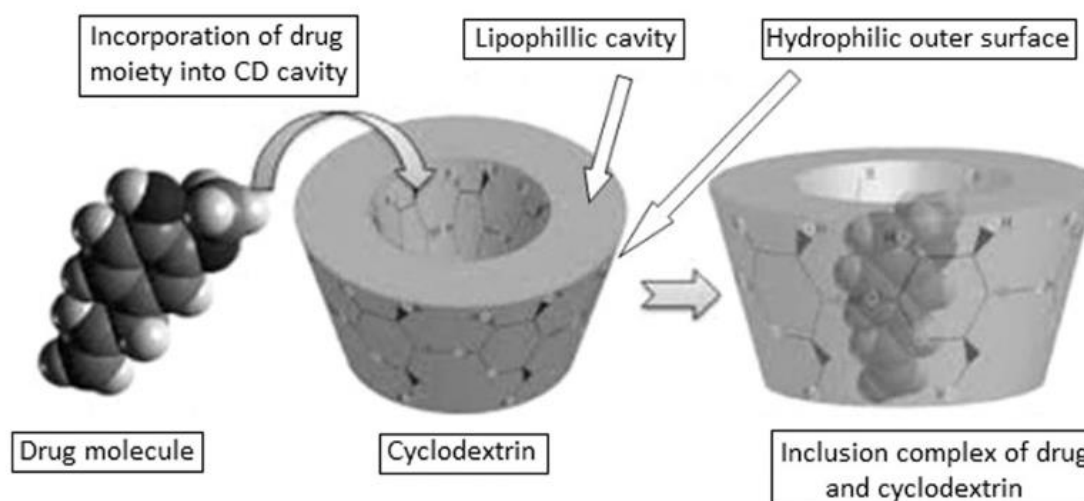


Figure 15. Illustration montrant le processus de formation d'un complexe d'inclusion de principe actif-cyclodextrine (Sharma and Baldi, 2016)

Parmi les différentes cyclodextrines, la β -CD et ses dérivés, obtenus par modification chimique, estérification ou introduction de groupes fonctionnels sur les groupements hydroxyles du squelette, sont les plus employées en raison de plusieurs critères : la simplicité et le coût de leur obtention, l'absence d'effet irritant sur la peau, ainsi que l'absence d'effet mutagène. Pour ces différentes raisons, nous avons fait le choix d'opter pour la β -CD pour la formulation de notre hydrogel. Toutefois, la solubilité de la β -CD non substituée dans l'eau a été décrite comme étant limitée dans la littérature (Saokham et al., 2018) : à température ambiante, elle est de 2% (poids par poids (p/p)) ; cela équivaut à environ 18,8 g/L ou 16,6 mM) contre 13% et 26% respectivement pour l' α -CD et la γ -CD. Même si la β -CD contient plus de groupes hydroxyles par rapport à l' α -CD, sa faible solubilité a été souvent expliquée par la formation d'un réseau de liaisons hydrogène internes entre les groupes hydroxyles secondaires. Ainsi, la rupture de ces liaisons hydrogène entraînera une augmentation de la solubilité dans l'eau (Coleman et al., 1992 ; Davis and Brewster, 2004 ; Sabadini et al., 2006 ; Saokham et al., 2018 ; Szejtli, 1998). C'est notamment le cas de l'hydroxypropyl- β -CD (HP- β -CD), synthétisée par substitution des

groupements hydroxyles par des groupements hydroxypropyles, qui possède une solubilité aqueuse de 60% (p/p) ou plus (Qi and Sikorski, 1999). En plus de pouvoir améliorer les propriétés solubilisantes des CDs, les réactions de substitution des groupements hydroxyles des CDs permettent de leur apporter de nouvelles propriétés physico-chimiques et biologiques élargissant ainsi leur champ d'applications.

4.2.3. Les polymères de cyclodextrines (PCDs)

Les polymères de cyclodextrines (PCDs) sont des macromolécules formées par l'enchaînement des unités de CD liées de manière covalente dans la chaîne principale ou conjuguée en tant que groupes latéraux (Zhang and Ma, 2013). Ils ont été développés dans le but de répondre aux besoins actuels en matière d'applications pratiques que les CDs individuelles n'arrivent pas à achever. Ils sont devenus un domaine important de recherche en matière des sciences des matériaux et de la biomédecine, offrant ainsi de nouvelles perspectives pour les CDs. Ces macromolécules apportent de nombreux avantages de par leurs propriétés physico-chimiques diverses et variées, comme par exemple leur capacité d'interactions améliorée grâce à la proximité spatiale des cavités dans la structure du polymère permettant une complexation coopérative des actifs ou encore leur capacité à combiner les excellentes propriétés des polymères telles que la résistance thermique, le poids moléculaire élevé et la bonne stabilité thermique.

Les PCDs se présentent sous différentes structures : (i) réticulés, (ii) linéaires, (iii) fixés, (iv) en composés d'inclusion ou encore (v) hyperbranchés (**Figure 16**). Ces derniers peuvent être obtenus selon différentes méthodes de synthèse. Le choix de la méthode se fait en fonction de la forme finale du PCDs souhaité.

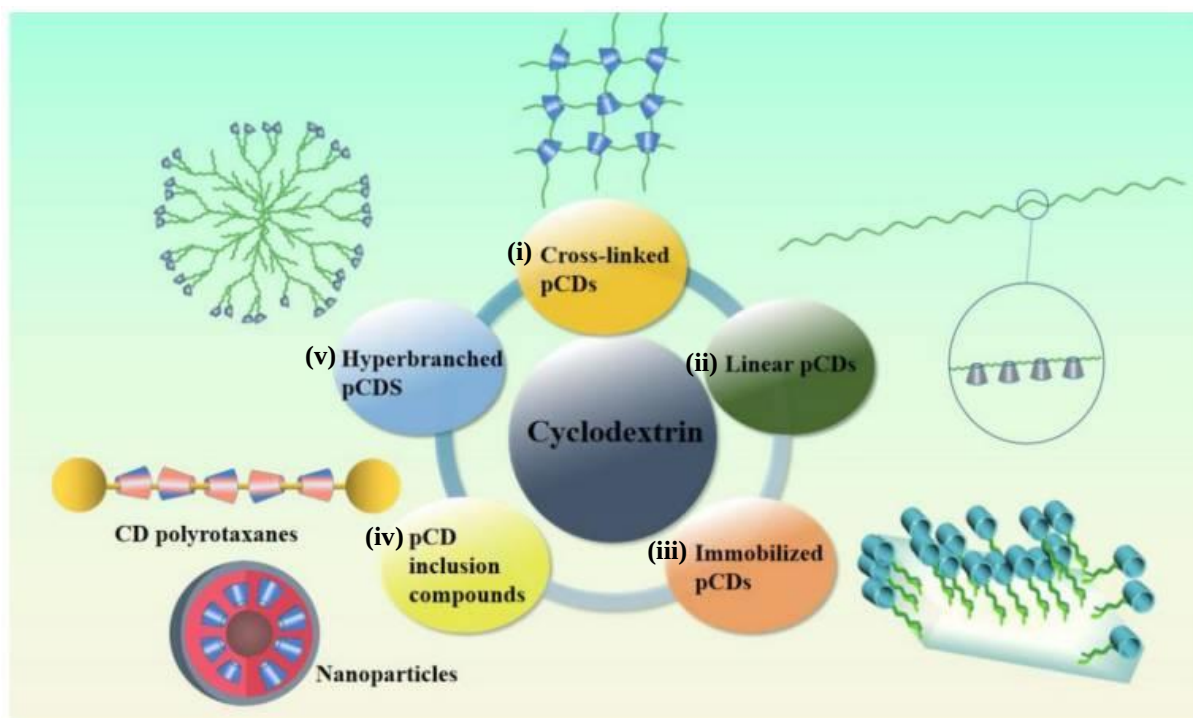


Figure 16. Différentes structures de polymères de cyclodextrines (PCDs) (Liu et al., 2021)

Pour notre étude, nous nous sommes seulement intéressés aux PCDs réticulés, dont la synthèse nécessite des agents réticulants ayant des groupes bifonctionnels ou multifonctionnels tels que les peroxydes, les diisocyanates, les anhydrides d'acide, le N,N'-méthylènebisacétamide ou encore l'acide citrique (CTR) (Davis and Brewster, 2004 ; Gidwani and Vyas, 2014). L'équipe du Professeur Martel, de l'UMET-ISP (Unité Matériaux Et Transformations - Ingénierie des Systèmes Polymères) à l'Université de Lille a développé différentes méthodes pour former des polyélectrolytes ioniques à caractère cationique ou anionique à base de CDs. Un des exemples est le PCD cationique qui a été mis au point par une réaction de polymérisation de la β -CD avec de l'épichlorohydrine (C_3H_5ClO ; agent réticulant) en conditions basiques et en présence du chlorure de glycidyltriéthylammonium ($C_6H_{14}ClNO$) qui confère le caractère cationique au polymère synthétisé (Junthip et al., 2015). Un autre exemple porte sur le PCD polyélectrolyte anionique produit par une méthode innovante reposant sur une réaction de polyestérification entre les groupements hydroxyles de la β -CD native et les groupements carboxyliques d'un acide polycarboxylique comme l'acide citrique (CTR) en présence d'un catalyseur qui peut être le sodium hypophosphite ($NaPO_2H_2$) (Martel et al., 2005, 2002) (**Figure 17**).

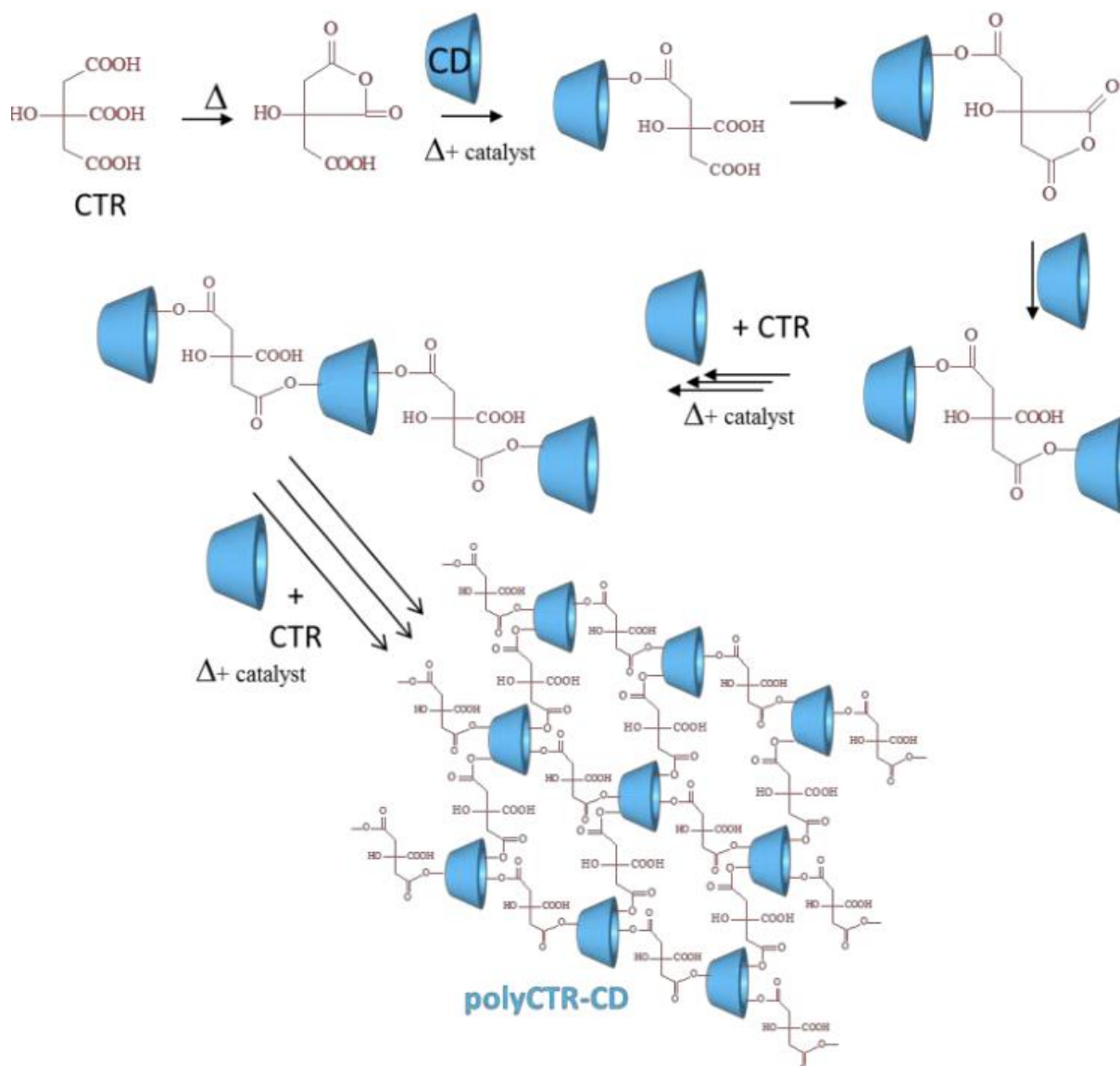


Figure 17. Réaction de polymérisation par polyestérification entre l'acide citrique (CTR) et les cyclodextrines (CDs) aboutissant à la formation d'un polymère de cyclodextrine PCD anionique (Palomino-Durand, 2019)

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes particulièrement intéressés aux Poly-CTR-HP- β -CDs anioniques afin de pouvoir les utiliser avec le CHT, à caractère cationique, pour la formation de complexes polyélectrolytes, nécessaires pour la formulation de notre hydrogel physique chargé de juncusol (principe actif).

4. Étude préliminaire de la biodisponibilité des composés phénanthréniques issus des espèces de *Juncus*

En pharmacologie, la biodisponibilité correspond à la vitesse et à l'importance du passage d'une molécule dans la circulation générale, gagnant ainsi son site d'action (Price and Patel, 2023). Elle constitue une composante essentielle du paradigme de la pharmacocinétique car elle conditionne l'action pharmacologique de la molécule. La pharmacocinétique, quant à elle, peut être défini comme étant l'étude du devenir d'un médicament dans l'organisme. C'est un paramètre assez important car il permet de définir les modalités d'administration d'une molécule donnée, à savoir la voie d'administration, la dose et le rythme d'administration. La biodisponibilité est toujours représentée par l'acronyme ADME pour Absorption, Distribution, Métabolisation et Excrétion. La détermination des paramètres pharmacocinétiques d'un principe actif apporte des informations essentielles qui permettent de définir la voie d'administration et la forme galénique adéquates, ainsi que le schéma posologique à préconiser (dose et fréquence d'administration).

De nombreuses activités biologiques prometteuses ont été décrites pour les composés phénanthréniques issus des espèces de *Juncus*, notamment l'activité antivirale contre le virus de l'hépatite C et l'activité antibactérienne contre des souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (Sahuc et al., 2019 ; Tóth et al., 2016). Toutefois, à notre connaissance, la biodisponibilité des dérivés phénanthréniques n'a jamais été étudiée. C'est dans ce contexte que nous avons initié une étude préliminaire sur la biodisponibilité de ces composés en considérant une prise par voie orale. Cette partie a été réalisée en collaboration avec nos collègues de l'UMRt BioEcoAgro 1158, le Dr Benoît Cudennec et son équipe.

Étant donné que l'épithélium intestinal constitue la première barrière biologique franchie par le principe actif lors d'une prise orale, nous avons ainsi réalisé des expériences de passage de barrière intestinale *in vitro* à travers le modèle cellulaire : la monocouche de coculture cellulaire Caco2/HT29-MTX.

Avant d'atteindre la circulation générale et les sites d'actions au niveau des organes, un principe actif (composés phénanthréniques dans notre cas) peut subir de multiples réactions au niveau de la monocouche de coculture cellulaire Caco2/HT29-MTX lors de son absorption, mais surtout au moment de la métabolisation hépatique pré-systémique. On parle donc de l'effet de premier passage (*first-pass metabolism*). À ce stade, il subit des modifications au niveau de sa structure (Wu et al., 2011).

Il a été souligné dans plusieurs études que l'effet de premier passage est un facteur limitant de la biodisponibilité des composés bioactifs. Ceci pourrait ainsi affecter leur capacité à accomplir leurs fonctions biologiques. D'autres facteurs peuvent également impacter la biodisponibilité des composés administrés par voie orale. Parmi ces facteurs, nous trouvons la composition chimique du composé (poids moléculaire, lipophilie, stéréochimie, nombre de groupes hydroxyles libres...), la manière dont ils ont été administrés mais également la physiologie du modèle *in vivo* employé (Cosme et al., 2020).

Deux voies métaboliques essentielles existent au niveau du foie : la voie métabolique de phase I et la voie métabolique de phase II. Au cours de la métabolisation de phase I, le principe actif subit des réactions de fonctionnalisation telles que l'oxydation et l'hydrolyse via les enzymes localisées dans le réticulum endoplasmique des cellules hépatiques. Durant la métabolisation de phase II, ce dernier subit des réactions de biosynthèse (= de conjugaison) consistant à introduire une/des espèce(s) endogène(s) hydrophiles au principe actif. Des réactions telles que la glucuronidation au niveau des microsomes, la sulfatation au niveau du cytosol et la méthylation sont spécifiques au métabolisme de phase II (Cosme et al., 2020).

CHAPITRE 2 : RÉSULTATS & DISCUSSION

Chapitre 2 : Résultats & Discussion

1. Étude de l'activité antivirale des tiges de *J. acutus* (JA2) contre le coronavirus HCoV-229E

L'étude de l'activité antivirale des espèces de *Juncus* collectées en France en 2018 par les soins du Pr Céline Rivière et du Dr Gabriel Lefèvre, a été initiée dans le cadre du stage de M2 de Rawen Ben Malek. Il s'agit d'une collaboration avec le Dr Karin Séron et son équipe (Inserm U1019, CNRS UMR8204, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Institut Pasteur de Lille).

1.1. Activité antivirale des 3 espèces de *Juncus* sélectionnées contre le HCoV-229E

L'étude a été initiée en réalisant un premier criblage de l'activité antivirale des 3 espèces de *Juncus* sélectionnées (*Juncus acutus* L., *Juncus inflexus* L. et *Juncus maritimus* Lam.) contre le HCoV-229E-Luc exprimant le gène rapporteur de la luciférase afin de pouvoir identifier l'extrait ou les extraits le(s) plus actif(s). Pour ce premier essai, seuls les extraits bruts méthanoliques des différentes parties végétales ont été testés à savoir les rhizomes, les tiges et les inflorescences. Les tests d'infection ont été réalisés sur des cellules Huh-7 exprimant la protéase transmembranaire à sérine 2 (TMPRSS2), une enzyme clé impliquée dans l'entrée des coronavirus tels que HCoV-229E et SARS-CoV-2. Elle permet la fusion de la particule virale avec la membrane cellulaire, voie principale d'entrée des coronavirus (Koch et al., 2021 ; Matsuyama et al., 2010 ; Shulla et al., 2011). En absence de la TMPRSS2, le coronavirus pénètre dans la cellule par endocytose et fusion avec la membrane endosomale. D'après la **Figure 18**, nous pouvons constater que les activités antivirales les plus marquées contre le HCoV-229E-Luc ont été respectivement observées pour les extraits bruts méthanoliques des inflorescences fermées de *J. acutus* (localité 1) = JA1 CICE (= JA1 EBMIF dans **Chapitre 3, partie 1**), des rhizomes de *J. acutus* (localité 2) = JA2 RCE (= JA2 EBMR dans **Chapitre 3, partie 1**), des inflorescences ouvertes de *J. acutus* (localité 1) = JA1 OICE (= JA1 EBMIO dans **Chapitre 3, partie 1**), des tiges de *J. acutus* (localité 2) = JA2 SCE (= JA2 EBMT dans **Chapitre 3, partie 1**), et enfin pour celui des rhizomes de *J. inflexus* (localité 3) = JI3 RCE (= JI EBMR dans **Chapitre 3, partie 1**). Ces 5 extraits bruts montrent une activité assez similaire.

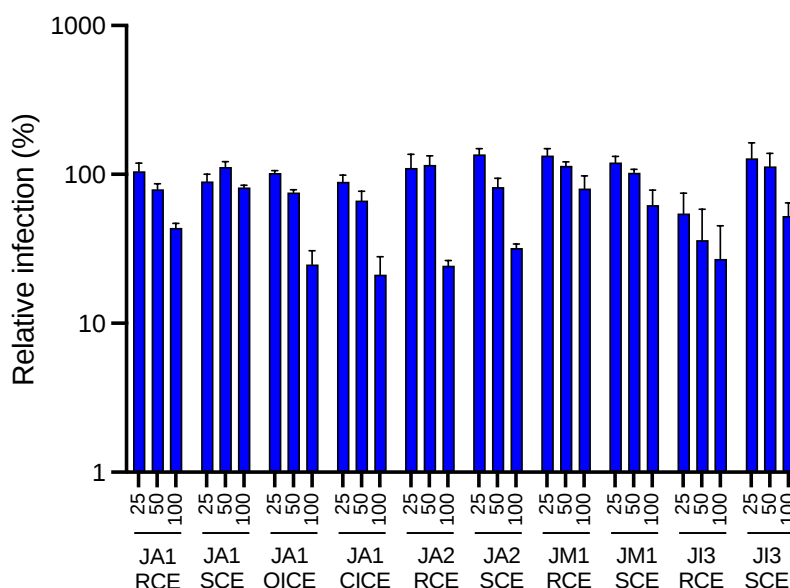


Figure 18. Activité antivirale contre le HCoV-229E-Luc des différents extraits méthanoliques bruts des 3 espèces de *Juncus*. Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM (= erreur-type de la moyenne) de 3 expériences réalisées en triplicata et par rapport au témoin sans extrait (= DMSO) pour lequel une valeur de 100 a été attribuée (Hakem et al., 2023).

1.2. Activité antivirale des sous-extraits des tiges de *J. acutus* contre le HCoV-229E

Les extraits bruts méthanoliques des inflorescences de *J. acutus* ont présenté la meilleure activité antivirale. Toutefois, cette partie fertile de la plante n'est pas l'organe le plus abondant. Ainsi, nous n'avons pas pu poursuivre nos travaux sur les inflorescences. De plus, dans une optique de limiter notre empreinte écologique et de préserver la biodiversité, nous avons aussi fait le choix de ne pas poursuivre notre étude sur l'activité antivirale des rhizomes de *J. acutus* et de *J. inflexus* car cette partie botanique est fortement impliquée dans la réplication végétative de ces espèces et a donc un impact sur leur pérennité. Ainsi, notre étude s'est portée sur les tiges de *J. acutus* collecté en localité 2 en Bretagne.

Afin de pouvoir identifier la(es) molécule(s) responsable de cette activité, nous avons adopté la méthodologie du fractionnement bioguidé. Nous avons tout d'abord commencé par la réalisation d'extractions liquide-liquide (L/L) sur l'extrait brut méthanolique de tiges de *J. acutus* localité 2 en utilisant des solvants de polarité croissante : dichlorométhane (CH_2Cl_2), acétate d'éthyle (AcOEt) et eau (Aq). Les 3 sous-extraits obtenus ont été évalués pour leur activité antivirale contre le HCoV-229E en utilisant le même test employé précédemment. Pour ce test, l'extrait brut méthanolique de *Mallotus oppositifolius* a été utilisé comme témoin positif

car il a démontré une activité antivirale très élevée contre le HCoV-229E (Meunier et al., 2022). Les extraits ont été testés à 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

D'après nos résultats (**Figure 19**), nous pouvons constater que l'activité antivirale contre HCoV-229E la plus remarquable a été observée pour le sous-extrait AcOEt, suivi de l'extrait brut méthanolique, puis du sous-extrait Aqueux (Aq).

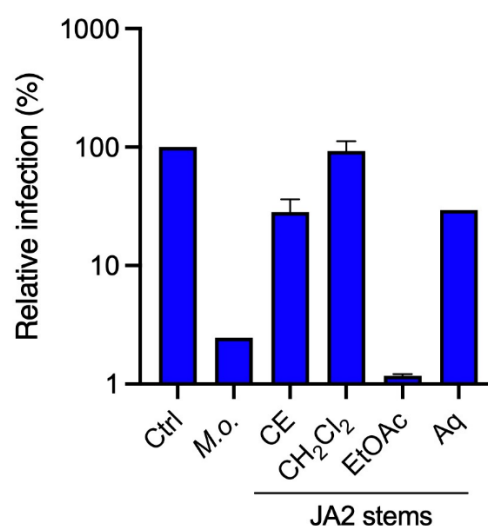


Figure 19. Activité antivirale contre le HCoV-229E-Luc de l'extrait brut méthanolique et des sous-extraits obtenus à partir des tiges de *Juncus acutus* (localité 2). Expériences réalisées sur des cellules Huh-7 exprimant à leur surface la TMPRSS2. Les différents extraits et sous-extraits ont été testés à 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM d'une ou de 2 expériences réalisées en triplicata. Ils sont exprimés par rapport au témoin DMSO (Hakem et al., 2023).

1.3. Analyse des différents sous-extraits des tiges *J. acutus* par UHPLC-UV-MS

En tenant compte de la polarité des sous-extraits AcOEt et Aq, le(s) composé(s) responsable(s) de l'activité anti-HCoV-229E constatée serait (aient) moyennement polaire(s) à polaire(s). D'après la littérature disponible sur la phytochimie des espèces de *Juncus*, les flavonoïdes ont été rarement isolées à partir de ces espèces (Elshamy et al., 2012). Cependant, certaines flavones, notamment la lutéoline et certains de ses dérivés, ont été déjà identifiées dans certaines espèces de *Juncus*, comme *J. acutus* (Behery et al., 2007 ; Elshamy et al., 2012 ; Moustafa et al., 2002 ; Sahli et al., 2017).

Les différents sous-extraits, obtenus à partir des tiges de *J. acutus* (localité 2), ont été analysés par UHPLC-UV-MS (**Figure 20**). Le chromatogramme du sous-extrait AcOEt, obtenu à $\lambda = 254 \text{ nm}$, a montré la présence de 2 pics majoritaires ayant les temps de rétention respectifs : $t_r = 3,42 \text{ min}$ et $t_r = 4,36 \text{ min}$. Les spectres de masse correspondants ont donné les ions

moléculaires m/z $[M - H]^-$ suivants en mode négatif : 447 et 285. La comparaison de ces données avec les temps de rétention et les spectres de masse des témoins de référence a confirmé la présence de la lutéoline ($tr = 4,36$ min ; $MM = 286,24$ g.mol⁻¹ ; C₁₅H₁₀O₆) et d'un de ses dérivés glucosidiques, la lutéoline-7-O-glucoside ($tr = 3,42$ min ; $MM = 448,4$ g.mol⁻¹ ; C₂₁H₂₀O₁₁). Ces 2 flavones pourraient potentiellement être responsables de l'activité antivirale contre le HCoV-229E mise en évidence pour le sous-extrait AcOEt. Ces 2 métabolites spécialisés ont été également détectés sous forme de traces dans le sous-extrait Aq, ce qui pourrait ainsi expliquer l'activité antivirale notée pour ce dernier : activité antivirale proche de celle de l'extrait brut méthanolique et plus importante que celle du sous-extrait CH₂Cl₂. En revanche, le chromatogramme du sous-extrait CH₂Cl₂, obtenu par UHPLC-UV-MS, a montré la présence de dérivés phénanthréniques tel que le juncusol, précédemment reportés dans d'autres espèces de *Juncus* (Bús et al., 2018b ; Kovács et al., 2008).

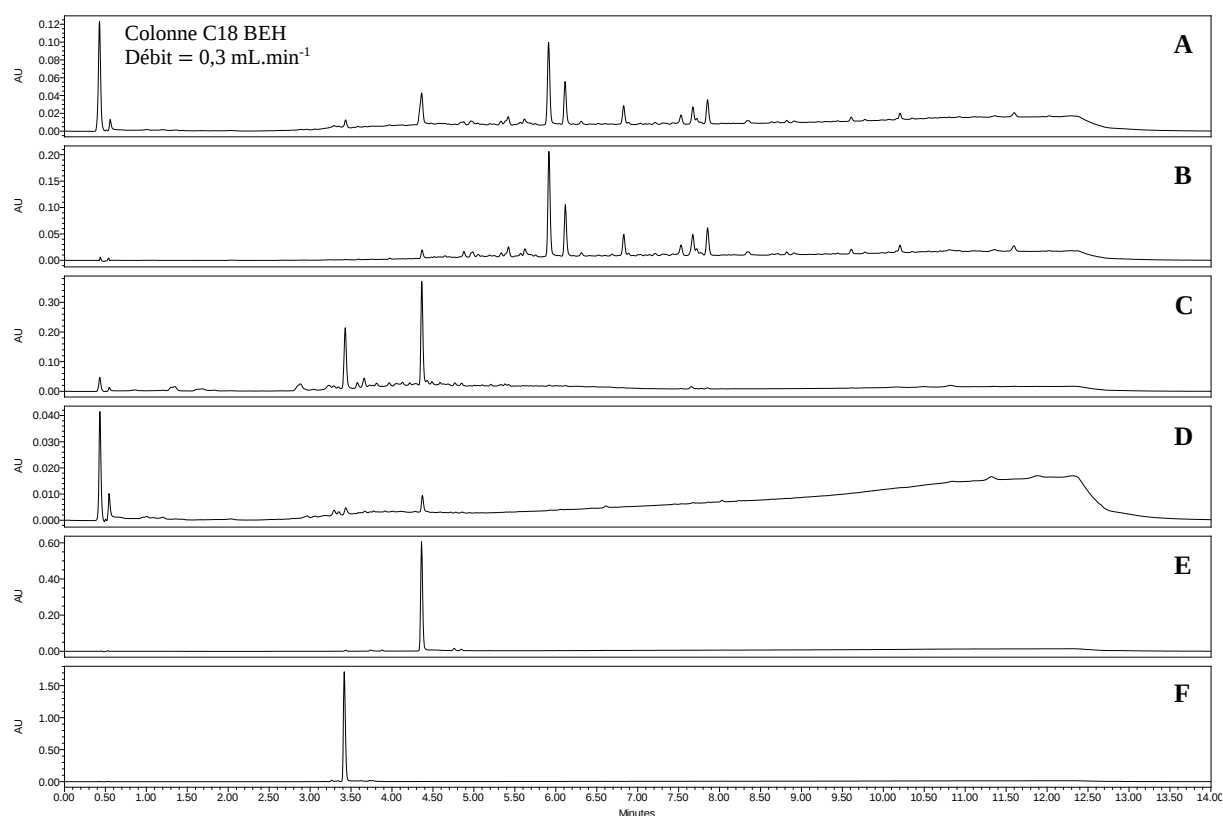


Figure 20. Chromatogrammes obtenus par UHPLC-UV-MS à $\lambda = 254$ nm des différents extraits et sous-extraits des tiges de *Juncus acutus* (localité 2) : (A) extrait brut méthanolique ; (B) sous-extrait CH₂Cl₂ ; (C) sous-extrait AcOEt ; (D) sous-extrait Aq ; ainsi que les 2 témoins de référence (E) lutéoline et (F) lutéoline-7-O-glucoside.

1.4. Fractionnement bioguidé pour l'identification du(es) composé(s) responsable(s) de l'activité antivirale des sous-extraits AcOEt et Aq des tiges de *Juncus acutus* (localité 2) contre le HCoV-229E

À la lumière des résultats d'activité antivirale prometteurs contre le HCoV-229E obtenus, notamment pour les 2 sous-extraits : AcOEt et Aq, nous avons décidé de poursuivre le fractionnement bioguidé pour aboutir à l'identification du(es) composé(s) responsable(s) de cette activité.

1.4.1. Activité antivirale des différentes fractions pré-purifiées obtenues par HPLC semi-préparative à partir du sous-extrait AcOEt des tiges de *Juncus acutus* (localité 2)

Le fractionnement du sous-extrait AcOEt des tiges de *J. acutus* (localité 2) JA2 a été poursuivi en utilisant l'HPLC semi-préparative. 12 fractions pré-purifiées ont été obtenues et soumises aux essais de détermination de l'activité antivirale contre le HCoV-229E comme décrit ci-dessus, en testant 2 concentrations : 10 et 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

La **Figure 21** montre très clairement que la fraction F7 présente l'activité antivirale la plus remarquable par rapport aux autres fractions testées. À une concentration égale à 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, elle induit une réduction d'environ 2 $\log_{10}$ de l'activité luciférase résiduelle.

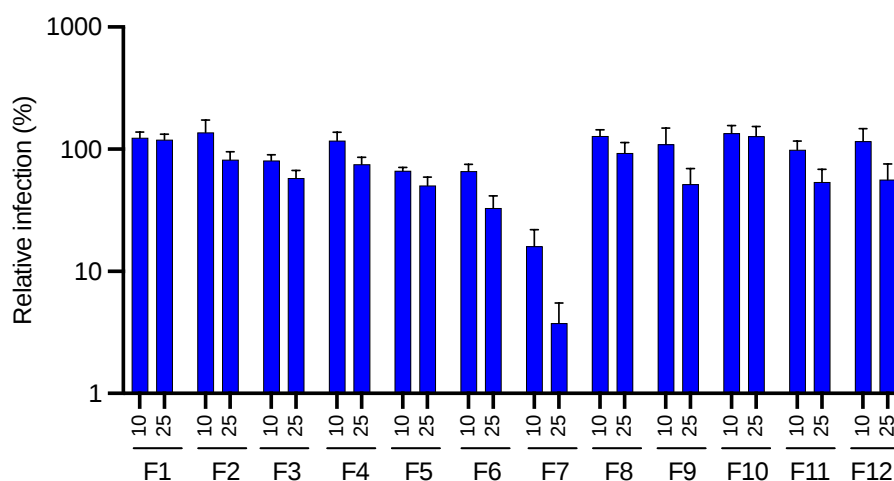


Figure 21. Activité antivirale contre le HCoV-229E-Luc des différentes fractions pré-purifiées (F1 → F12) obtenues par HPLC semi-préparative à partir du sous-extrait AcOEt des tiges de *Juncus acutus* (localité 2). Expériences réalisées sur des cellules Huh-7 exprimant à leur surface la TMPRSS2. Les fractions ont été testées à 10 µg.mL⁻¹ et à 25 µg.mL⁻¹. Les données sont présentées par rapport au témoin DMSO pour lequel une valeur de 100 a été attribuée. Elles sont exprimées en moyenne ± SEM de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata (Hakem et al., 2023).

Afin d'obtenir des informations sur la composition phytochimique des 12 fractions, nous avons réalisé des analyses en UHPLC-UV-MS. Les différents chromatogrammes UV, obtenus à $\lambda = 254$ nm, ont été ensuite comparés à ceux des témoins de référence : lutéoline et lutéoline-7-*O*-glucoside (**Figure 22**). Les analyses montrent que la lutéoline est le composé majoritaire de la fraction bioactive F7. Sa pureté a été estimée à environ 92% sur la base du chromatogramme PDA selon l'algorithme d'intégration 'Apex Track' du logiciel Empower® version 3. La fraction F6 contient également de la lutéoline mais en moindre quantité, ainsi que d'autres composés minoritaires. Les autres fractions pré-purifiées ont été légèrement actives ou inactives. Les chromatogrammes des fractions F8 à F12 ont révélé la présence de certains dérivés phénanthréniques tels que le juncusol C₁₈H₁₈O₂ (tr = 5,88 min et MM = 266,3 g.mol⁻¹). D'autre part, les fractions F1 à F5 renferment principalement la lutéoline-7-*O*-glucoside.

L'ensemble des résultats obtenus confirme notre hypothèse de départ : la lutéoline est la flavone responsable de l'activité antivirale contre le HCoV-229E. En revanche, sous sa forme glycosylée (lutéoline-7-*O*-glucoside), la lutéoline n'est pas active contre le HCoV-229E.

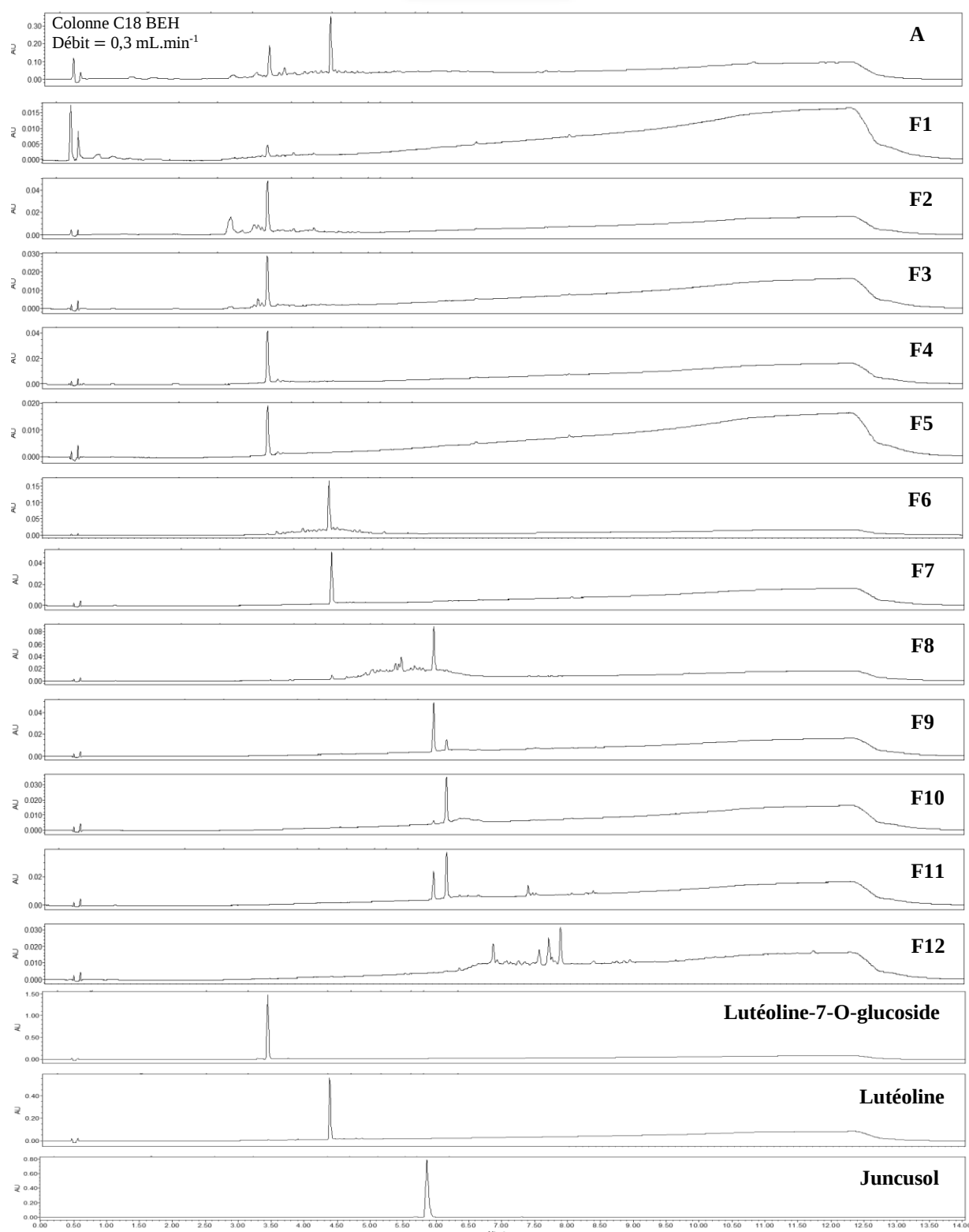


Figure 22. Chromatogrammes obtenus par UHPLC-UV-MS à $\lambda = 254$ nm du (A) sous-extrait AcOEt des tiges de *Juncus acutus* (localité 2) (JA2), des différentes fractions pré-purifiées (F1 → F12) de ce sous-extrait et des témoins de référence : lutéoline-7-O-glucoside, lutéoline et juncusol (à $\lambda = 280$ nm)

1.4.2 Activité antivirale des fractions obtenues par la chromatographie de partage centrifuge (CPC) à partir du sous-extrait Aq des tiges de *Juncus acutus* (localité 2)

Même si le sous-extrait Aq des tiges de JA2 *J. acutus* (localité 2) a montré une activité antivirale contre le coronavirus HCoV-229E moins importante que celle du sous-extrait AcOEt, nous avons, tout de même, voulu identifier le(s) composé(s) responsable(s) de l'activité constatée. Nous avons ainsi poursuivi le fractionnement bioguidé du sous-extrait Aq en utilisant la CPC avec un système ternaire composé d'AcOEt/Isopropanol/Eau (7:3:10). À l'issue de ce fractionnement, les différentes fractions obtenues ont été regroupées en 12 fractions pré-purifiées sur la base de similarités de leurs profils chromatographiques, puis évaluées pour leur potentiel antiviral contre le HCoV-229E. Pour ces expériences, les 12 fractions ont été évaluées à une concentration égale à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ au lieu de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (concentration utilisée pour les fractions du sous-extrait AcOEt) car à cette dernière aucune activité n'a été observée. D'après la **Figure 23**, nous pouvons constater que les fractions F3 et F4 ont montré l'activité anti-HCoV-229E la plus élevée. Les autres fractions sont très peu actives ou inactives. Considérant notre hypothèse initiale, à savoir que la lutéoline, présente dans les sous-extraits AcOEt et Aq de tiges de *Juncus acutus*, pouvait être responsable de l'activité antivirale observée contre le HCoV-229E, nous avons procédé à l'analyse de la composition phytochimique des 2 fractions bioactives par UHPLC-UV-MS. Nos données d'UHPLC-UV-MS (**Figure 24**) ont effectivement confirmé la présence de la lutéoline dans les fractions F3 et F4. Ainsi, l'abondance de la lutéoline dans la fraction F3 pourrait être corrélée avec l'activité antivirale observée pour cette même fraction. Ces résultats sont, en effet, en accord avec ceux obtenus pour le sous-extrait AcOEt.

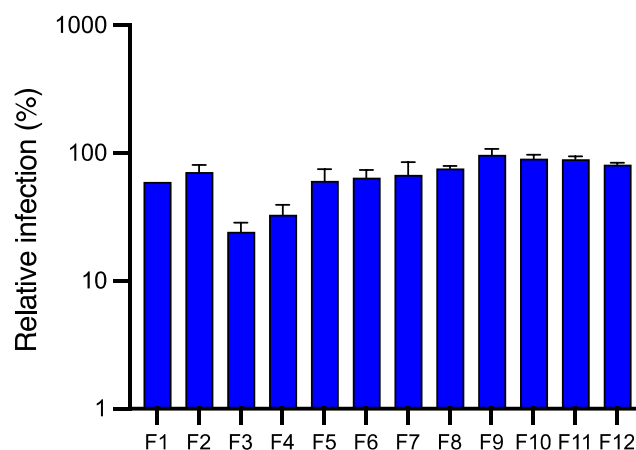


Figure 23. Activité antivirale contre le HCoV-229E-Luc des différentes fractions pré-purifiées (F1 → F12) obtenues à partir du sous-extrait Aq de tiges de *Juncus acutus* (localité 2) (JA2) par CPC. Expériences réalisées sur des cellules Huh-7 exprimant à leur surface la TMPRSS2. Les fractions ont été testées à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Les données sont présentées par rapport au témoin DMSO pour lequel une valeur de 100 a été attribuée. Elles sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata (Hakem et al., 2023)

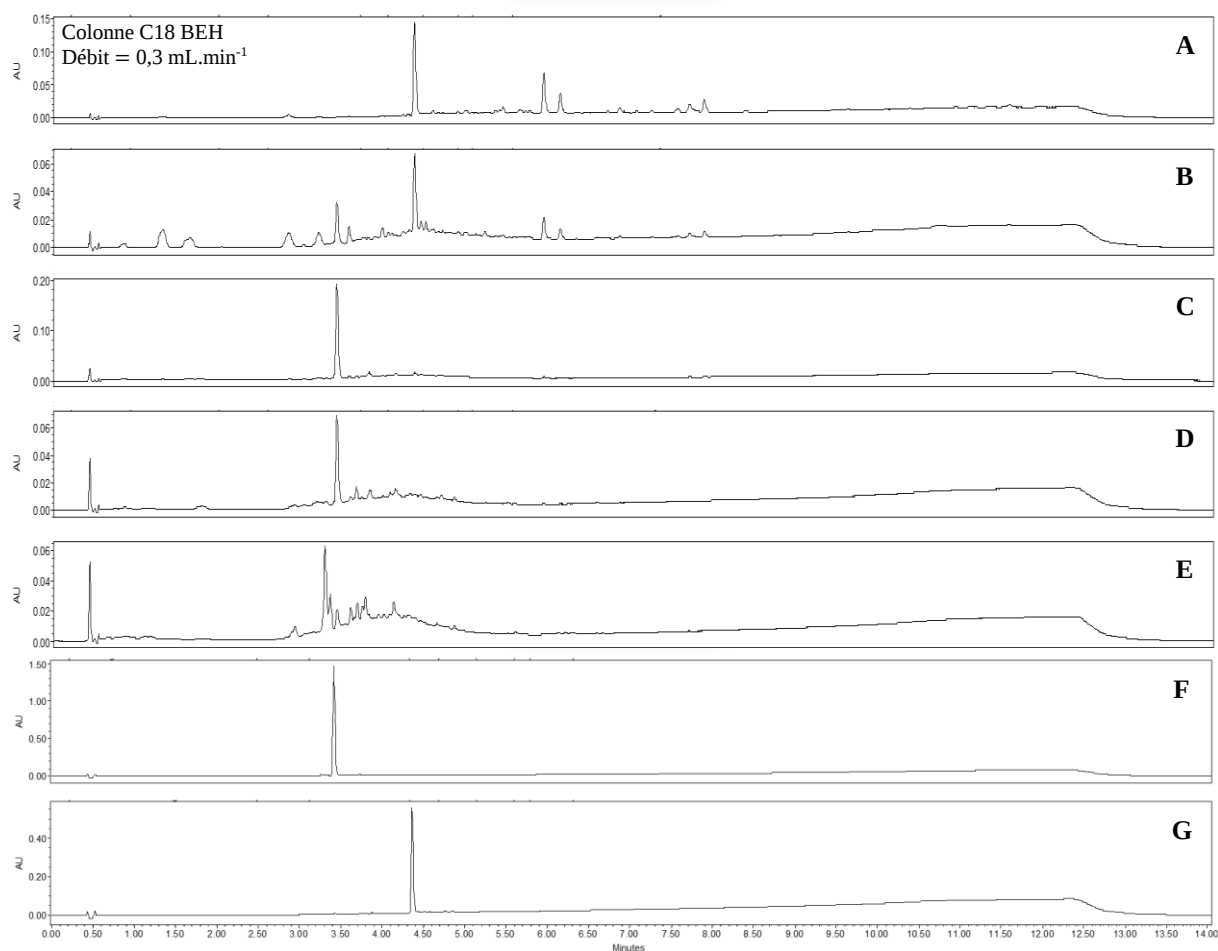


Figure 24. Chromatogrammes obtenus par UHPLC-UV-MS à $\lambda = 254$ nm des fractions pré-purifiées les plus actives obtenues par CPC à partir du sous-extrait Aq de tiges de *Juncus acutus* (localité 2) (JA2), (A) fraction F3, (B) fraction F4, (C) fraction F5, (D) fraction F6 et (E) fraction F7, ainsi que les témoins de référence : (F) lutéoline-7-O-glucoside et (G) lutéoline

L'ensemble des données acquises confirme que la lutéoline est le métabolite spécialisé responsable de l'activité antivirale contre le HCoV-229E des 2 sous-extraits AcOEt et Aq de JA2. Afin d'approfondir notre étude sur le pouvoir antiviral de la lutéoline, des expériences complémentaires sur la toxicité et le potentiel mécanisme d'action de cette dernière action ont été réalisées.

1.5. Activité antivirale de la lutéoline contre le HCoV-229E et sa toxicité sur les cellules Huh-7

Afin de pouvoir confirmer que la lutéoline est bien le composé responsable de l'activité antivirale relevée pour les différentes fractions actives pré-purifiées, des expériences de dose-réponse ont été effectuées. Pour évaluer la toxicité de la lutéoline, les cellules Huh-7 ont été

incubées avec différentes concentrations de la flavone pendant 24 heures, puis la toxicité a été quantifiée en effectuant le test colorimétrique MTS. Nous avons ainsi déterminé une concentration cytotoxique médiane CC_{50} de 33 μM (**Figure 25A**). Pour l'évaluation de l'activité antivirale de la lutéoline, les cellules Huh-7 exprimant ou non la TMPRSS2 ont été inoculées avec des concentrations croissantes en lutéoline. La **Figure 25B** montre que la lutéoline exerce un effet inhibiteur dose-dépendant lors de l'infection par le HCoV-229E-Luc. Ceci confirme que la lutéoline est effectivement le composé actif des sous-extraits de JA2. Les valeurs de la concentration inhibitrice médiane (CI_{50}) déterminées pour la lutéoline ont été similaires dans les cellules Huh-7 exprimant ($CI_{50} = 1,95 \mu\text{M}$) ou pas la TMPRSS2 ($CI_{50} = 1,77 \mu\text{M}$), soulignant ainsi que, quel que soit la voie d'entrée, la lutéoline présente une activité antivirale contre le HCoV-229E. L'ensemble de ces données nous a permis de calculer les indices de sélectivité (IS) respectifs : 16,9 et 18,6. De plus, à la concentration active, la lutéoline n'est pas toxique (**Figure 25B**).

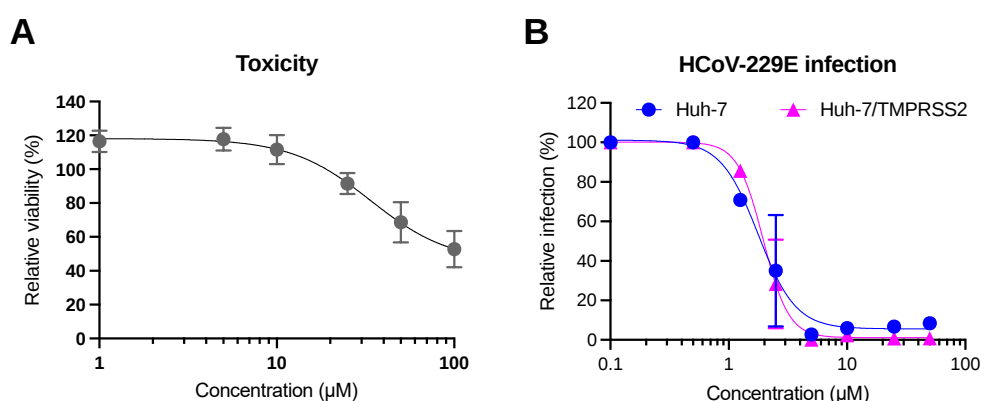


Figure 25. (A) Cytotoxicité de la lutéoline sur les cellules Huh-7 (B) Activité antivirale de la lutéoline contre le HCoV-229E-Luc dans les cellules Huh-7 exprimant (courbe en rose) ou pas (courbe en bleu) à leur surface la TMPRSS2. Les résultats sont exprimés par rapport au témoin pour lequel une valeur de 100 % (viabilité ou infection) a été attribuée. Ils sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata (Hakem et al., 2023)

1.6. Mécanisme d'action de la lutéoline contre le HCoV-229E

Afin d'identifier à quelle étape du cycle viral la lutéoline interfère, nous avons réalisé une cinétique (*time of addition assay*) au cours de laquelle la lutéoline a été appliquée à différents moments de l'infection à une concentration égale à 10 μM (**Figure 26A**). Pour ces expériences, différents témoins ont été employés :

- le camostat, un inhibiteur de la TMPRSS2 qui inhibe l'entrée des virus ;

- le GC376 (antiviral à large spectre), un inhibiteur de la protéase 3C-like (3CL^{pro} ou M^{pro}) qui inhibe la réplication des coronavirus et des picornavirus ;
- et le remdesivir, un inhibiteur de l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) qui inhibe également le processus de réplication.

Les résultats illustrés par la **Figure 26B** montre clairement que la lutéoline est plus active quand elle est ajoutée à l'étape de post-inoculation (PI) que ce soit à 1 h PI ou à 2 h PI, comme avec le GC376 et le remdesivir. L'ensemble de ces résultats indique que la lutéoline est un inhibiteur de l'étape de réplication du coronavirus HCoV-229E.

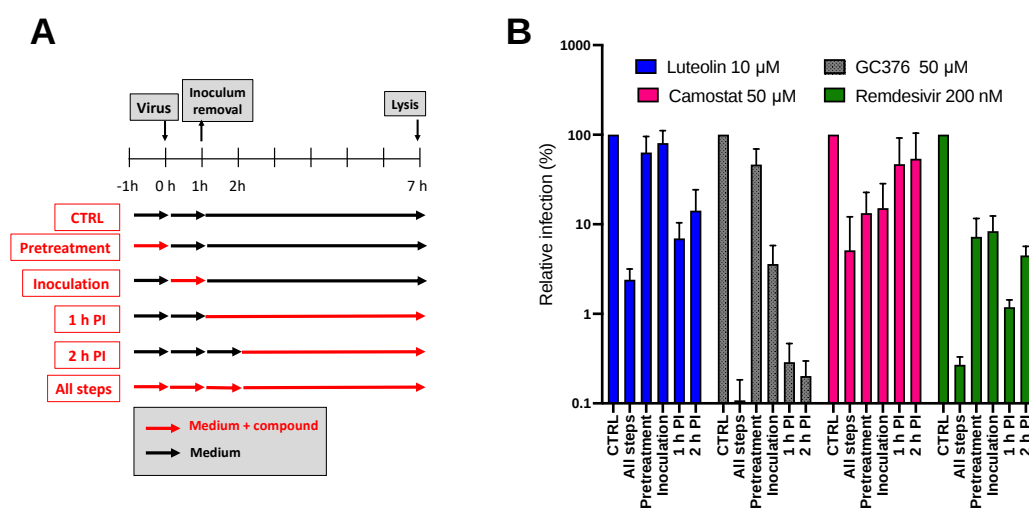


Figure 26. Mécanisme d'action de la lutéoline contre le coronavirus HCoV229E (A) Représentation schématique de l'expérience de *time of addition assay* (B) Expériences de *time of addition assay*, dans des cellules Huh-7 exprimant la TMPRSS2 et inoculées avec le HCoV-229E-Luc, de la lutéoline à 10 µM et des différents témoins : camostat à 50 µM, GC376 à 50 µM et remdesivir à 200 nM. Les résultats sont exprimés par rapport au témoin pour lequel une valeur de 100 % (viabilité ou infection) a été attribuée. Ils sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata (Hakem et al., 2023)

1.7. Activité antivirale de la lutéoline contre les coronavirus SARS-CoV-2 et MERS-CoV

Au regard des résultats encourageants obtenus pour la lutéoline envers le coronavirus HCoV-229E, nous avons décidé d'étudier le potentiel antiviral de cette dernière envers les betacoronavirus hautement pathogènes, à savoir le SARS-CoV-2 et le MERS-CoV. Pour évaluer l'activité antivirale contre ces deux virus, différents modèles cellulaires ont été employés : les cellules Vero81-derived F1G-red pour les tests contre le SARS-CoV-2 et les cellules Calu-3 pour les essais contre le MERS-CoV. Comme décrit précédemment, la lutéoline

a été testée à différentes concentrations (concentrations croissantes) et les témoins, le GC376 et le remdesivir, ont été employés respectivement pour le SARS-CoV-2 et le MERS-CoV. D'après la **Figure 27**, nous pouvons remarquer que les 2 témoins, le GC376 et le remdesivir, inhibent respectivement le SARS-CoV-2 et le MERS-CoV. Cependant, la lutéoline n'a montré aucune inhibition de l'infection contre ces deux virus *in vitro*. L'ensemble de nos résultats montre que la lutéoline est un inhibiteur spécifique de la réplication du coronavirus HCoV-229E.

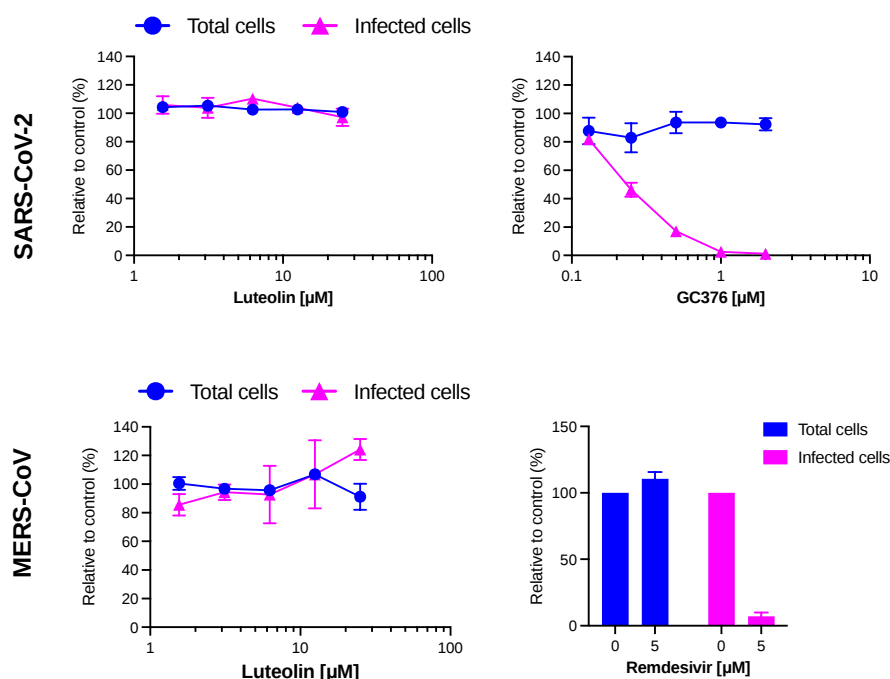


Figure 27. Évaluation de l'activité antivirale de la lutéoline contre les coronavirus SARS-CoV-2 et MERS-CoV. Les résultats sont présentés en pourcentage d'infection par rapport au témoin DMSO. Ils sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM de 2 expériences indépendantes réalisées en triplicata (Hakem et al., 2023)

1.8. Discussion et conclusions sur la partie étude de l'activité antivirale

À travers cette étude, nous avons cherché à explorer le potentiel antiviral d'espèces de *Juncus*, collectées dans différentes localités en France selon des critères écologiques et chimiotaxonomiques, contre les coronavirus. Ce travail a été initié suite aux résultats obtenus dans le cadre de thèse en cotutelle du Dr Ramla Sahli (soutenue en 2017). L'activité antivirale du *Juncus maritimus*, une plante halophyte largement distribuée en Tunisie et en France, avait été mise en évidence contre le virus de l'hépatite C appartenant à la famille des Flaviviridae. Grâce à l'approche du fractionnement bioguidé, le dehydrojuncusol, un dérivé phénanthrénique isolé de cette plante, avait été identifié comme étant la molécule responsable de cette activité

antivirale, agissant comme un inhibiteur de la réplication du virus ciblant la protéine non structurale NS5A (Sahli et al., 2017 ; Sahuc et al., 2019). Dans le cadre de notre étude visant à identifier des molécules d'origine naturelle actives contre les coronavirus, nous avons montré à nouveau que certaines espèces de *Juncus* présentaient un potentiel antiviral, comme *J. acutus*. Cependant, le composé actif identifié n'est plus un dérivé phénanthrénique, mais la lutéoline, une flavone très commune dans le règne végétal. On la retrouve par exemple chez *Artemisia afra*, plante utilisée traditionnellement pour soigner certaines affections respiratoires et dont les effets bronchodilatateurs ont été montré dans certaines études. Ce flavonoïde sous sa forme aglycone s'est montré actif contre l'alphacoronavirus HCoV-229-E et semble agir à l'étape de réplication du virus. Par contre, il s'est montré inactif contre les betacoronavirus, SARS-CoV-2 et MERS-CoV. Son activité antivirale contre d'autres virus avait par ailleurs déjà été mise en évidence (influenza A, VHV, entérovirus...). Sa bonne tolérance dans divers essais cliniques et son activité antivirale démontrée pourraient en faire une molécule candidate pour lutter contre le virus HCoV-229-E. Son mécanisme d'action reste cependant à approfondir, tout comme le développement d'une forme galénique adaptée. Il pourrait être intéressant de tester le potentiel antiviral de la lutéoline contre les coronavirus touchant les animaux d'élevage.

2. Étude de l'activité antibactérienne des rhizomes de *J. inflexus* (JI3) contre les bactéries à Gram positif et en particulier contre l'isolat clinique résistant à la méticilline *Staphylococcus aureus* T28.1

Un screening préliminaire a été réalisé en 2019 pour déterminer l'activité antibactérienne de *Juncus acutus* localité 2 (JA2) et *Juncus inflexus* localité 3 (JI3) contre 34 souches bactériennes et 2 souches fongiques pré-sélectionnées. Ces travaux ont été initiés dans le cadre du stage de M2 de Rawen Ben Malek et en collaboration avec la regrettée le Dr Christel Neut et son équipe (Inserm U1286 Infinite, Université de Lille). Ce premier criblage consistait à déterminer des valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI) pour les extraits bruts méthanoliques et les différents sous-extraits (CH_2Cl_2 , AcOEt et Aq) des *Juncus* étudiés en utilisant la méthode de dilution en milieu solide sur agar. La gamme de concentrations testée pour les différents extraits est comprise entre 1250 à 39,06 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Les 36 souches bactériennes et fongiques ont été ensemencées à l'aide d'un inoculateur à têtes multiples appelé également appareil de Steers. Les premiers résultats obtenus (**Tableau 8**) ont montré que l'extrait brut méthanolique et le sous-extrait CH_2Cl_2 des rhizomes de *J. inflexus* (JI3) présentaient l'activité antimicrobienne la plus marquée, en particulier contre certaines souches de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Enterococcus* et *Candida*, avec une CMI de 39,06 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Une étude antérieure menée par une équipe hongroise a également montré que le sous-extrait CH_2Cl_2 des rhizomes de *J. inflexus* était très actif contre des souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline. Un diamètre d'inhibition égale à $14,6 \pm 1,2$ mm a été déterminé (Tóth et al., 2016).

En revanche, les souches bactériennes à Gram négatif testées semblent être moins sensibles au sous-extrait CH_2Cl_2 . De plus, le sous-extrait AcOEt de JI3 est beaucoup moins actif et celui aqueux est inactif. Concernant le *J. acutus* localité 2 (JA2), seul son sous-extrait CH_2Cl_2 semble avoir une activité antibactérienne, notamment contre des souches de *Staphylococcus* et de *Streptococcus*.

Chapitre 2 : Résultats et discussion : Étude de l'activité antibactérienne de *Juncus inflexus* contre les bactéries à Gram positif : cas de l'isolat clinique résistant à la méticilline *Staphylococcus aureus* T28.1

Tableau 8. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$) déterminées pour les extraits bruts méthanoliques et les sous-extraits des rhizomes de *Juncus inflexus* localité 3 (JI3) et les tiges de *Juncus acutus* localité 2 (JA2) contre les différentes souches bactériennes et fongiques sélectionnées en utilisant la méthode de dilution en milieu solide sur agar. Les différents extraits et sous-extraits ont été testés à une gamme de concentrations finales allant de 1250 à $39,06 \mu\text{g.mL}^{-1}$ obtenue par des dilutions successives au demi.

N°	Souches fongiques et bactériennes	CMI des antibiotiques et des antifongiques ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)							
						Rhizomes de <i>Juncus inflexus</i> L. (JI3)				Tiges de <i>Juncus acutus</i> L. localité 2 (JA2)			
						EB	CH ₂ Cl ₂	AcOEt	Aq	EB	CH ₂ Cl ₂	AcOEt	Aq
	Levures	AMB	FLC	SER	VRC								
1	<i>Candida albicans</i> 10286	4	32	> 64	ND	39,06	39,06	156,25	NA	NA	39,06	NA	NA
2	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0,5	8	64	S	39,06	39,06	156,25	NA	NA	39,06	NA	NA
	Bactéries à Gram positif	GEN	VAN	AMX	OXA								
3	<i>Enterococcus faecalis</i> C159-6	4	0,5	64		39,06	39,06	156,25	NA	NA	39,06	NA	NA
4	<i>Enterococcus</i> sp. 8153	2	4	2		39,06	39,06	156,25	NA	NA	NA	NA	NA
6	<i>Staphylococcus aureus</i> 8146	0,5	2	4		39,06	39,06	156,25	NA	NA	NA	NA	NA
7	<i>Staphylococcus aureus</i> 8241	0,5	2	16	S	39,06	39,06	156,25	NA	NA	NA	NA	NA
8	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0,25	2	0,125	S	39,06	39,06	156,25	NA	NA	39,06	NA	NA
9	<i>Staphylococcus aureus</i> T28.1	0,5	2	16	R	39,06	39,06	156,25	NA	NA	NA	NA	NA
10	<i>Staphylococcus aureus</i> T17-4	0,5	2	1		39,06	39,06	156,25	NA	NA	NA	NA	NA
11	<i>Staphylococcus epidermis</i> T46A1	0,06	2	0,5		39,06	39,06	78,13	NA	NA	39,06	0,625	NA
12	<i>Staphylococcus epidermis</i> T19A1	32	2	8		39,06	39,06	156,25	NA	NA	39,06	NA	NA
13	<i>Staphylococcus epidermis</i> T21A5	0,06	2	16		39,06	39,06	156,25	NA	NA	39,06	NA	NA
14	<i>Staphylococcus warneri</i> T12A12	0,06	2	1		39,06	39,06	156,25	NA	NA	39,06	NA	NA
15	<i>Staphylococcus warneri</i> T26A1	0,06	2	0,25		39,06	39,06	156,25	NA	NA	NA	NA	NA
16	<i>Streptococcus pettenkoferi</i> T47.A6	0,06	2	0,25		39,06	39,06	156,25	NA	NA	39,06	0,625	NA
17	<i>Streptococcus agalactiae</i> T38.2	2	0,5	0,06		39,06	39,06	156,25	NA	78,13	39,06	312,5	NA
18	<i>Streptococcus agalactiae</i> T53C9	1	0,5	0,03		39,06	39,06	156,25	NA	NA	39,06	NA	NA
19	<i>Streptococcus pyogenes</i> 16138	0,125	0,25	0,03		39,06	39,06	156,25	NA	NA	39,06	312,5	NA

Chapitre 2 : Résultats et discussion : Étude de l'activité antibactérienne de *Juncus inflexus* contre les bactéries à Gram positif : cas de l'isolat clinique résistant à la méticilline *Staphylococcus aureus* T28.1

20	<i>Streptococcus pyogenes</i> 16135	0,125	0,25	0,03		39,06	39,06	39,06	NA	156,25	39,06	156,25	NA
21	<i>Corynebacterium striatum</i> T40A3	0,03	1	0,25		39,06	39,06	39,06	NA	NA	39,06	NA	NA
	Bactéries à Gram négatif												
22	<i>Citrobacter freundii</i> 11041	0,25	> 64	2		62,5	62,5	156,25	NA	NA	39,06	NA	NA
23	<i>Citrobacter freundii</i> 10268	NA	NA	NA		62,5	NA	NA	NA	NA	39,06	NA	NA
24	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,5	> 64	16		NA	NA	156,25	NA	NA	NA	NA	NA
25	<i>Escherichia coli</i> T20A1	0,25	> 64	> 64		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
26	<i>Escherichia coli</i> 8138	0,5	> 64	> 64		NA	156,25	NA	NA	NA	NA	NA	NA
27	<i>Escherichia coli</i> 8157	0,5	> 64	> 64		312,5	39,06	NA	NA	NA	39,06	NA	NA
28	<i>Enterobacter aerogenes</i> 9004	0,5	> 64	> 64		NA	312,5	NA	NA	NA	NA	NA	NA
29	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 10270	8	> 64	> 64		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
30	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 11016	0,25	> 64	> 64		312,5	312,5	NA	NA	NA	NA	NA	NA
31	<i>Proteus mirabilis</i> 11060	0,5	> 64	2		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
32	<i>Proteus mirabilis</i> T28-3	0,5	> 64	1		NA	39,06	156,25	NA	NA	NA	NA	NA
33	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 8131	1	> 64	> 64		78,13	39,06	312,5	NA	NA	39,06	NA	NA
34	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27583	2	> 64	> 64		312,5	39,06	NA	NA	NA	39,06	NA	NA
35	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 8129	0,03	> 64	> 64		156,25	78,13	156,25	NA	NA	NA	NA	NA
36	<i>Salmonella</i> sp. 11033	0,25	> 64	2		NA	39,06	156,25	NA	NA	39,06	NA	NA

Amphotéricine B (AMB) : S ≤ 1 µg.mL⁻¹ et R > 1 µg.mL⁻¹ ; Amoxicilline (AMX) : S ≤ 4 µg.mL⁻¹ et R > 16 µg.mL⁻¹ ; Fluconazole (FLC) : S ≤ 2 µg.mL⁻¹ et I = 4 et R > 4 µg. mL⁻¹ ; Gentamicine (GEN) : S ≤ 4 µg.mL⁻¹ et R > 8 µg.mL⁻¹ ; Sertaconazole (SER) : points critiques cliniques (*clinical breakpoints*) non déterminés ; Vancomycine (VAN) : S ≤ 4 µg. mL⁻¹ et R > 16 µg. mL⁻¹ ; Voriconazole (VRC) : S ≤ 0,06 et I ∈ [0,125-0,25] et R > 0,25 (EUCAST, 2023) et Oxacilline (OXA): S ≤ 2 et R > 2 (Cavallo et al., 2005 ; EUCAST, 2019 ; EUCAST 2023).

NA : non actif ; ND : non déterminé ; S : sensible ; I : intermédiaire et R : résistant

À l'issue de ces résultats, nous avons fait le choix de poursuivre notre étude de l'activité antibactérienne contre des souches bactériennes à Gram positif avec le sous-extrait CH₂Cl₂ de *J. inflexus* localité 3 (JI3) et d'adopter la méthodologie du fractionnement bioguidé pour identifier le(s) composé(s) responsable(s) de l'activité constatée.

2.1. Activité antibactérienne du sous-extrait CH₂Cl₂ des rhizomes de *J. inflexus* (JI3)

Nous avons décidé dans un premier temps de conforter et de compléter les résultats préliminaires obtenus pour le sous-extrait CH₂Cl₂ grâce à la méthode de dilution en milieu solide sur agar. Dans ce but, nous avons réalisé des expériences en microplaques 96 puits pour vérifier les CMI en utilisant la méthode de microdilution en milieu liquide (milieu nutritif de culture bactérienne) et déterminer les CMBs (concentrations minimales bactéricides) envers 3 familles bactériennes à Gram positif distinctes d'*Enterococcus* sp., de *Streptococcus* sp. et de *Staphylococcus aureus*. Pour ces expériences, nous avons décidé d'élargir le panel des souches bactériennes en rajoutant d'autres souches issues de la collection d'isolats cliniques de notre collègue, le Dr Chistel Neut. Les expérimentations en microplaques ont l'avantage de permettre de tester de petites quantités d'échantillons. Le sous-extrait CH₂Cl₂ des rhizomes de JI3 a été testé à une gamme de concentrations allant de 1250 µg.mL⁻¹ à 0,61 µg.mL⁻¹ préparée grâce à des dilutions successives au demi.

D'après le **Tableau 9**, nous remarquons que les valeurs de CMI les plus basses ont été enregistrées pour les souches de *Streptococcus pyogenes* 16102 et 16114 et pour l'*Enterococcus faecalis*C159-6 (CMI = 9,77 µg.mL⁻¹). À un moindre degré, nous avons déterminé une CMI de 19,53 µg.mL⁻¹ contre 3 souches d'*Enterococcus faecalis* et 4 souches de *Staphylococcus aureus*. Une fois les CMBs du sous-extrait CH₂Cl₂ des rhizomes de JI3 déterminées, nous avons pu calculer le rapport CMB/CMI. Grâce à ce dernier, l'activité antibactérienne peut être qualifiée de bactéricide (CMB/CMI ≤ 4) ou de bactériostatique (CMB/CMI > 4) (Davis, 2018 ; Levison, 2004). L'ensemble de nos résultats montre que le sous-extrait CH₂Cl₂ est doté d'un potentiel bactéricide assez prometteur contre la majorité des souches bactériennes testées. Par contre, pour 3 souches d'*Enterococcus*, il inhibe leur croissance sans provoquer leur mort.

Remarque : La manipulation des souches de *Streptococcus pyogenes* a été parfois difficile car ce sont des souches assez sensibles. En effet, au cours des 3 expériences de détermination de la CMI en microplaques, les souches de *S. pyogenes* 16136 et 16142 (non montrées au niveau du **Tableau 9**) n'ont pas poussé alors qu'elles poussent correctement dans le tube de culture contenant du milieu WW. Par ailleurs, contrairement aux autres souches de *S. pyogenes*, les souches de *S. pyogenes* 16102 et 16114 ont poussé tardivement en microplaques (au bout de 48 h). De ce fait, cette variabilité pourrait impacter les valeurs de CMI et de CMB déterminées.

Chapitre 2 : Résultats et discussion : Étude de l'activité antibactérienne de *Juncus inflexus* contre les bactéries à Gram positif : cas de l'isolat clinique résistant à la méticilline *Staphylococcus aureus* T28.1

La sensibilité de toutes les souches employées vis-à-vis des antibiotiques (CMI des antibiotiques en $\mu\text{g.mL}^{-1}$) est en cours de détermination.

Suite à ces résultats, l'étude de la composition phytochimique du sous-extrait CH_2Cl_2 des rhizomes de *Juncus inflexus* localité 3 (JI3) a été initiée par UHPLC-UV-MS. En outre, compte tenu du caractère apolaire de ce sous-extrait, la(es) molécule(s) potentiellement antibactérienne(s) l'est/le sont aussi. D'après la littérature existante sur la phytochimie et les activités biologiques de *Juncus inflexus*, les dérivés phénanthréniques pourraient être la classe de métabolites spécialisés responsables de l'activité déterminée (Hanawa et al., 2002 ; Tóth et al., 2016).

Tableau 9. Concentrations minimales inhibitrices (CMIs), concentrations minimales bactéricides (CMBs) et rapports CMB/CMI déterminés pour le sous-extrait CH_2Cl_2 des rhizomes de *Juncus inflexus* L. (JI3) contre les isolats cliniques à Gram positif sélectionnés. Ces données sont le résultat de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata.

Souches bactériennes	CMIs des antibiotiques ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CMB ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Rapport CMB/CMI
	GEN	VAN	AMX	OXA			
<i>Enterococcus</i> sp.8153	2	4	2		39,06	156,25	4
<i>Enterococcus faecalis</i> C159-6	4	0,5	64		9,77	39,06	4
<i>Enterococcus faecalis</i> T26B15	—	—	—		39,06	78,13	2
<i>Enterococcus faecalis</i> T34.2	S > 2	S	S 1,5		39,06	78,13	2
<i>Enterococcus faecalis</i> T39C11	S	S	S		39,06	78,13	2
<i>Enterococcus faecalis</i> T34A4	—	—	—		19,53	156,25	8
<i>Enterococcus faecium</i> 09001	R	R	R		19,53	156,25	8
<i>Enterococcus faecium</i> 09002	R	R	R		19,53	312,5	16
<i>Streptococcus agalactiae</i> T38.2	2	0,5	0,06		312,5	312,5	1
<i>Streptococcus agalactiae</i> T53C9	1	0,5	0,03		312,5	312,5	1
<i>Streptococcus pyogenes</i> 16102	—	—	R		9,77	9,77	1
<i>Streptococcus pyogenes</i> 16114	—	—	R		9,77	19,53	2
<i>Streptococcus pyogenes</i> 16135	0,125	0,25	0,03		78,13	156,25	2
<i>Streptococcus pyogenes</i> 16137	—	—	R		39,06	78,13	2

<i>Streptococcus pyogenes</i> 16138	—	—	R		39,06	39,06	1
<i>Streptococcus pyogenes</i> 16139	—	—	R		78,13	78,13	1
<i>Streptococcus pyogenes</i> 16140	—	—	R		39,06	39,06	1
<i>Staphylococcus aureus</i> 8241	S 0,5	S 2	S 16	S	19,53	39,06	2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	S 0,25	S 2	S 0,125	S	19,53	78,13	4
<i>Staphylococcus aureus</i> T25.10	S	S	R	R	19,53	39,06	2
<i>Staphylococcus aureus</i> T28.1	S 0,5	S 2	R 16	R	19,53	39,06	2

Amoxicilline (AMX) : $S \leq 4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $R > 16 \mu\text{g.mL}^{-1}$; Gentamicine (GEN) : $S \leq 4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $R > 8 \mu\text{g.mL}^{-1}$; Vancomycine (VAN) : $S \leq 4 \mu\text{g. mL}^{-1}$ et $R > 16 \mu\text{g. mL}^{-1}$ (EUCAST, 2023) et Oxacilline (OXA): $S \leq 2$ et $R > 2$ (Cavallo et al., 2005 ; EUCAST, 2019 ; EUCAST 2023).

— : en cours de détermination ; S : sensible et R : résistant

2.2. Fractionnement et composition phytochimique du sous-extrait CH_2Cl_2 des rhizomes de *J. inflexus* (JI3)

Les analyses menées par UHPLC-UV-MS du sous-extrait CH_2Cl_2 ont mis en évidence la présence de 4 pics majoritaires qui présentent un maximum d'absorbance à $\lambda = 280 \text{ nm}$: le composé 6 (tr = 5,59 min ; $m/z [\text{M} + \text{H}]^+ = 253$), le composé 8 (tr = 5,88 min ; $m/z [\text{M} + \text{H}]^+ = 267$), le composé 9 (tr = 6,65 min ; $m/z [\text{M} + \text{H}]^+ = 267$) et le composé 11 (tr = 6,75 min ; $m/z [\text{M} + \text{H}]^+ = 265$) (**Figure 28A**). Ces analyses sont basées essentiellement sur la comparaison des temps de rétention et des spectres UV et de masse en mode positif des différents composés avec ceux des témoins existants au laboratoire de pharmacognosie de Lille obtenus lors d'études antérieures (thèse en cotutelle du Dr Ramla Sahli soutenue en 2017).

En se basant sur la comparaison des temps de rétention, des spectres UV et de masse des composés 6 et 8 avec ceux des témoins utilisés, effusol et juncusol, purifiés à partir des rhizomes de *J. maritimus* collecté en Tunisie en 2014, nous pouvons émettre l'hypothèse que les composés 6 et 8 correspondent respectivement à l'effusol ($\text{MM} = 252,31 \text{ g.mol}^{-1}$) et au juncusol ($\text{MM} = 266,33 \text{ g.mol}^{-1}$). L'ensemble de nos données sont ainsi en accord avec la littérature sur les espèces de *Juncus* et en particulier avec l'étude de l'équipe hongroise menée sur *J. inflexus* collecté au niveau de la Grande Plaine méridionale en Hongrie en 2014 (Tóth et al., 2016). Notre sous-extrait CH_2Cl_2 de *J. inflexus* collecté en France dans la région bordelaise est enrichi en dérivés phénanthréniques pouvant être responsables de l'activité antibactérienne.

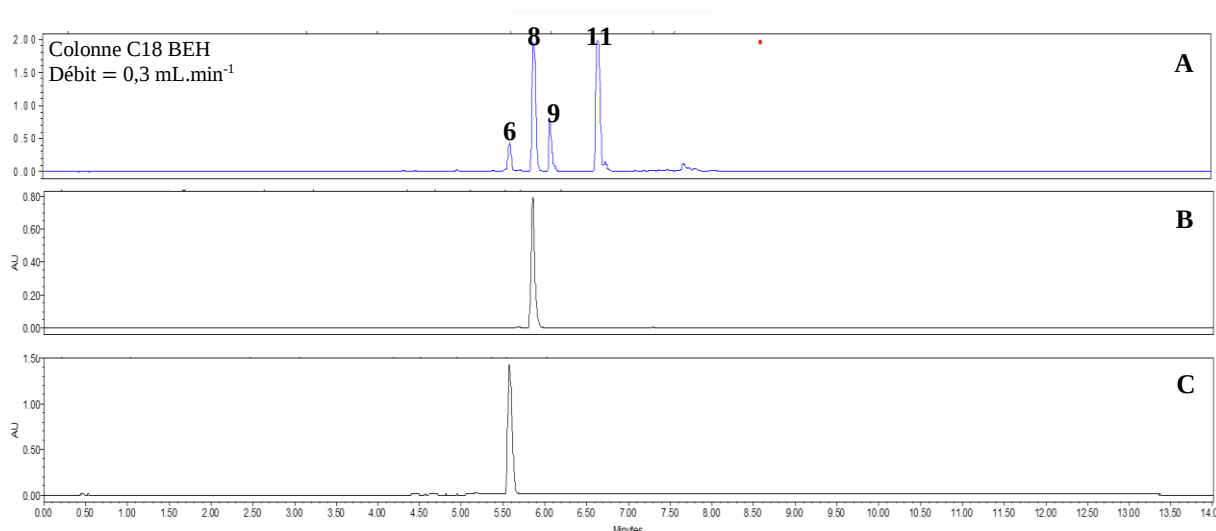


Figure 28. Chromatogrammes obtenus par UHPLC-UV-MS à $\lambda = 280$ nm du (A) sous-extrait CH_2Cl_2 de *J. inflexus* localité 3 (JI3) et des témoins de référence (B) juncusol, (C) effusol

2.2.1. Fractionnement du sous-extrait DCM des rhizomes de *Juncus inflexus* par CPC

En plus des composés majoritaires identifiés, le sous-extrait CH_2Cl_2 des rhizomes de *J. inflexus* contient aussi de nombreux composés minoritaires (**Figure 28A**) qui pourraient participer au pouvoir antibactérien du sous-extrait, mais qui pourraient aussi interférer avec notre processus de purification des composés phénanthréniques. Nous avons ainsi, à ce stade, décidé de poursuivre le fractionnement bioguidé en réalisant une CPC sur le sous-extrait antibactérien. Le système quaternaire Arizona P, composé de *n*-Heptane/AcOEt/MeOH/ H_2O (6:5:6:5, v/v), a été retenu pour cette expérience car il nous a permis d'obtenir un coefficient de partage proche de 1 ($K_d = 1,068$) pour le juncusol (molécule de référence choisie) assurant ainsi une bonne répartition des composés entre les 2 phases du système. Les composés qui sortent en premier lors de l'élution (à partir de 27 min) sont des molécules ayant une affinité pour la phase mobile du système Arizona P qui est de nature apolaire. Ces composés sont normalement des composés phénanthréniques (**Figure 29** et **Figure 30B**). À la fin de la CPC, 91 fractions ont été obtenues. Ces dernières ont été rassemblées en 8 fractions pré-purifiées (F'1 $\rightarrow$ F'8) en fonction des similitudes de leurs profils chromatographiques obtenus par UHPLC-UV-MS (**Figure 30**). Les rendements respectifs, calculés par rapport à la quantité totale du sous-extrait CH_2Cl_2 de *J. inflexus* introduite en CPC, sont les suivants : 0,32% ; 13,47% ; 4,69% ; 50,09% ; 1,61% ; 1,40% ; 2,24% et 6,01%.

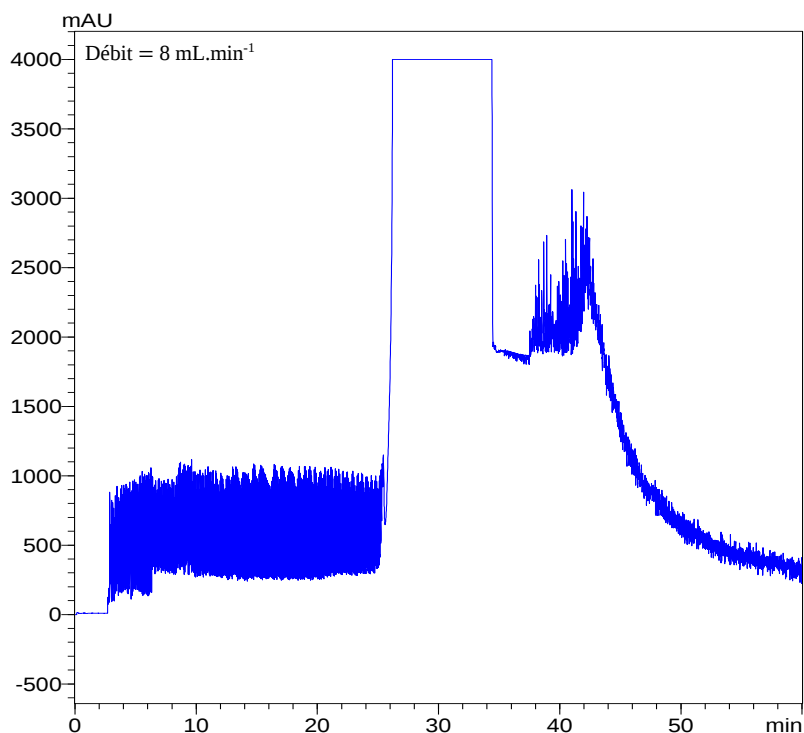


Figure 29. Profil chromatographique de la purification du sous-extrait CH₂Cl₂ des rhizomes de *J. inflexus* (JI3) par CPC avec le système Arizona P à $\lambda = 280$ nm

La fraction présentant le meilleur rendement (50%) est la fraction F'4. L'analyse de son profil chromatographique obtenu par UHPLC-UV-MS (**Figure 30D**) montre qu'elle contient les dérivés phénanthréniques précédemment identifiés dans le sous-extrait CH₂Cl₂ (composés 6, 8, 9 et 11), ainsi qu'un autre composé phénanthrénique désigné comme le composé 12 qui sort juste après le composé 11. Ces mêmes composés commencent à éluer à partir de la fraction F'3, mais sont en mélange avec d'autres molécules, notamment dans les fractions F'3 et F'5 (**Figures 30C, D et E**).

En termes de rendements, nous retrouvons ensuite la fraction F'2 (13,47%). Son chromatogramme obtenu par UHPLC-UV-MS à $\lambda = 280$ nm, met en évidence la présence de 2 pics majoritaires très apolaires avec les temps de rétention respectifs, $t_r = 7,650$ min et $t_r = 7,822$ min. Leur maximum d'absorbance est à $\lambda = 280$ nm. Ces composés pourraient ainsi correspondre à des phénanthrènes plus apolaires. Le développement d'une méthode de séparation en HPLC analytique semble être tout d'abord nécessaire pour cette fraction afin de pouvoir mieux séparer les différents composés qu'elle contient. Une fois la méthode mise au point, le passage à l'échelle semi-préparative en raison de sa faible quantité peut être envisagé pour pouvoir purifier les différents composés et procéder ensuite à la détermination de leurs formules brutes et de leurs structures en réalisant des analyses en HRMS et en RMN.

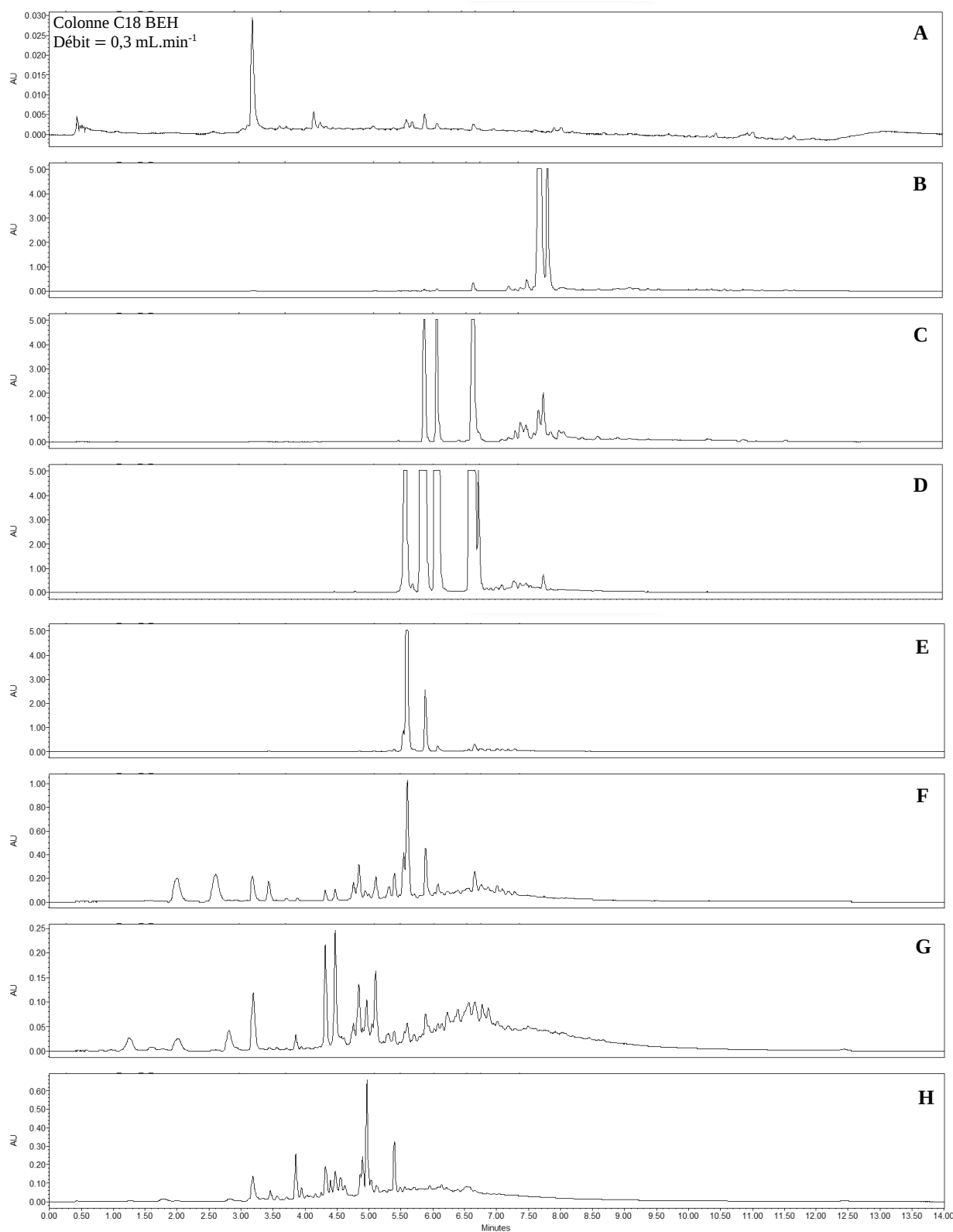


Figure 30. Chromatogrammes obtenus par UHPLC-UV-MS à 280 nm des différentes fractions obtenues par CPC à partir du sous-extrait CH₂Cl₂ des rhizomes de *J. inflexus* localité 3 (JI3). (A) F'1, (B) F'2, (C) F'3, (D) F'4, (E) F'5, (F) F'6, (G) F'7 et (H) F'8

2.2.2. Activité antibactérienne des fractions pré-purifiées obtenues par CPC à partir du sous-extrait CH₂Cl₂ des rhizomes de *J. inflexus* localité 3 (JI3)

Toujours dans la logique de suivre l'activité antibactérienne du sous-extrait CH₂Cl₂ via la méthodologie du fractionnement bioguidé, les 8 fractions pré-purifiées obtenues par CPC ont été, à leur tour, évaluées pour leur potentiel antibactérien contre 12 souches bactériennes à Gram positif utilisées précédemment (*E. faecalis* C159-6, T26B15, T39C11 et *E. faecium* 09001 ; *S. pyogenes* 16135, 16137, 16138 et 16140 ; *S. aureus* 8241, ATCC 6538, T25.10 et T28.1). D'après le **Tableau 10**, nous pouvons remarquer que la plupart des fractions présentent un effet antibactérien envers les souches sélectionnées. Les valeurs des CMI's déterminées pour les différentes fractions étudiées sont assez proches. On note quelques exceptions pour les fractions F'1, F'2 et F'8 peu actives ou inactives contre certaines souches : F'1 contre *E. faecalis* C159-6 et T26B15, *E. faecium* 09001 et *S. pyogenes* 16137 ; F'2 contre *E. faecalis* C159-6 et T39C11, *E. faecium* 09001, *S. aureus* 8241 et *S. aureus* T28.1 ; et F'8 contre *E. faecalis* C159-6.

Remarque : On note une certaine variabilité pour les valeurs des CMI's déterminées à l'œil nu et après l'ajout de l'INT, notamment pour l'isolat clinique *S. pyogenes* 16138 (CMI's à l'œil nu < CMI's à l'INT). Dans ces cas, nous retenons d'une manière générale les valeurs les plus élevées. Il serait toutefois préférable de refaire l'expérience (n = 3) pour confirmer les valeurs de CMI et de CMB préliminaires obtenues.

Au regard des résultats, nous avons fait le choix de poursuivre tout d'abord le fractionnement sur la fraction active F'4 (CMI's comprises entre 4,88 µg.mL⁻¹ et 19,53 µg.mL⁻¹ et CMBs comprises entre 9,77 µg.mL⁻¹ et 156,25 µg.mL⁻¹) car il s'agit par ailleurs de la fraction la plus riche en composés phénanthréniques, globalement assez bien séparés, et obtenue avec le meilleur rendement (**Figure 30D**). Les composés purifiés ont ainsi pu être testés pour leur activité antibactérienne.

Les composés issus de la fraction F'2, obtenue avec un assez bon rendement (13,47%), ont également été purifiés afin d'approfondir la composition chimique du sous-extrait CH₂CH₂ de *Juncus inflexus*. Par contre, cette fraction étant beaucoup moins active, les composés issus de F'2 n'ont pas été testés.

Chapitre 2 : Résultats et discussion : Étude de l'activité antibactérienne de *Juncus inflexus* contre les bactéries à Gram positif : cas de l'isolat clinique résistant à la méticilline *Staphylococcus aureus* T28.1

Tableau 10. Valeurs de CMI et de CMB déterminées pour les fractions pré-purifiées obtenues par CPC à partir du sous-extrait CH₂Cl₂ des rhizomes de *Juncus inflexus* L. localité 3 (JI3) contre les souches bactériennes à Gram positif sélectionnées. Les différentes fractions ont été testées à une gamme de concentrations finales comprise entre 1250 et 0,61 µg.mL⁻¹ obtenue par des dilutions successives au demi.

Souches bactériennes	Fractions	CMI (µg.mL ⁻¹)	CMB (µg.mL ⁻¹)
<i>E. faecalis</i> C159-6	F'1	> 1250	> 1250
	F'2	> 1250	> 1250
	F'3	9,77	39,06
	F'4	9,77	19,53
	F'5	4,88	39,06
	F'6	9,77 (à l'œil nu) et 39,06 (INT)	> 156,25
	F'7	9,77	> 156. 25
	F'8	> 1250	> 1250
<i>E. faecalis</i> T26B15	F'1	> 1250	> 1250
	F'2	312,5	> 1250
	F'3	19,53	78,13
	F'4	19,53	78,13
	F'5	19,53	156,25
	F'6	39,06	> 156,25
	F'7	78,13	> 312,5
	F'8	625	> 1250
<i>E. faecalis</i> T39C11	F'1	> 1250	> 1250
	F'2	> 1250	> 1250
	F'3	19,53	78,13
	F'4	9,77 (à l'œil nu) et 19,53 (INT)	39,06
<i>S. pyogenes</i> 16138	F'1	156,25	625
	F'2	19,53 (à l'œil nu) et 39,06 (INT)	39,06
	F'3	9,77	19,53
	F'4	4,88 (à l'œil nu) et 19,53 (INT)	9,77
	F'5	4,88 (à l'œil nu) et 9,77 (INT)	19,53
	F'6	4,88 (à l'œil nu) et 9,77 (INT)	39,06
	F'7	4,88 (à l'œil nu) et 9,77 (INT)	78,13
	F'8	9,77 (à l'œil nu) et 19,53 (INT)	> 78,13
<i>S. pyogenes</i> 16140	F'1	625 (à l'œil nu) et > 625 (INT)	> 625
	F'2	78,13	312,5
	F'3	39,06	156,25
	F'4	19,53	156,25
	F'5	19,53	156,25
	F'6	19,53	> 156,25
	F'7	78,13	312,5
	F'8	156,25	625
<i>S. aureus</i> 8241	F'1	ND	ND
	F'2	> 1250	> 1250
	F'3	39,06 (à l'œil nu) et 19,53 (INT)	19,53
	F'4	78,13 (à l'œil nu) et 9,77 (INT)	19,53

Chapitre 2 : Résultats et discussion : Étude de l'activité antibactérienne de *Juncus inflexus* contre les bactéries à Gram positif : cas de l'isolat clinique résistant à la méticilline *Staphylococcus aureus* T28.1

	F'5	19,53	312,5
	F'6	39,06	> 156,25
	F'7	39,06 (à l'œil nu) et 78,13 (INT)	> 156,25
	F'8	625	> 1250
<i>E. faecium</i> 09001	F'1	> 1250	> 1250
	F'2	> 1250	> 1250
	F'3	19,53	156,25
	F'4	9,77 (à l'œil nu) et 19,53 (INT)	78,13
	F'5	19,53	312,5
	F'6	39,06	> 156,25
	F'7	39,06 (à l'œil nu) et 78,13 (INT)	> 156,25
	F'8	625	> 1250
<i>S. pyogenes</i> 16135	F'1	625 (à l'œil nu) et > 625 (INT)	> 625
	F'2	156,25	312,5
	F'3	39,06	78,13
	F'4	19,53	78,13
	F'5	19,53 (à l'œil nu) et 39,06 (INT)	156,25
	F'6	78,13	312,5
	F'7	156,25	312,5
	F'8	312,5	625
<i>S. pyogenes</i> 16137	F'1	> 1250	> 1250
	F'2	78,13	312,5
	F'3	78,13	78,13
	F'4	9,77 (à l'œil nu) et 4,88 (INT)	78,13
	F'5	4,88	78,13
	F'6	9,77	> 156,25
	F'5	19,53 (à l'œil nu) et 78,13 (INT)	78,13
	F'6	39,06 (à l'œil nu) et 78,13 (INT)	156,25
	F'7	39,06	312,5
	F'8	ND	ND
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	F'1	ND	ND
	F'2	625	> 1250
	F'3	9,77 (à l'œil nu) et 19,53 (INT)	19,53
	F'4	19,53 (à l'œil nu) et 9,77 (INT)	19,53
	F'5	19,53	19,53
	F'6	19,53 (à l'œil nu) et 39,06 (INT)	156,25
	F'7	19,53	156,25
	F'8	ND	ND
<i>S. aureus</i> T25.10	F'1	ND	ND
	F'2	625	> 1250
	F'3	9,77	19,53
	F'4	19,53 (à l'œil nu) et 9,77 (INT)	19,53
	F'5	19,53	39,06
	F'6	39,06	156,25
	F'7	19,53	156,25
	F'8	ND	ND
<i>S. aureus</i> T28.1	F'1	ND	
	F'2	> 1250	> 1250
	F'3	9,77	19,53
	F'4	19,53 (à l'œil nu) et 9,77 (INT)	19,53
	F'5	19,53	9,77
	F'6	39,06	78,13

Chapitre 2 : Résultats et discussion : Étude de l'activité antibactérienne de *Juncus inflexus* contre les bactéries à Gram positif : cas de l'isolat clinique résistant à la méticilline *Staphylococcus aureus* T28.1

	F'7	78,13	> 312,5		F'7	19,53 (à l'œil nu) et 39,06 (INT)	39,06
	F'8	19,53	> 312,5		F'8	ND	ND

ND : non déterminé ; la détermination des CMI a été effectuée à l'œil nu et pour plus de précisions, une seconde lecture a été réalisée après l'ajout dans les puits des microplaques 96 puits d'un révélateur enzymatique, le *p*-Iodonitrotétrazolium violet (INT) à 2 mg.mL⁻¹. Après 15 min d'incubation à 55 °C, l'apparition de la coloration violette à l'intérieur des puits indique la croissance bactérienne.

2.2.3. Purification des composés phénanthréniques d'intérêt à partir de la fraction F'4 par HPLC préparative

Des essais d'optimisation de la méthode de séparation des composés de la fraction F'4 par HPLC analytique avaient été réalisés antérieurement dans le cadre des travaux de M2 de Rawen Ben Malek. Nous avons ainsi transposé à l'échelle préparative la méthode qui a permis une séparation optimale. À l'issue des sessions de purification par HPLC, 8 composés ont été isolés : 5 majoritaires et 3 minoritaires (**Figure 31**). La pureté de chaque composé a été vérifiée en sortie d'HPLC préparative et également après évaporation. Pour le même composé, quand la pureté a été supérieure ou égale à 90%, nous avons pu rassembler les lots issus des différentes injections par HPLC préparative (6 sessions) pour en obtenir un seul. La pureté des différents composés a été estimée par UHPLC-UV-MS sur la base du chromatogramme PDA (au MaxPlot) selon l'algorithme d'intégration 'Apex Track' du logiciel Empower® version 3. Ainsi les pourcentages de pureté pour les 5 composés majoritaires ont été déterminés : 98,6% (composé 6), 99,23% (composé 8), 90,59% (composé 9), 99,67% (composé 11) et 97,01% (composé 12).

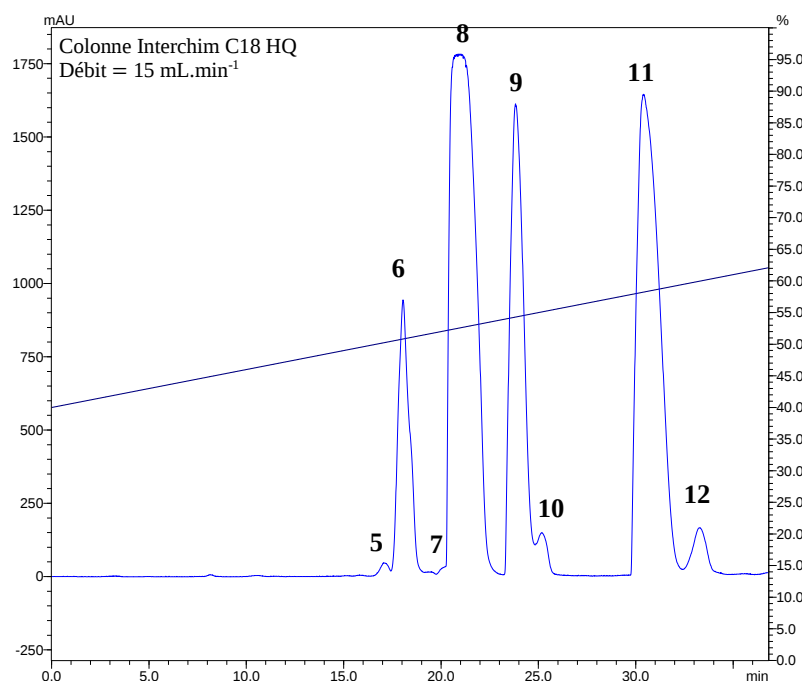


Figure 31. Profil chromatographique à $\lambda = 280$ nm de la fraction F'4 à partir de laquelle les différents composés phénanthréniques ont été purifiés par HPLC préparative. Le trait noir visualise le gradient employé.

L'ensemble des caractéristiques phytochimiques (données obtenues par des analyses en UHPLC-UV-MS et en HRMS Orbitrap-ESI en mode négatif) des 5 composés majoritaires purifiés sont résumés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 11**). Parmi ces derniers, 3 composés phénanthréniques avaient été initialement identifiés comme l'effusol (= composé 6), le juncusol (= composé 8) et la juncuénine B (= composé 11) par ma directrice de thèse en France, le Pr Céline Rivière, dans le cadre des travaux de M2 de Rawen Ben Malek en 2019. Cependant, nous avons voulu confirmer l'élucidation structurale de ces composés suite à leur purification à partir d'un second lot de plante. Pour cela, nous avons repassé en RMN ces derniers avec les 2 autres composés non identifiés (composé 9 et composé 12). Les différents composés purifiés ont été analysés par HRMS afin de vérifier leur masse moléculaire et d'obtenir des propositions de formules brutes. Parallèlement, l'analyse des spectres monodimensionnels (^1H et ^{13}C) et bidimensionnels (HSQC, HMBC et COSY) ont permis de conforter leur détermination structurale. Nous avons confirmé que les composés 6, 8 et 11 étaient bien l'effusol, le juncusol et la juncuénine B. Le composé 9 a été identifié comme étant le 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol et le composé 12 comme étant la dehydrojuncuénine B. Le détail de leurs données spectrales est précisé dans la **partie Matériel & Méthodes**. Les données obtenues sont en accord avec les données de la littérature existante (Della Greca et al., 1993 ; Gainche et al., 2020 ; Tóth et al., 2016).

Seuls les composés 5, 7 et 10 n'ont pas pu être identifiés en raison de leurs rendements trop faibles. Des analyses par UHPLC-UV-MS leur donnent comme masse molaire probable : 248, 262 et 264 g.mol⁻¹ (**Tableau 12**). Leur élucidation structurale par RMN nécessiterait de les purifier en plus grandes quantités.

Chapitre 2 : Résultats et discussion : Étude de l'activité antibactérienne de *Juncus inflexus* contre les bactéries à Gram positif : cas de l'isolat clinique résistant à la méticilline *Staphylococcus aureus* T28.1

Tableau 11. Données spectrales et structures des composés phénanthréniques majoritaires obtenus par HPLC préparative à partir de la fraction active F'4

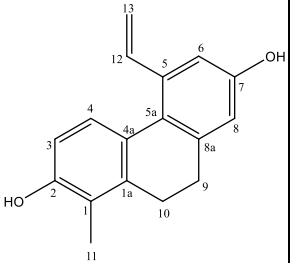
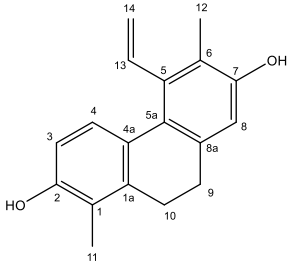
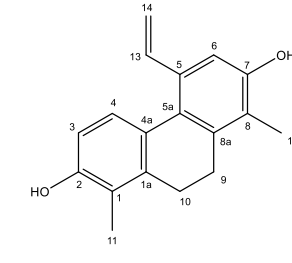
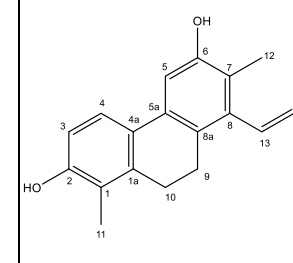
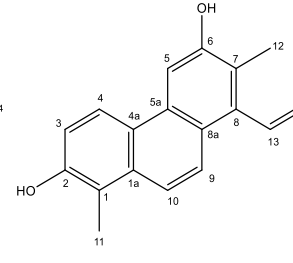
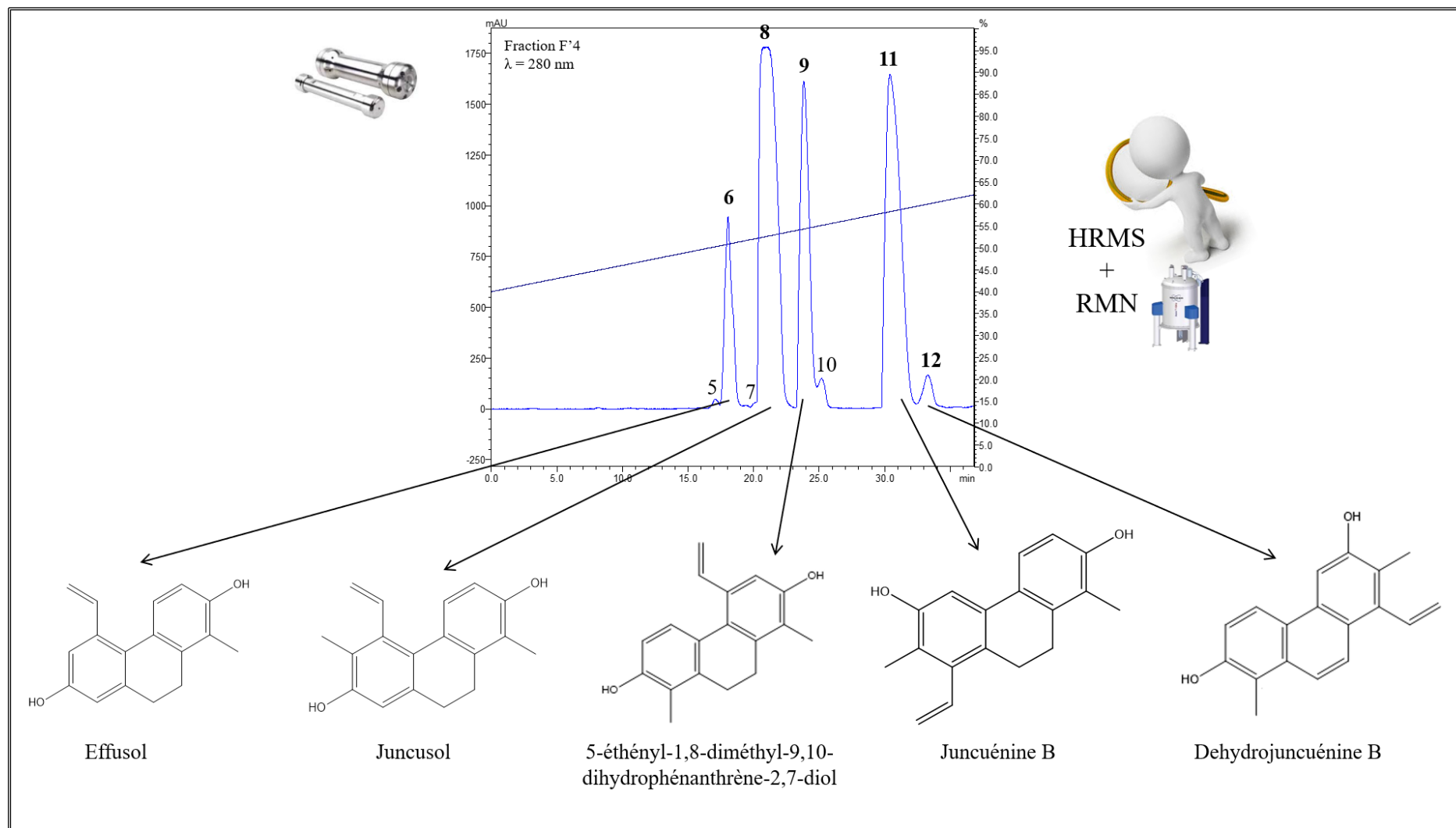
	Composé 6 (12,9 mg)	Composé 8 (138,66 mg)	Composé 9 (44,65 mg)	Composé 11 (78 mg)	Composé 12 (3,66 mg)
t_r (min)	5,59	5,88	6,09	6,65	6,75
m/z [M-H]⁻ LC-MS (ESI)	251	265	265	266	263
m/z [M+H]⁺ LC-MS (ESI)	253	267	267	267	265
m/z [M-H]⁻ HRMS (ESI)	251,1072	265,1233	265,1232	265,1233	263,1076
Formule brute	C ₁₇ H ₁₆ O ₂	C ₁₈ H ₁₈ O ₂	C ₁₈ H ₁₈ O ₂	C ₁₈ H ₁₈ O ₂	C ₁₈ H ₁₆ O ₂
Structure					
Nom	Effusol	Juncusol	5-éthényl-1,8-diméthyl- 9,10-dihydrophénanthrène -2,7-diol	Juncuénine B	Dehydrojuncuénine B

Tableau 12. Données spectrales des composés phénanthréniques minoritaires obtenus par HPLC préparative à partir de la fraction actives F'4

	Composé 5 (0,6 mg)	Composé 7 (0,34 mg)	Composé 10 (0,77 mg)
t_r (min)	5,54	5,71	6,14
m/z [M+H]⁺ par LC-MS (ESI)	249	263	265

Chapitre 2 : Résultats et discussion : Étude de l'activité antibactérienne de *Juncus inflexus* contre les bactéries à Gram positif : cas de l'isolat clinique résistant à la méticilline *Staphylococcus aureus* T28.1



2.2.4. Purification d'autres composés phénanthréniques à partir de la fraction F'2 obtenue par CPC à partir du sous-extrait CH₂Cl₂ des rhizomes de *J. inflexus* localité 3 (JI3)

Dans un second temps, nous avons souhaité approfondir nos connaissances sur la composition chimique du sous-extrait CH₂Cl₂ des rhizomes de *J. inflexus*. Nous avons ainsi purifié les composés issus de la fraction F'2. L'analyse de son chromatogramme par UHPLC-UV-MS à $\lambda = 280$ nm (**Figure 30B**) suggère la présence de composés phénanthréniques plus apolaires que ceux de la fraction F'4. Afin de pouvoir purifier et identifier ces composés, nous avons développé une méthode de séparation adaptée pour cette fraction par HPLC analytique afin de pouvoir la transposer ensuite en HPLC préparative.

2.2.4.1. Optimisation de la méthode de séparation par HPLC-UV analytique des composés issus de la fraction F'2

Nous avons initié nos tests d'optimisation de séparation en HPLC analytique en jouant sur plusieurs paramètres : mode gradient ou isocratique, proportions de solvants au niveau de la phase mobile et durée de l'analyse. Deux solvants ont été testés pour le solvant B : acétonitrile (ACN) ou ACN en mélange avec du MeOH (ACN/MeOH) à différents ratios (90:10, 80:20 et 70:30 v/v). De plus, pour ces essais, nous avons testé 3 phases stationnaires différentes : une colonne Interchim® Uptisphere strategy C18-HQ (5 μ m, 250 $\times$ 4,6 mm) précédée d'une pré-colonne C18, une colonne Grace™ Vision HT C18 HL (5 μ m, 250 $\times$ 4,6 mm, 120 Å) précédée d'une pré-colonne C18 HL (5 μ m, 7,5 $\times$ 4,6 mm) et une colonne Phenomenex® Kinetex F5 (pentafluorophenyl) (5 μ m, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 100 Å). Après de nombreux essais, nous avons réussi à obtenir une bonne séparation des différents composés de la fraction F'2 étudiée grâce à la colonne Phenomenex® Kinetex F₅ avec comme solvant B l'ACN (**Figure 32**). Nous distinguons ainsi la présence de 4 pics dans la fraction F'2 : 1 minoritaire (composé 1) et 3 majoritaires (composés 2, 3 et 4).

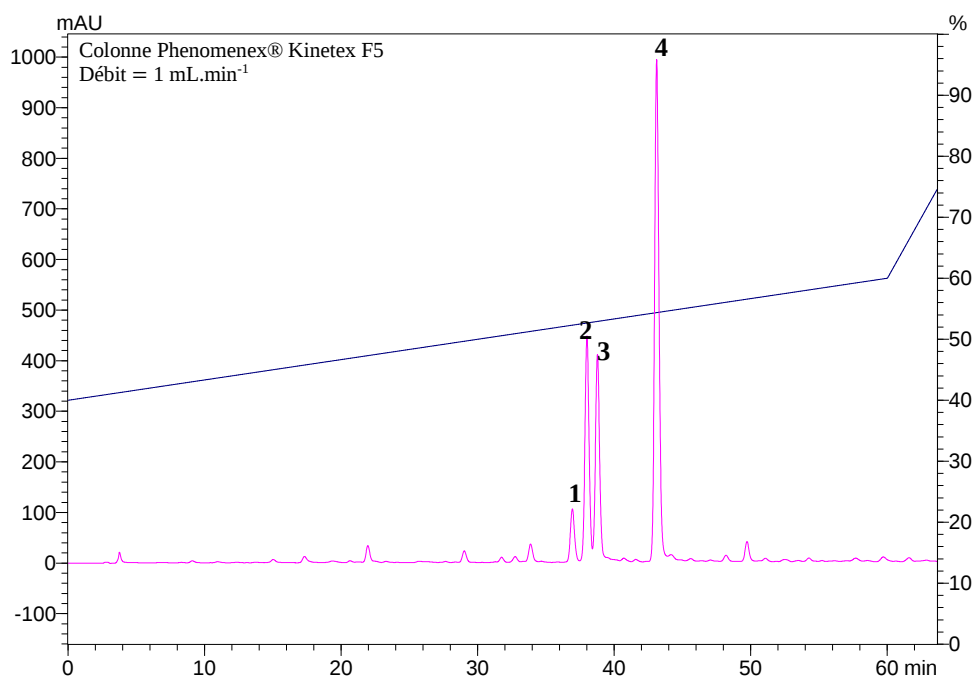


Figure 32. Chromatogramme obtenu par HPLC-UV analytique à $\lambda = 280$ nm de la fraction F'2. Le trait noir visualise le gradient d'élution utilisé : 40% ACN à $t = 0$ min ; 60% ACN à $t = 60$ min et 100% ACN à $t = 65$ min jusqu'à $t = 75$ min.

2.2.4.2. Purification des composés issus de la fraction F'2 par HPLC préparative

Afin de pouvoir purifier les 4 composés repérés dans la fraction F'2 en quantité suffisante pour les analyses en HRMS et en RMN, nous avons alors effectué la transposition de la méthode développée en HPLC analytique à l'échelle préparative sur la colonne Phenomenex® Kinetex F5 préparative (5 μ m, 250 $\times$ 21,2 mm, 100 Å). 312 mg de la fraction F'2 ont été injectés en 5 fois. Le profil chromatographique d'élution de la fraction F'2 à l'échelle préparative est similaire à celui obtenu à l'échelle analytique (**Figure 33**). Au bout des 5 sessions de purification, nous avons réussi à obtenir les rendements suivants pour les composés 1 à 4 : 0,8%, 2,21%, 1,6% et 2,37%. La pureté de chaque composé a été vérifiée par UHPLC-UV-MS en sortie d'HPLC préparative ainsi qu'après son évaporation comme décrit dans **la partie 2.2.3 du chapitre 3**. Pour le même composé, quand la pureté a été supérieure ou égale à 90%, nous avons pu rassembler les lots issus des différentes injections réalisées par HPLC préparative (5 sessions) pour en avoir un seul. Les composés ont été ensuite identifiés par HRMS et RMN. L'élucidation structurale du composé 1 doit toutefois être confortée par des analyses RMN complémentaires pour vérifier s'il s'agit d'un composé nouveau. Il pourrait s'agir du 8-éthényl-

1,7-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrèn-2-ol. Une autre hypothèse serait le 5-éthényl-1,6-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrèn-2-ol déjà décrit dans la littérature (DellaGreca et al., 2004). Cependant, on observe quelques petites différences de déplacement chimique comme pour le carbone C-4 et certaines corrélations HMBC sont à conforter. Il est également nécessaire d'obtenir un spectre carbone mieux résolu. Les autres composés 2, 3 et 4 ont été identifiés comme étant respectivement le 5-éthényl-1,7-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrèn-2-ol, la juncuénine A et la dehydrojuncuénine A. Les données spectrales et leur structure sont résumées dans **Tableau 13**. Le détail de leurs données spectrales (HRMS et RMN) est précisé dans la **partie Matériel & Méthodes**. Les données obtenues sont en accord avec les données de la littérature existante (Della Greca et al., 1993 ; Gainche et al., 2020 ; Tóth et al., 2016).

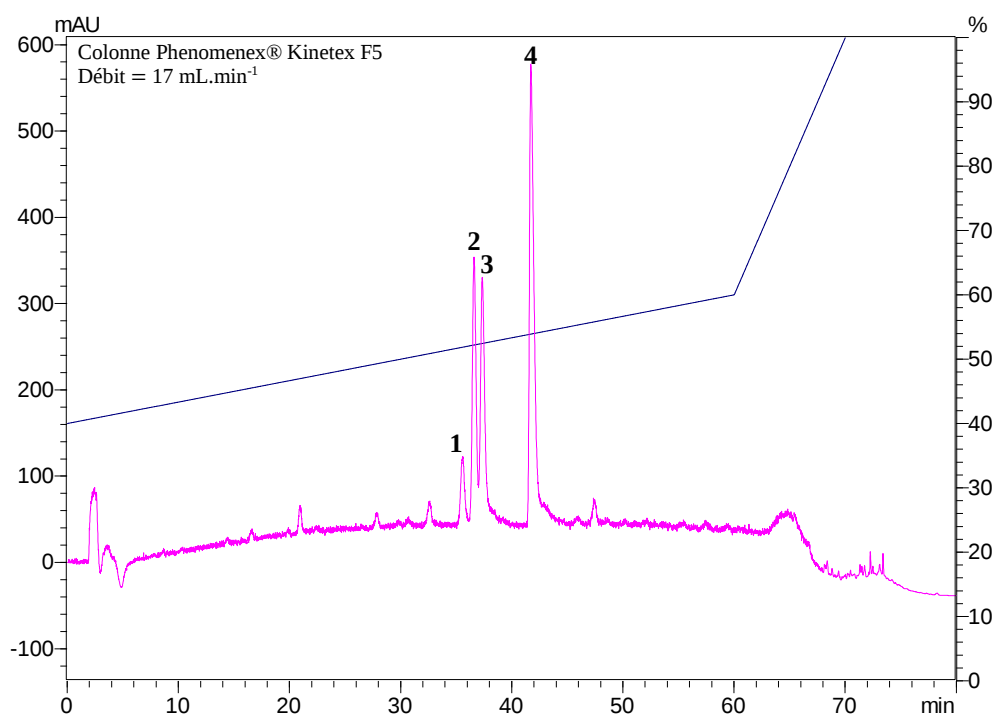
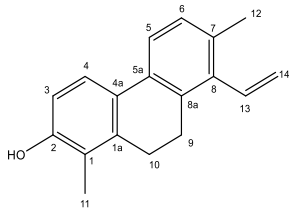
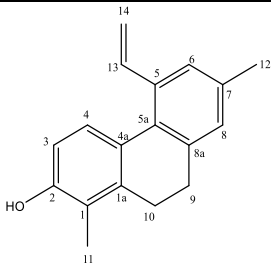
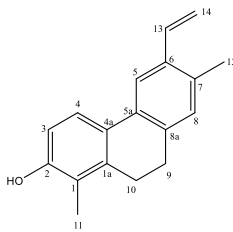
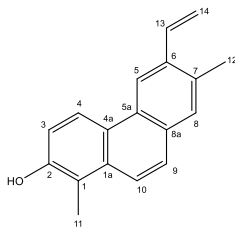


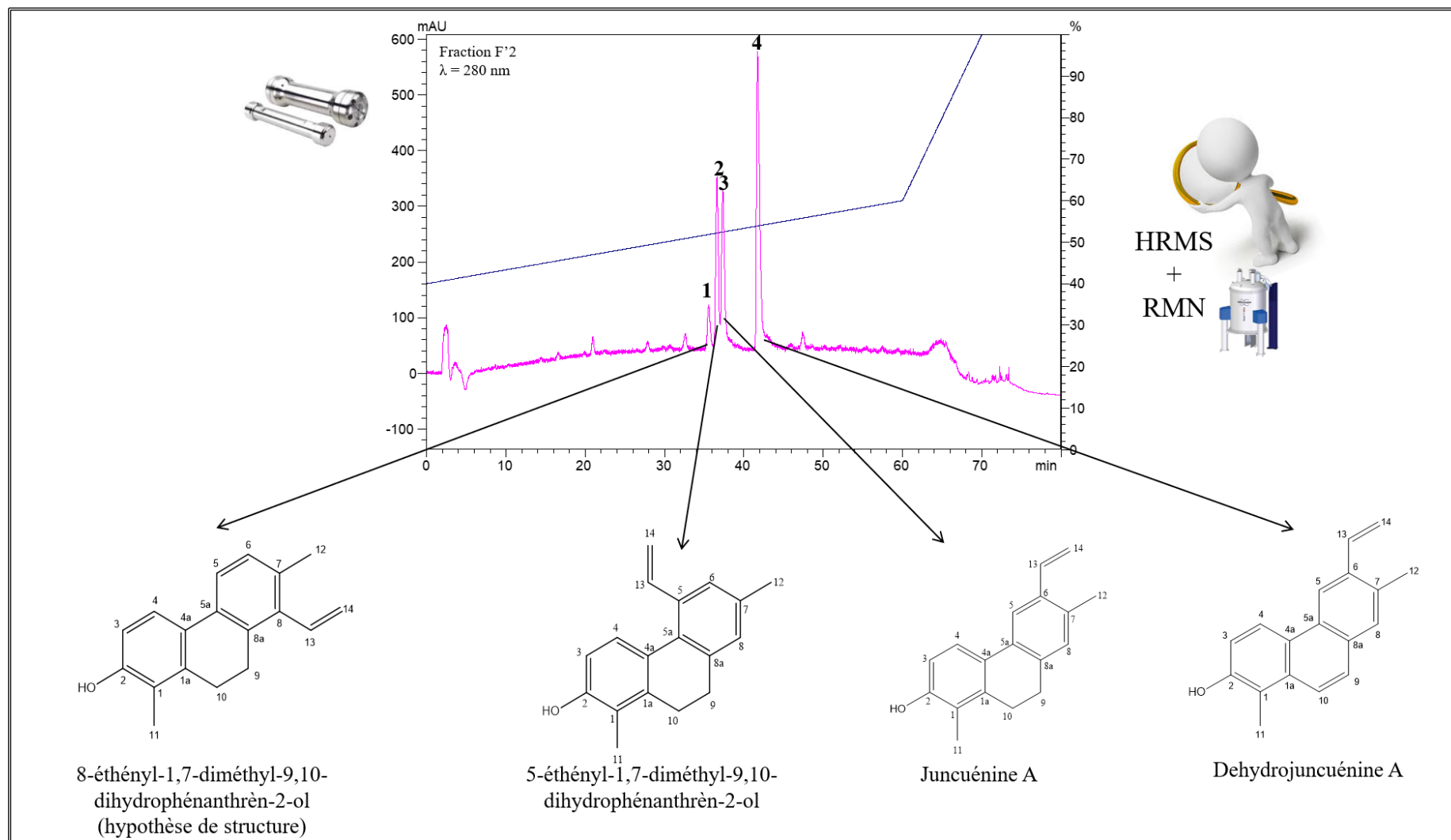
Figure 33. Profil chromatographique à $\lambda = 280$ nm obtenu par HPLC préparative de la fraction F'2. Le trait noir visualise le gradient d'élution employé.

Chapitre 2 : Résultats et discussion : Étude de l'activité antibactérienne de *Juncus inflexus* contre les bactéries à Gram positif : cas de l'isolat clinique résistant à la méticilline *Staphylococcus aureus* T28.1

Tableau 13. Données spectrales et structures des composés phénanthréniques obtenus par HPLC préparative à partir de la fraction F'2

	Composé 1 (2,5 mg)	Composé 2 (6,89 mg)	Composé 3 (5,02 mg)	Composé 4 (7,4 mg)
t_r (min)	7,73	7,82	7,693	7,698
Maximum d'absorbance en UV (nm)	280	282	281	268
m/z [M-H]⁻ LC-MS (ESI)	249	249	249	247
m/z [M+H]⁺ LC-MS (ESI)	251	251	251	249
m/z [M-H]⁻ HRMS (ESI)	249,1285	249,1285	249,1286	247,1125
Formule brute	C ₁₈ H ₁₈ O	C ₁₈ H ₁₈ O	C ₁₈ H ₁₈ O	C ₁₈ H ₁₆ O
Pourcentage de pureté au Max Plot avec l'intégration « Apex Track » (%)	96,76	96,3	93,81	99,83
Structure				
Nom	8-éthényl-1,7-diméthyl- 9,10-dihydro phénanthrène-2-ol (hypothèse de structure)	5-éthényl-1,7-diméthyl- 9,10-dihydro phénanthrène-2-ol	Juncuénine A	Dehydrojuncuénine A

Chapitre 2 : Résultats et discussion : Étude de l'activité antibactérienne de *Juncus inflexus* contre les bactéries à Gram positif : cas de l'isolat clinique résistant à la méticilline *Staphylococcus aureus* T28.1



2.2.5. Activité antibactérienne des composés phénanthréniques majoritaires isolés à partir de la fraction active F'4

2.2.5.1. Détermination des CMI et des CMBs

Les valeurs de CMI des composés phénanthréniques majoritaires (effusol, juncusol, 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol et juncuénine B) isolés à partir de la fraction F'4 ont été déterminées contre les mêmes souches que celles utilisées pour déterminer les CMI des fractions. Les valeurs de CMI des composés testés sont très proches et varient entre 4,88 et 39,06 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (**Tableau 14**).

Les valeurs de CMI déterminées pour le juncusol contre les 2 souches de SARM T25.10 et T28.1 (19,53 $\mu\text{g/mL}^{-1}$) sont légèrement plus basses que celles mentionnées dans la littérature : 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contre la souche de SARM ATCC4300 dans l'étude de Tóth et al., 2016 et contre une autre souche de SARM dont la provenance n'a pas été précisée dans l'étude de Hanawa et al., 2002.

Dans notre étude, les valeurs du rapport CMB/CMI calculées montrent que les 4 composés phénanthréniques étudiés sont des composés plutôt bactéricides ($\text{CMB/CMI} \leq 4$) contre les souches de *Streptococcus pyogenes*, à quelques exceptions près. Seuls le 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol et la juncuénine B ne se montrent pas bactéricides contre *S. pyogenes* 16140. Pour rappel, l'activité antibactérienne peut être qualifiée de bactéricide ($\text{CMB/CMI} \leq 4$) ou de bactériostatique ($\text{CMB/CMI} > 4$) (Davis, 2018 ; Levison, 2004). L'effusol, le juncusol et le 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol sont aussi globalement bactéricides contre les différentes souches de *S. aureus* étudiées (8241, ATCC 6538, T25.10 et T28.1), sauf le juncusol qui est bactériostatique contre la souche 8241. Par contre, la juncuénine B se montre bactériostatique contre ces 4 souches (**Tableau 14**). Enfin, l'activité des 4 composés contre les souches d'*Enterococcus* est bactéricide ou bactériostatique selon les composés et les souches. Il est difficile de définir une tendance globale.

Nous avons ensuite souhaité confirmer ces résultats par la réalisation des courbes de croissance sur plusieurs souches bactériennes sélectionnées (*kill-time assay*).

Chapitre 2 : Résultats et discussion : Étude de l'activité antibactérienne de *Juncus inflexus* contre les bactéries à Gram positif : cas de l'isolat clinique résistant à la méticilline *Staphylococcus aureus* T28.1

Tableau 14. Valeurs des CMI, CMBs et des rapports *CMB/CMI* déterminées pour les dérivés phénanthréniques majoritaires isolés par HPLC préparative à partir de la fraction F'4 (obtenue par CPC à partir du sous-extrait CH₂Cl₂ des rhizomes de *J. inflexus* localité 3 (JI3)) contre les souches bactériennes à Gram positif sélectionnées. Ces données sont le résultat de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata.

Composé Souche bactérienne	Effusol			Juncusol			5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10- dihydrophénanthrène-2,7-diol			Juncuénine B		
	CMI	CMB	CMB/ CMI	CMI	CMB	CMB/ CMI	CMI	CMB	CMB/ CMI	CMI	CMB	CMB/ CMI
<i>E. faecalis</i> C159-6	4,88	> 19,53	ND	4,88	78,13	16	4,88	78,13	16	9,77	78,13	8
<i>E. faecalis</i> T26B15	9,77	39,06	4	9,77	78,13	8	9,77	39,06	4	19,53	78,13	4
<i>E. faecalis</i> T39C11	9,77	> 39,06	ND	9,77	> 78,13	ND	9,77	> 78,13	ND	9,77	> 78,13	ND
<i>E. faecium</i> 09001	9,77	19,53	2	9,77	78,13	8	9,77	39,06	4	9,77	39,06	4
<i>S. pyogenes</i> 16135	9,77	39,06	4	19,53	39,06	2	19,53	78,13	4	19,53	39,06	2
<i>S. pyogenes</i> 16137	9,77	9,77	1	9,77	9,77	1	9,77	19,53	2	19,53	19,53	1
<i>S. pyogenes</i> 16138	19,53	19,53	1	9,77	19,53	2	19,53	39,06	2	9,77	19,53	2
<i>S. pyogenes</i> 16140	9,77	39,06	4	9,77	39,06	4	9,77	> 78,13	ND	19,53	> 78,13	ND
<i>S. aureus</i> 8241	19,53	39,06	2	19,53	156.25	8	19,53	19,53	1	19,53	> 1250	ND
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	19,53	39,06	2	19,53	39,06	2	9,77	39,06	4	9,77	> 1250	ND
<i>S. aureus</i> T25.10	19,53	78,13	4	19,53	39,06	2	9,77	19,53	2	9,77	> 1250	ND
<i>S. aureus</i> T28.1	39,06	39,06	1	19,53	39,06	2	19,53	19,53	1	9,77	> 1250	ND

ND : rapport CMB/CMI non déterminé

2.2.5.2. Étude des effets bactéricide et bactériostatique du juncusol et de la juncuénine B par la réalisation des courbes de croissance (*Kill-time assay*)

Le *kill-time assay* est un test standardisé qui s'effectue *in vitro* et permet de suivre la croissance d'une population bactérienne au cours du temps et en présence de différentes concentrations du produit étudié. Il apporte également des informations supplémentaires, notamment sur les interactions dynamiques entre l'agent antibactérien et la souche bactérienne quand il est appliqué dans le cadre des études de modélisation PK/PD (pharmacocinétique/pharmacodynamique) (Balouiri et al., 2016 ; Mahieux et al., 2018 ; CLSI, 1998 ; Zwietering et al., 1990).

Pour ces expériences, nous avons fait le choix de cibler 3 souches bactériennes : *Enterococcus faecium* 09001 (souche multirésistante), *Streptococcus pyogenes* 16135, et *Staphylococcus aureus* T28.1 (souche résistante à la méticilline). Seul l'effet antibactérien du juncusol et de la juncuénine B a pu être évalué car les quantités obtenues pour ces 2 composés après les sessions de purification ont été suffisantes pour réaliser les courbes de croissance.

- Courbe de croissance du juncusol et de la juncuénine B sur l'isolat clinique *E. faecium* 09001

Pour réaliser les courbes de croissance sur l'isolat clinique *E. faecium* 09001, le juncusol et la juncuénine B ont été testés à la gamme de concentrations suivante : CMI/4, CMI/2, CMI (= 9,77 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), CMI $\times$ 2, CMI $\times$ 4 et CMI $\times$ 8.

D'après les données obtenues (**Figure 34A**), nous observons qu'à la CMI (= 9,77 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), le juncusol induit un déclin d'environ 1 $\log_{10}$ (UFC.mL⁻¹) à 24 h et de 2,5 $\log_{10}$ (UFC.mL⁻¹) après 48 h de culture. Il est donc bactériostatique à la CMI. À la CMI $\times$ 4, le juncusol induit une réduction de plus de 3 $\log_{10}$ (UFC.mL⁻¹) à 24 h. De plus, dès 2 h de mise en culture, le juncusol semble être très efficace à la CMI $\times$ 8 (78,13 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) car il induit un déclin d'environ 1,5 $\log_{10}$ (UFC.mL⁻¹) qui à 24 h atteint la limite de détection fixée à 1 $\log_{10}$ (UFC.mL⁻¹). Le juncusol est alors considéré comme bactéricide. À 48 h, l'effet antibactérien du juncusol est qualifié de bactéricide aux concentrations CMI $\times$ 2, CMI $\times$ 4 et CMI $\times$ 8.

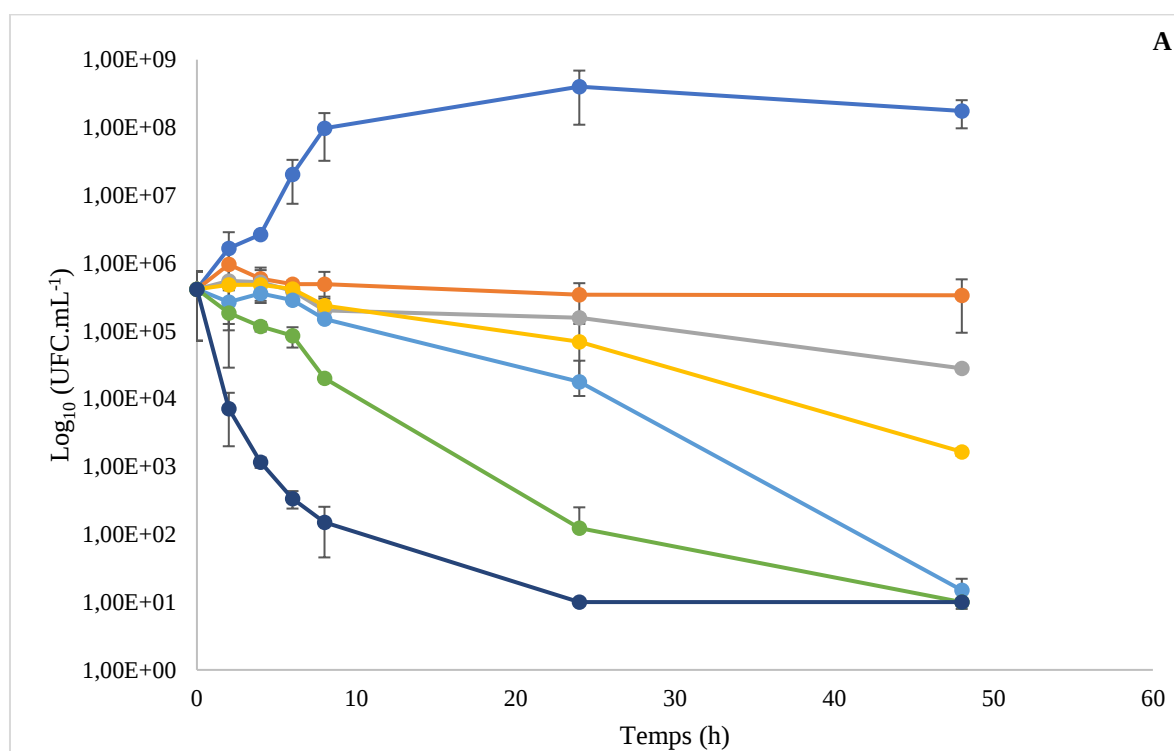
L'analyse de la courbe de croissance de la juncuénine B (**Figure 34B**) montre que cette dernière induit une diminution de la population bactérienne d'*E. faecium* 09001 de manière plus drastique dès 2 h de mise en culture à la CMI $\times$ 4 (39,06 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) et surtout à la CMI $\times$ 8

Chapitre 2 : Résultats et discussion : Étude de l'activité antibactérienne de *Juncus inflexus* contre les bactéries à Gram positif : cas de l'isolat clinique résistant à la méticilline *Staphylococcus aureus* T28.1

(78,13 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) : diminutions respectives de 2 $\log_{10}$ (UFC.mL $^{-1}$) et de 5 $\log_{10}$ (UFC.mL $^{-1}$). Dès 2 h, la juncuénine B est bactéricide à la CMI $\times 8$ et elle le devient à 4 h à la CMI $\times 4$.

En comparant l'évolution des courbes de croissance des 2 composés phénanthréniques testés contre la même souche d'*E. faecium* 09001, nous remarquons que l'effet de la juncuénine B aux concentrations CMI $\times 2$, CMI $\times 4$ et CMI $\times 8$ est plus important que celui du juncusol au bout de 24 h de culture. Comme nous l'avons souligné précédemment, ces 2 composés sont bactéricides à 48h ; cependant l'effet biocide de la juncuénine B semble se manifester plus rapidement.

Grâce au calcul du rapport CMB/CMI, nous avons pu conclure dans la **partie 2.2.4.1** que le juncusol avait plutôt un effet bactériostatique contre la souche d'*E. faecium* 09001. Ce résultat semble en accord avec l'analyse de la courbe de croissance obtenue à la CMI. Par contre, nos résultats pour la juncuénine B à la CMI sont légèrement contradictoires : bactéricide par la valeur du rapport CMB/CMI = 4 et bactériostatique à la CMI par la courbe de croissance obtenue. Toutefois, le rapport CMB/CMI de 4 est à la limite des 2 effets.



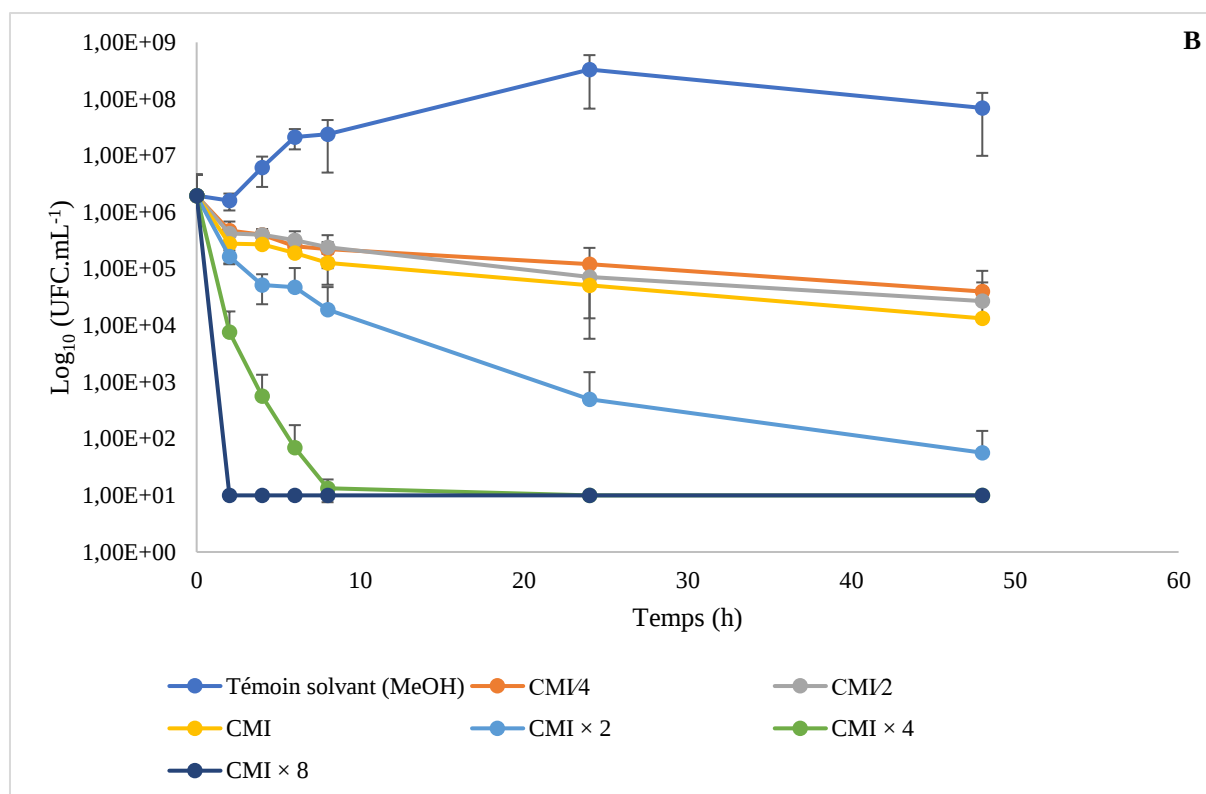


Figure 34. Courbes de croissance de l'isolat clinique *Enterococcus faecium* 09001 en présence du (A) juncusol et de la (B) juncuénine B. Le seuil de détection a été fixé à $1 \log_{10} (\text{UFC.mL}^{-1})$. Elles sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM de 3 expériences indépendantes. Le témoin utilisé est le méthanol.

- Courbes de croissance du juncusol et de la juncuénine B sur l'isolat clinique *S. pyogenes* 16135

Pour *S. pyogenes* 16135, le juncusol et la juncuénine B ont été testés à la gamme de concentrations suivante : CMI/4, CMI/2, CMI ($= 19,53 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CMI $\times 2$ et CMI $\times 4$.

Nous avons obtenu beaucoup de variations au niveau de nos triplicatas. Ceci pourrait être dû au fait que la souche de *S. pyogenes* 16135 est assez sensible à la contamination par d'autres microorganismes comme les *Bacillus* (cas rencontré lors de nos expériences). Pour pallier ce problème, nous avons dû modifier quelques paramètres pour que l'expérience se déroule dans de bonnes conditions : inoculum initial de $6 \log_{10} (\text{UFC.mL}^{-1})$ au lieu de $5 \log_{10} (\text{UFC.mL}^{-1})$ et dénombrement toutes les 3 heures au lieu de toutes les 2 heures pour éviter le stress environnemental. Toutefois malgré les différentes adaptations, les variations expérimentales ont persisté. De ce fait, nos résultats n'étant pas satisfaisants, nous avons fait le choix de ne pas les présenter dans ce manuscrit.

- Courbes de croissance du juncusol et de la juncunénine B sur l'isolat clinique *S. aureus* T28.1

Pour *S. aureus* T28.1, le juncusol et la juncunénine B ont été testés à la gamme de concentrations suivantes : CMI/4, CMI/2, CMI ($= 19,53 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CMI $\times 2$, CMI $\times 4$ pour le juncusol, et CMI/4, CMI/2, CMI ($= 19,53 \mu\text{g/mL}^{-1}$), CMI $\times 2$, CMI $\times 4$ et CMI $\times 8$ pour la juncunénine B.

D'après les données obtenues (**Figure 35A**), le juncusol induit, à la CMI ($= 19,53 \mu\text{g.mL}^{-1}$), un déclin de $2 \log_{10}$ (UFC.mL $^{-1}$) de la population de *S. aureus* T28.1 au cours des premières 24 h de l'expérience. Cependant, après 48 h, ce dernier devient bactéricide car la courbe atteint le seuil de détection fixé à $1 \log_{10}$ (UFC.mL $^{-1}$). De plus, le juncusol à la CMI $\times 4$ ($= 78,13 \mu\text{g.mL}^{-1}$) se montre très efficace car il entraîne une diminution de plus de $3 \log_{10}$ (UFC.mL $^{-1}$) au bout de 4 h seulement. À cette concentration, nous pouvons également qualifier le juncusol comme étant bactéricide. La bactéricidie *in vitro* est généralement définie par une diminution de 99,9% des UFC (bactéries vivantes), ce qui pourrait être traduit par une diminution supérieure ou égale à $3 \log_{10}$ (UFC.mL $^{-1}$) de l'inoculum bactérien de départ pendant une période d'incubation précise (20 à 24 h généralement mais elle peut varier selon la souche bactérienne testée).

D'après les résultats obtenus pour la juncunénine B (**Figure 35B**), nous remarquons qu'à la CMI ($= 9,77 \mu\text{g.mL}^{-1}$) l'effet observé est plutôt bactériostatique tout au long de l'expérience. La juncunénine B inhibe donc la croissance bactérienne mais elle n'induit pas la mort de la population de *S. aureus* T28.1 présente dans le tube de culture. Néanmoins, en la comparant à la courbe de culture du témoin (MeOH à 5%), nous observons une réduction de plus d' $1 \log_{10}$ (UFC.mL $^{-1}$) à 48 h, ce qui n'est pas négligeable. À des concentrations plus élevées, notamment à la CMI $\times 4$ et à la CMI $\times 8$, la juncunénine B induit les réductions respectives de $3 \log_{10}$ (UFC.mL $^{-1}$) et de $4,5 \log_{10}$ (UFC.mL $^{-1}$) au cours des deux premières heures de mise en culture. À ces concentrations, son effet antibactérien peut-être donc être qualifié de bactéricide.

En conclusion, à la CMI, la juncunénine B n'est pas bactéricide, à la différence du juncusol qui le devient à 48 h.

Chapitre 2 : Résultats et discussion : Étude de l'activité antibactérienne de *Juncus inflexus* contre les bactéries à Gram positif : cas de l'isolat clinique résistant à la méticilline *Staphylococcus aureus* T28.1

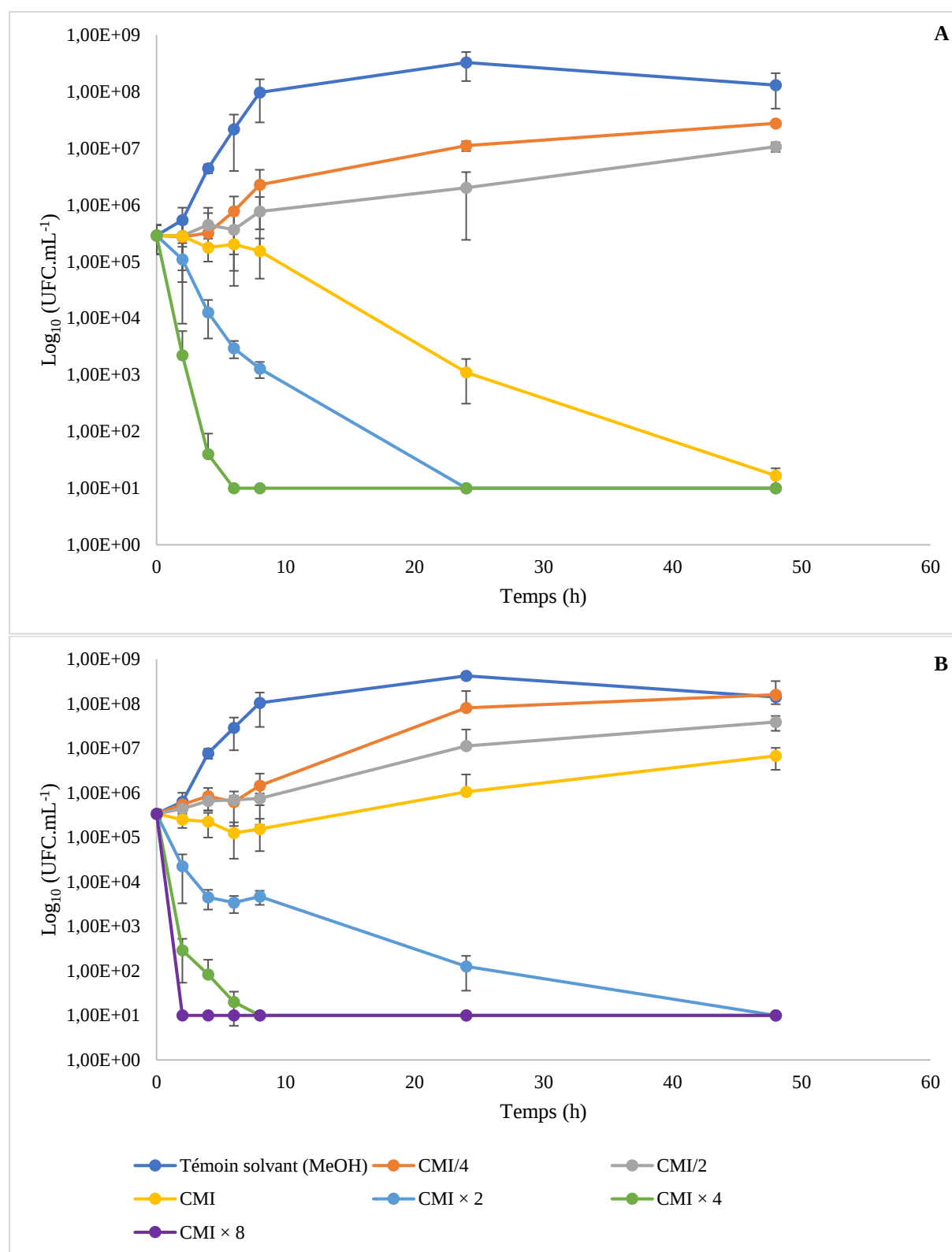


Figure 35. Courbes de croissance de l'isolat clinique *Staphylococcus aureus* T28-1. en présence du (A) juncusol et de la (B) juncuénine B. Le seuil de détection a été fixé à $1 \log_{10}$ (UFC.mL⁻¹). Elles sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM de 3 expériences indépendantes. Le témoin utilisé est le méthanol.

À ce stade de notre étude, nous avons fait de choix d'approfondir notre étude *in vitro* de l'activité antibactérienne des composés phénanthréniques sur l'isolat clinique résistant à la méticilline, la souche *Staphylococcus aureus* T28.1, dont les facteurs de virulence sont connus. Cet isolat clinique provient d'un prélèvement pathologique d'un patient ayant une ostéite, une infection osseuse au niveau de son pied diabétique (Senneville et al., 2014). De plus, il abrite dans son génome des gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques et à la formation du biofilm. Cette souche a déjà été utilisée dans de précédentes études pour étudier l'activité antibactérienne de composés d'origine naturelle (Bocquet et al., 2019).

2.2.5.3. Quantification de l'effet post-antibiotique (EPA) du juncusol et de la juncuénine B sur l'isolat clinique *Staphylococcus aureus* T28.1

Afin de poursuivre l'exploration du potentiel antibactérien du juncusol et de la juncuénine B, nous avons étudié leur effet post-antibiotique (EPA) sur l'isolat clinique *Staphylococcus aureus* T28.1. Ce test permet de fournir des informations préliminaires mais importantes sur la pharmacodynamique antibactérienne. L'EPA fait référence à la reprise de croissance retardée des bactéries survivantes après une exposition transitoire (généralement pendant 1 h ou 2 h) à un agent antibactérien (Srimani et al., 2017). Effectivement, après son élimination, un agent antibactérien pourrait encore exercer divers effets sur les bactéries survivantes. Parmi ces effets, nous pouvons énumérer :

- la récupération tardive des activités enzymatiques et non enzymatiques des protéines ;
- les modifications prolongées sur la morphologie cellulaire, le métabolisme, la croissance et le temps de génération ;
- les modifications des récepteurs cellulaires et de la sensibilité à la phagocytose ;
- la modification de la sensibilité à un agent antibactérien après une nouvelle exposition, ce qui pourrait entraîner une diminution de l'expression des gènes de virulence (Craig and Vogelman, 1987 ; Li et al., 1997 ; MacKenzie and Gould, 1993).

L'EPA correspond également au maintien du pouvoir bactériostatique d'un antibiotique (ou d'un agent antimicrobien) alors que sa concentration est inférieure au seuil d'efficacité (Pichot et al., 2013). Ce phénomène a été observé depuis les premières travaux sur la pénicilline contre les souches bactériennes de *Pneumococcus* et de *Streptococcus* durant les années 1940. Toutefois, le mécanisme régissant l'EPA reste très peu compris. Dans leur étude, Zhanel et son équipe ont souligné le fait que l'EPA semble être une caractéristique de la plupart des agents

antimicrobiens. La présence et la durée de ce phénomène sont influencées par plusieurs facteurs, notamment le type de microorganismes, le type d'antimicrobiens, la concentration de ce dernier, la durée d'exposition aux antimicrobiens et finalement les associations des antimicrobiens (Zhanel et al., 1991).

Ainsi, l'étude de l'EPA d'un antibactérien est d'une grande importance en cas d'une application clinique, particulièrement lors de la conception et de l'optimisation des schémas posologiques des patients. Véritablement, la durée de l'EPA permet de déterminer l'intervalle d'administration optimal.

Sur le plan expérimental, l'EPA est déterminé en comparant la cinétique de croissance du microorganisme exposé à l'antibactérien pendant 2 heures avant son inactivation, avec celle du témoin non traité (dans notre étude, il s'agit du MeOH à 5%). Un temps de latence est déterminé graphiquement à partir des différentes courbes de croissance de *S. aureus* T28.1 obtenues grâce aux dénombrements réalisés après l'élimination de l'antibactérien testé (soit le juncusol ou la juncuénine B testés à différentes concentrations CMI/4, CMI/2, CMI, CMI $\times$ 2, CMI $\times$ 4 et CMI $\times$ 8) (**Figure 36**). Il est quantifié à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Effet post-antibiotique (EPA)} = T - C$$

où T = temps nécessaire pour que la population bactérienne augmente d' $1 \log_{10}$ (UFC.mL⁻¹) à une concentration donnée (par rapport au nombre d'unité formant colonie déterminé immédiatement après l'élimination de l'antibactérien) et C = temps nécessaire pour que la population bactérienne croît d' $1 \log_{10}$ (UFC.mL⁻¹) dans le tube témoin.

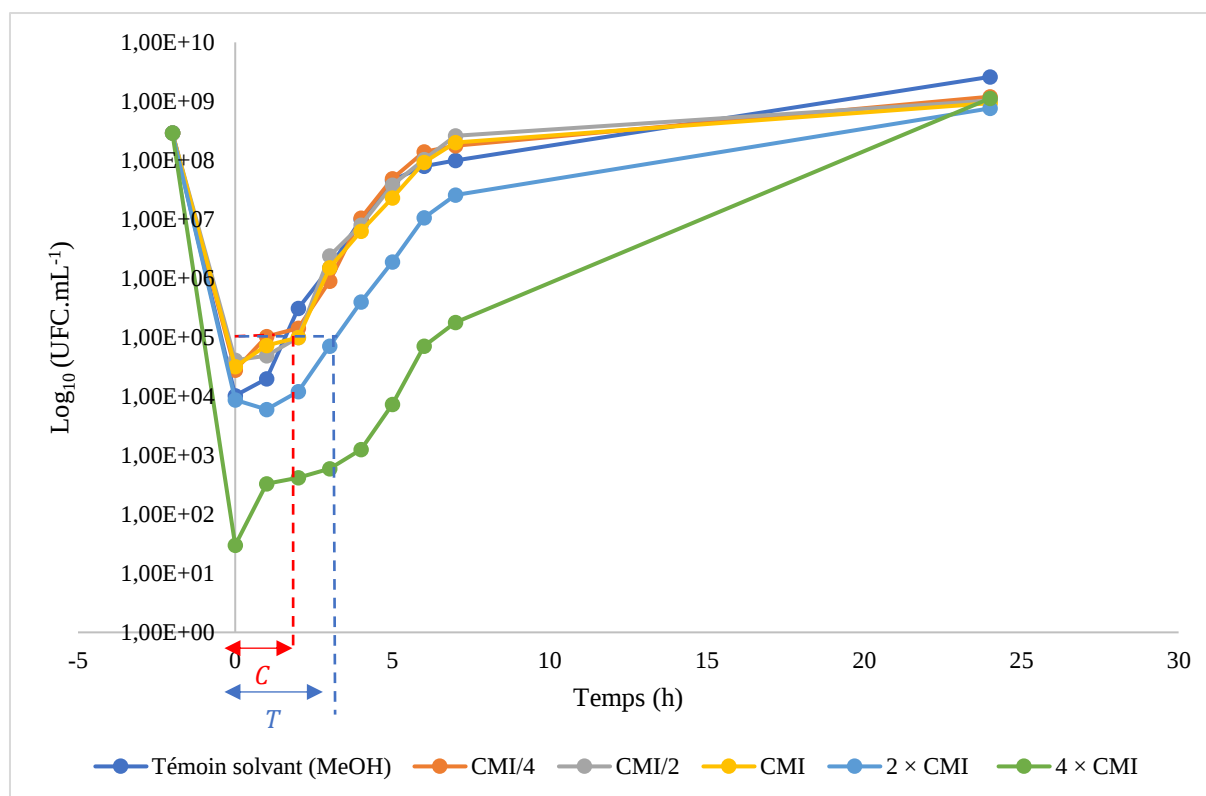


Figure 36. Courbe de croissance de l'isolat clinique *Staphylococcus aureus* T28.1 après inactivation du juncusol. Le temps T_{-2h} montre le pré-traitement avec le juncusol à différentes concentrations. Le temps T_{0h} correspond à l'inactivation du juncusol. Les temps de latence (= effet post-antibiotique (EPA)) sont déterminés durant les premières heures de culture suivant la formule : $EPA = T - C$

Après 2 h d'exposition de l'isolat clinique SARM T28.1 à différentes concentrations de juncusol ou de juncuénine B, nous observons que ces 2 composés induisent une latence de croissance de la souche même à des concentrations sub-inhibitrices. Dans l'ensemble, nous observons une prolongation progressive de l'EPA en augmentant les concentrations du dérivé phénanthrénique testé. Un temps de latence maximal de la croissance de *S. aureus* T28.1 a été obtenu avec le juncusol à la CMI $\times 4$. Il était de 0,8 h environ. Un retard maximal de la reprise de croissance a été observé pour *S. aureus* T28.1 avec la juncuénine B à la CMI $\times 8$. Le temps de latence estimé était d'environ 3,4 heures (**Tableau 15**).

Remarque : On observe toutefois une anomalie pour la juncuénine B qui a entraîné un temps de latence négatif à la CMI $\times 2$. Cette valeur négative de l'EPA pourrait s'expliquer par le fait qu'au cours des premières heures de croissance après l'étape d'inactivation, une augmentation plus rapide du nombre d'unité formant colonie s'est produite au niveau du tube de culture de la juncuénine B à la CMI $\times 2$ par rapport à celui dans le tube témoin.

Tableau 15. Temps de latence maximums observés (ou effet post-antibiotique) sur une population de *S. aureus* T28.1 après 2 h de traitement avec le juncusol ou avec la juncuénine B (testés à différentes concentrations). Seules les valeurs maximales de l'EPA des 3 expériences indépendantes réalisées sont présentées.

Concentration Composé	EPA (h)					
	CMI/4	CMI/2	CMI	CMI × 2	CMI × 4	CMI × 8
Juncusol	0,2	0,4	0,6	0,9	0,8	ND
Juncuénine B	0,4	0,4	0,5	—	1,5	3,4

ND : non déterminé, — : valeur négative de l' EPA

2.2.5.4. Évaluation des synergies d'association du juncusol, du 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol et de la juncuénine B sur l'isolat clinique *Staphylococcus aureus* T28.1 par la méthode de l'échiquier (*checkerboard method*)

Face au phénomène d'émergence de la résistance aux antibiotiques, il est essentiel de souligner que peu d'options thérapeutiques sont disponibles pour lutter contre les souches résistantes aux antibiotiques surtout en médecine clinique. La combinaison des antibiotiques disponibles sur le marché avec des adjuvants tels que les composés naturels d'origine végétale est une des stratégies prometteuses existante. Cette stratégie pourrait permettre l'amélioration de l'efficacité des antibiotiques (Bhattacharya et al., 2021 ; Rolta et al., 2020). Ainsi, l'objectif des tests de synergie est d'évaluer l'interaction *in vitro* d'antibactériens afin de déterminer si l'effet de deux antibactériens est supérieur à la somme de leurs activités antibactériennes individuelles. Quatre principales méthodes existent pour l'évaluation de la synergie *in vitro* : la méthode de l'échiquier, le test de l'activité anti-bactéricide à combinaisons multiples, l'E-test et les *kill-time assay* (Doern, 2014). Pour notre étude, nous avons choisi d'employer la méthode de référence qui est celle de l'échiquier (*checkerboard method* en Anglais) (Hsieh et al., 1993). Nous avons, dans un premier temps, testé les associations entre les 3 composés phénanthréniques purifiés en quantités suffisantes (juncusol, 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol et juncuénine B). Ensuite, toujours dans le but d'optimiser l'activité antibactérienne de ces derniers, nous avons cherché à établir des associations avec certains antibiotiques (= associations dérivé phénanthrénique – antibiotique). Les associations au sein des échiquiers ont été conçues de façon à inclure des antibiotiques appartenant à différentes classes, ayant différents modes d'action, mais qui dans leurs spectres d'activité

Chapitre 2 : Résultats et discussion : Étude de l'activité antibactérienne de *Juncus inflexus* contre les bactéries à Gram positif : cas de l'isolat clinique résistant à la méticilline *Staphylococcus aureus* T28.1

visent les souches de *Staphylococcus aureus*. Les antibiotiques qui ont été sélectionnés pour notre étude sont présentés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 16**).

Tableau 16. Antibiotiques sélectionnés pour le test de synergies d'association par la méthode de l'échiquier sur l'isolat clinique *Staphylococcus aureus* T28.1

Antibiotique	Famille	Mécanisme d'action
Ciprofloxacine (CIP)	Quinolones	Inhibe l'ADN gyrase bactérienne, une enzyme nécessaire à la réplication de l'ADN bactérien
Gentamicine (GEN)	Aminoglycosides	Se lie à l'ARN ribosomique bactérien et interfère ainsi avec la synthèse des protéines bactériennes
Oxacilline (OXA)	Bêtalactamines	Se fixe aux protéines de liaison des pénicillines (PLP) induisant l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane
Rifampicine (RIF)	Rifamycines	Se lie à l'ARN polymérase pour former un complexe stable provoquant ainsi l'inhibition de transcription de l'ADN en ARN messagers

Rappel : L'oxacilline est l'antibiotique de référence pour l'évaluation de la sensibilité de l'isolat clinique SARM T28.1.

Les résultats obtenus à l'issue des tests de synergies d'association par la méthode de l'échiquier sont interprétés en fonction de la littérature disponible sur les valeurs de l'indice de concentration d'inhibition fractionnaire (FIC : *Fractional Inhibitory Concentration Index*) (**Tableau 17**). Le type d'interactions peut être ainsi défini comme suit (Bonapace et al., 2002 ; Saiman, 2007) :

- ✓ $FIC < 0,5 \rightarrow$ effet synergique
- ✓ $0,5 \leq FIC \leq 1 \rightarrow$ effet additif
- ✓ $1 < FIC \leq 4 \rightarrow$ effet indifférent
- ✓ $FIC > 4 \rightarrow$ effet antagoniste

Pour évaluer les synergies d'association, nous avons réalisé 3 expériences indépendantes. Étant donné qu'il y avait certaines variabilités entre ces dernières, nous avons fait le choix de représenter les résultats sous forme d'un intervalle des indices FIC optimaux obtenus. Toutefois, il existe aussi une autre représentation des résultats des FIC ; il s'agit de la représentation géométrique sous forme d'isobogrammes (Berenbaum, 1978 ; Wagner and Ulrich-Merzenich, 2009).

Chapitre 2 : Résultats et discussion : Étude de l'activité antibactérienne de *Juncus inflexus* contre les bactéries à Gram positif : cas de l'isolat clinique résistant à la méticilline *Staphylococcus aureus* T28.1

Tableau 17. Valeurs de FIC et type d'interactions déterminés pour les associations dérivé phénanthrénique – dérivé phénanthrénique et dérivé phénanthrénique – antibiotique. Les valeurs de l'indice FIC sont présentées sous forme d'intervalles des valeurs optimales obtenues pour les 3 expériences indépendantes réalisées

Association	Indice FIC	Type d'interaction
Juncusol – 5e-1,8-dm-9,10-dhpn-2,7-diol	0,19 – 1	Synergique à additif
Juncusol - Juncuénine B	0,19 – 1,25	Synergique à indifférent
5e-1,8-dm-9,10-dhpn-2,7-diol – Juncuénine B	0,49 – 1,12	Synergique à indifférent
CIP – Juncusol	0,5 – 1,12	Additif à indifférent
GEN – Juncusol	0,25 – 0,62	Synergique à additif
OXA – Juncusol	0,5 – 2,06	Additif à indifférent
RIF – Juncusol	1 – 1,5	Additif à indifférent
CIP – 5e-1,8-dm-9,10-dhpn-2,7-diol	0,31 – 0,75	Synergique à additif
GEN – 5e-1,8-dm-9,10-dhpn-2,7-diol	0,37 – 1,13	Synergique à indifférent
OXA – 5e-1,8-dm-9,10-dhpn-2,7-diol	0,53 – 2,06	Additif à indifférent
RIF – 5e-1,8-dm-9,10-dhpn-2,7-diol	1,12 – 2,06	Indifférent
CIP – Juncuénine B	1,06 – 2,06	Indifférent
GEN – Juncuénine B	0,19 – 1,13	Synergique à indifférent
OXA – Juncuénine B	0,56 – 1,25	Additif à indifférent
RIF – Juncuénine B	1,06 – 2,49	Indifférent

Le type d'interaction résultant des associations de 2 ou de plusieurs composés peut être : synergique (FIC < 0,5), additif 0,5 ≤ FIC ≤ 1), indifférent (1 < FIC ≤ 4) ou antagoniste (FIC > 4) (Bonapace et al., 2002 ; Saiman, 2007).

Ciprofloxacine (CIP), Gentamicine (GEN), Oxacilline (OXA) et Rifampicine (RIF)

5e-1,8-dm-9,10-dhpn-2,7-diol = 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol

D'après les données du **Tableau 17**, nous constatons que l'activité antibactérienne des 3 composés phénanthréniques (juncusol, 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol et juncuénine B), isolés à partir de la fraction F'4 du sous-extrait CH₂Cl₂ des rhizomes de *Juncus inflexus*, s'est globalement améliorée en les associant entre eux (composé phénanthrénique – composé phénanthrénique) : un effet synergique a pu être déterminé selon certaines expériences. Le synergisme est obtenu quand l'effet combiné de 2 ou de plusieurs composés est supérieur à la somme de l'effet de chaque composé testé individuellement (EUCAST, 2000). Un effet de synergisme peut être obtenu quand les 2 composés testés (ou encore quand les constituants d'un extrait de plante) affectent différentes cibles du microorganisme étudié ou quand les composés interagissent entre eux permettant l'amélioration de certains paramètres physico-chimiques tels que la solubilité et ainsi la biodisponibilité de l'un ou l'autre (paramètres pharmacocinétiques). Il est également possible qu'un effet synergique se produise lorsqu'un antibiotique est associé à un agent capable de s'opposer au mécanisme de résistance bactérienne (Wagner and Ulrich-Merzenich, 2009). Cependant, en raison de la variabilité des résultats entre les 3 expériences, un effet additif a pu être également observé lors de l'association du juncusol avec le 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-

dihydrophénanthrène-2,7-diol et un effet indifférent pour les associations juncusol – juncuénine B et 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol – juncuénine B. Selon la littérature, un effet additif se produit lorsque l'effet combiné de 2 ou de plusieurs composés est égal à la somme de l'effet de chaque composé administré seul. Alors qu'un effet indifférent se produit lorsque l'effet résultant est le même que celui du composé le plus actif (EUCAST, 2000 ; Rakholiya et al., 2013).

Les associations composé phénanthrénique – antibiotique donnent des effets plus variés mais aucun effet d'antagonisme n'a été observé. En revanche, une tendance vers un effet indifférent a été relevée pour la plupart des combinaisons. Les associations les plus prometteuses sont celles du juncusol – gentamicine, 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol – ciprofloxacine et juncuénine B – gentamicine ; nous retrouvons un effet synergique à additif pour les deux premières associations et un effet synergique à indifférent pour la dernière association.

Le test de synergie utilisant la méthode de l'échiquier reste parmi les méthodes les plus utilisées car elle donne une bonne estimation *in vitro* de l'effet de l'association des 2 produits testés (Berenbaum, 1978 ; Garcia, 2010). Bien que cette méthode présente plusieurs intérêts, elle a malheureusement certaines limites liées à sa performance (c'est-à-dire sa capacité à donner des résultats avec une précision acceptable dans des conditions variables minimales), sa standardisation et l'interprétation de ses résultats. Par ailleurs, le problème majeur de cette méthode réside dans l'emploi des dilutions successives au demi lors de la préparation des 2 produits à tester. Pour un composé donné, la marge d'erreur attendue lors de l'emploi de la méthode de dilutions successives au demi est estimée à ± 1 dilution au demi (MacLowry et al., 1970). Cette marge augmente, par conséquent lors de l'expérience de l'échiquier car la dilution est appliquée pour les 2 composés à tester (Brennan-Krohn and Kirby, 2019). Ainsi, l'ensemble de ces limites pourrait fausser l'interprétation des résultats, pouvant éventuellement expliquer la tendance vers un effet indifférent quand nous avons testé les associations des composés phénanthréniques de *Juncus inflexus* avec les différents antibiotiques testés.

Une étude récente italienne (Bellio et al., 2021) propose une nouvelle version plus simplifiée de la méthode de l'échiquier et ceci en quantifiant par spectrophotométrie le pourcentage de croissance bactérienne au niveau des puits de la microplaque. Des valeurs de CMI pour chaque association produit – produit sont par la suite déterminées. Enfin, afin d'évaluer *in vitro* le type

d'interaction, les différentes données, obtenues à partir de la méthode de l'échiquier, sont analysées par des modèles non paramétriques très utilisés en pharmacodynamie : *Loewe additivity model* et *Bliss Independence theory* (BI). En outre, l'étude de Brennan-Krohn and Kirby (2019) propose une version plus rapide et plus simple de criblage à haut débit de synergies d'association via l'utilisation du *checkerboard assay method* en format automatisé. L'équipement développé assure ainsi une précision et une régularité lors de la distribution de petits volumes des solutions-mères des composés à tester dans les puits de la microplaque. Il permet également d'éviter les calculs complexes et les multiples étapes de pipetage (Smith and James E., 2016).

Comme la méthode de l'échiquier est basée sur la détermination des valeurs des CMI, ce qui reflète entre autres l'inhibition de la croissance bactérienne, d'autres expériences d'évaluation des synergies d'association pourraient être envisagées dans le but de compléter ce travail. Par exemple, les tests de synergies d'association moyennant la méthode de *kill-time assay* (→ *kill-time synergy assay*). Même si cette technique est assez chronophage, elle pourrait se montrer intéressante de par sa capacité à nous permettre de caractériser davantage la synergie observée en microplaques. En effet, cette méthode nous apporterait plus de clarté sur la façon dont l'association de composés affecte les bactéries durant leur cycle de croissance (cinétique). De plus, elle nous permettrait de déterminer si l'association obtenue aurait un effet antibactérien bactériostatique ou bactéricide.

Toutefois, il est important de souligner qu'à l'heure actuelle, toutes les méthodes de test de synergies d'association ne permettent pas d'affirmer avec certitude leur utilité clinique faute d'absence de corrélations souvent satisfaisantes entre les résultats obtenus *in vitro* et ceux obtenus *in vivo* (Doern, 2014).

2.2.5.5. Évaluation de l'activité anti-biofilm du juncusol, du 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol et de la juncuénine B sur l'isolat clinique *Staphylococcus aureus* T28.1

Les biofilms peuvent être définis comme des communautés de microorganismes enchâssés dans une matrice polysaccharidique extracellulaire. Ils se distinguent de leurs formes planctoniques par l'expression de gènes spécifiques et la présence de différentes voies métaboliques (Dauros-Singorenko et al., 2020 ; O'Toole et al., 2000). Les organismes américains de la santé, le NIH

et le CDC (*National Institutes of Health* et *Centers for Disease Control and Prevention*), estiment, qu'à l'heure actuelle, 60% des infections impliquent des biofilms. Pour les souches de *Staphylococcus aureus*, la structure du biofilm est considérée comme un trait important de virulence. Il peut être impliqué dans de nombreuses infections nosocomiales et des infections provenant des dispositifs médicaux (implant, cathéter, valve cardiaque...). Ces biofilms bactériens sont capables de libérer des bactéries planctoniques, pouvant engendrer des infections systémiques. De ce fait, en cas d'infections associées au biofilm de *Staphylococcus aureus*, les dispositifs médicaux doivent être fréquemment remplacés contrairement aux infections associées aux biofilms de *Staphylococcus epidermidis* car ce dernier possède moins de facteurs de virulence (Jones et al., 2001 ; Lebeaux and Ghigo, 2012). Malgré la mise en œuvre de nombreuses mesures préventives, les biofilms de *Staphylococcus aureus* sont toujours difficiles à éradiquer en raison de leur tolérance caractéristique à des doses élevées d'antibiotiques. Des travaux antérieurs au sein de l'équipe du Dr Christel Neut ont déjà démontré que l'isolat clinique de *Staphylococcus aureus* T28.1 était capable de produire un biofilm. Grâce à des puces à ADN, son génome a été caractérisé et des gènes impliqués dans la formation de biofilm ont été identifiés, notamment ceux codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse de la capsule polysaccharidique (capH5, capJ5, capK5) et des protéines d'adhésion (icaA, icaC, icaD). (Bocquet, 2018).

Pour cette étude, nous nous sommes intéressés à l'évaluation du potentiel anti-biofilm *in vitro* en microplaques de polystyrène 96 puits (surface inerte) du juncusol, du 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol et de la juncuénine B. Nous avons à la fois étudié l'effet de ces composés sur la formation de biofilm formé par la souche de *Staphylococcus aureus* T28.1, mais aussi leur effet sur la destruction de ce dernier. L'étude de l'effet destructeur du biofilm des composés est particulièrement d'intérêt pour les cliniciens car, au moment du diagnostic, le biofilm est déjà établi.

D'après les données de la littérature, il a été démontré que des concentrations élevées en glucose dans le milieu de culture favorisaient la production de biofilms bactériens. L'étude *in vitro* de Waldrop et ses collaborateurs s'est intéressée à comprendre la relation dose-réponse entre la biomasse du biofilm formé (des souches de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 et de *Staphylococcus aureus* ATCC 49230, UAMS-1) et la variation de concentrations en glucose dans le milieu de culture. Ces travaux ont pu mettre en évidence que la biomasse du biofilm de *Staphylococcus aureus* ATCC 4923 devient nettement plus importante en utilisant des concentrations croissantes en glucose. Un seuil de réponse a été déterminé entre 200 et 240

mg.dL⁻¹ (Waldrop et al., 2014). Un résultat similaire a été obtenu dans une étude plus ancienne, celle de Croes et al., 2009. Les auteurs ont reporté qu'à des concentrations en glucose comprises entre 250 et 500 mg.dL⁻¹, la biomasse du biofilm formé par des souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline a été plus importante à celle du biofilm formé par des souches de *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline (Croes et al., 2009).

Pour nos expérimentations, nous avons donc choisi de travailler avec le milieu de culture BHI (*Brain Heart Infusion*) supplémenté en glucose (10 mg.mL⁻¹), qui correspond à la glycémie normale en conditions physiologiques chez l'Homme. Les 3 composés phénanthréniques ont été testés à différentes concentrations pour étudier leur activité anti-biofilm (formation et destruction). D'après la **Figure 37**, nous pouvons, premièrement, remarquer que le solvant MeOH a un léger effet inhibiteur (~12% d'inhibition) en comparaison avec le témoin de culture. Cependant le test statistique effectué ne montre aucune différence statistique entre les deux. Nous pouvons également constater que les trois dérivés phénanthréniques possèdent un effet inhibiteur sur la formation du biofilm de *Staphylococcus aureus* T28.1 sur surface inerte. À la CMI $\times 2$ (= 39,06 μ g.mL⁻¹), le juncusol et le 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol présentent une inhibition supérieure à 80%. Quant à la juncuénine B, son effet inhibiteur paraît plus important car à la concentration sub-inhibitrice CMI/2 (4,88 μ g.mL⁻¹), elle inhibe la formation du biofilm de 63,5%. Le juncusol (à la CMI $\times 2$ et la CMI $\times 4$), le 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol (à la CMI $\times 4$ et la CMI $\times 8$) et la juncuénine B (à la CMI $\times 2$, CMI $\times 4$ et la CMI $\times 8$) inhibent presque totalement la formation du biofilm de l'isolat clinique SARM T28.1 (94,5% d'inhibition). Ce résultat semble être en accord avec l'effet constaté au niveau des courbes de croissance notamment pour la juncuénine B.

Une fois le biofilm de l'isolat clinique SARM T28.1 établi, la destruction de ce dernier semble plus difficile à obtenir. Nous observons un effet destructeur modéré pour les composés phénanthréniques testés : inhibition de 47,2%, 45,7% et 38,3% respectivement pour la juncuénine B (à la CMI $\times 8$), le juncusol (à la CMI $\times 4$) et le 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol (à la CMI $\times 8$). Malgré un effet destructeur du biofilm par les 3 composés phénanthréniques moins important que leur effet inhibiteur, nos expériences ont pu démontrer que la matrice extracellulaire constituant le biofilm de l'isolat clinique SARM T28.1, bien qu'elle soit une barrière, permettait quand même la diffusion limitée des composés phénanthréniques à pouvoir antibactérien. La matrice EPS (substances polymériques extracellulaires) agit donc comme une barrière physique. Par ailleurs, des interactions entre les

composants de la matrice EPS et l'agent antibactérien testé, les composés phénanthréniques dans notre cas, pourraient les rendre moins actifs. Ces interactions pourraient affecter la biodisponibilité de ces derniers, d'où la baisse de leur pouvoir antibactérien (Borges et al., 2015). Les biofilms bactériens sont difficiles à éradiquer par des biocides et des antibiotiques car ils possèdent des propriétés originales et uniques, physiologiques et métaboliques, les distinguant des propriétés que possèdent les bactéries à l'état planctonique. Malheureusement, la plupart des antibiotiques ont été développés pour inhiber la croissance des bactéries à l'état planctonique. La recherche fondamentale demeure donc essentielle pour déceler les mécanismes et les voies de régulation des biofilms bactériens, clés pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

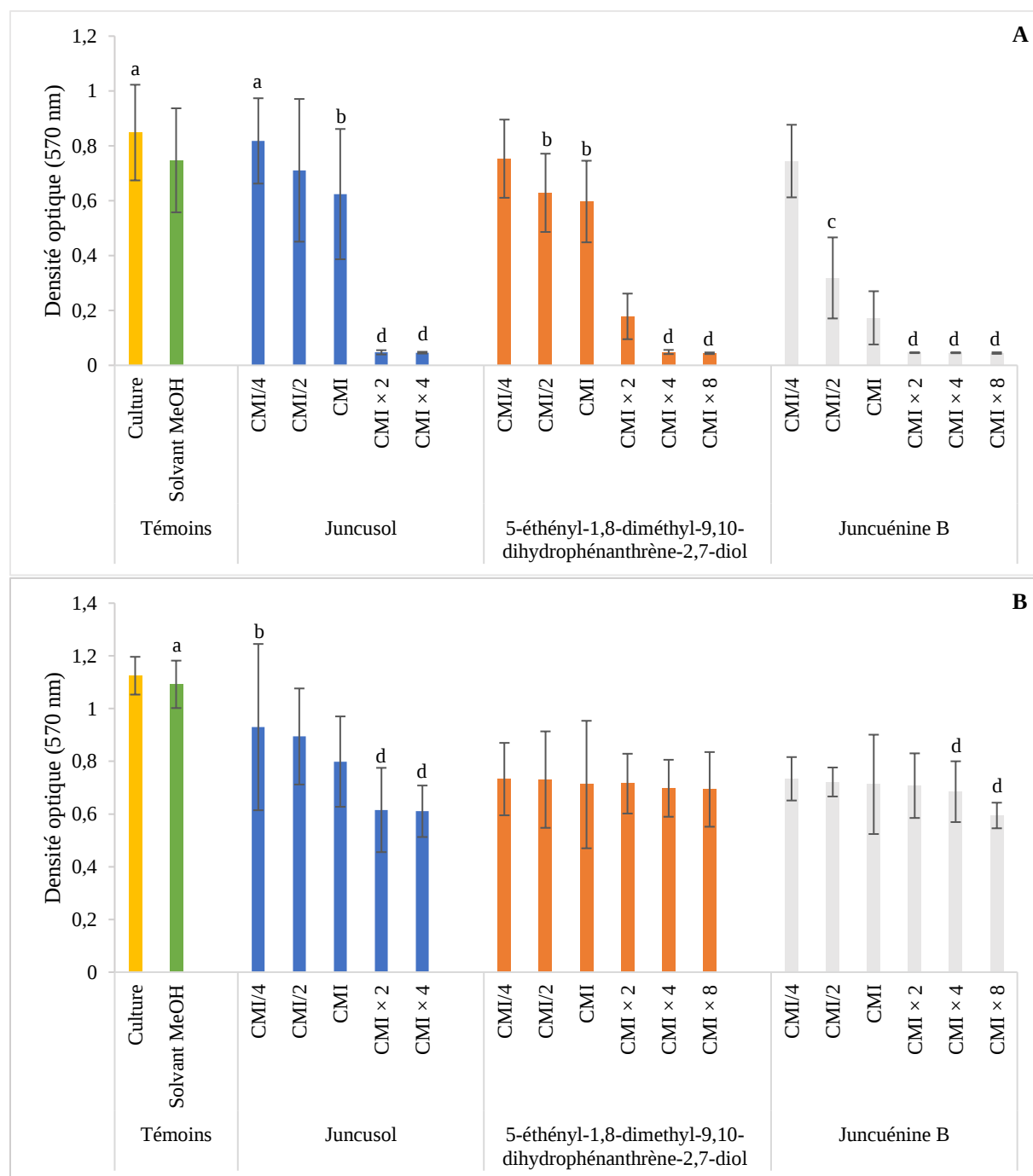


Figure 37. Effet (A) inhibiteur et (B) destructeur des composés phénanthréniques envers le biofilm de l'isolat clinique de *Staphylococcus aureus* T28.1 sur une surface inerte. Ces données sont le résultat de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata. Ces données sont le résultat de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata. Les valeurs avec différentes lettres (a, b, c ou d) indiquent une différence significative entre les traitements selon le test ANOVA suivi de Duncan's multiple-range test ($p \leq 0.05$).

Afin de compléter notre étude sur l'activité anti-biofilm (contre SARM T28.1) des composés phénanthréniques *in vitro*, nous avons décidé de confirmer les résultats obtenus sur un substitut de substrat réel : un substitut osseux synthétique. Pour cela, nous avons refait les mêmes expériences en microplaques spécifiquement développées par l'entreprise canadienne Innovotech® pour un criblage à haut débit de l'efficacité des antimicrobiens contre des biofilms de nombreux micro-organismes. Ces microplaques, commercialisées sur le nom de MBEC Assay® Biofilm Inoculator, sont munies de couvercles sur lesquels sont greffés des picots, qui servent de supports pour le développement des biofilms. Nous avons ainsi travaillé avec ces microplaques dont le support est revêtu d'hydroxyapatite, qui est la principale composante minérale de l'émail dentaire, de la dentine et de l'os. Nos résultats préliminaires (données non montrées dans ce manuscrit) montrent un effet similaire à celui précédemment obtenu pour l'ensemble des composés phénanthréniques testés sur la formation de biofilm du SARM T28.1. Par contre, nous avons obtenu des résultats très variables et parfois incohérents lors de l'évaluation de l'effet destructeur de biofilm. Pour cela, il sera nécessaire d'optimiser certains paramètres du protocole opératoire employé tels que par exemple la durée et la puissance de la sonication.

Pour aller plus loin dans la réflexion, il serait particulièrement intéressant d'essayer de comprendre le mécanisme d'action de ces composés phénanthréniques sur l'isolat clinique SARM T28.1 à l'état planctonique et l'état de biofilm. À cet effet, des analyses à l'aide de la microscopie électronique en transmission à balayage pourraient nous permettre l'acquisition de certains éléments clés, en l'occurrence via l'observation de certains changements structuraux des bactéries/biofilms lors d'un traitement avec les composés phénanthréniques.

3. Mise en place d'une formulation topique : hydrogel de chitosane (CHT)/cyclodextrine (CD)chargé de juncusol

L'étude de mise en place d'une formulation topique biocompatible destinée à la cicatrisation des infections des ulcères diabétiques impliquant l'isolat clinique de *S. aureus* T28.1 a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Pr Nicolas Blanchemain, et avec le doctorant Henry Chijcheapaza-Flores (INSERM U1008 "Advanced Drug Delivery Systems", Faculté de médecine, Université de Lille).

3.1. Étude de complexation Juncusol/ β -CD : Test de solubilité

Pour initier cette étude, il a été essentiel dans un premier temps de choisir le dérivé de β -CD le plus approprié permettant la meilleure solubilisation du juncusol. Pour cela, une seule concentration en β -CD et 3 de ses dérivés à 20 mg.mL^{-1} : Poly- β -CD (polymère de β -CD) , HP- β -CD (*Hydroxypropyl- β -CD*) et Poly-CTR-HP- β -CD (polymère d'hydroxypropoyl- β -CD réticulé avec de l'acide citrique ; *Citric acid crosslinked hydroxypropyl- β -CD polymer* en Anglais) a été mise en contact avec du juncusol mis en excès (3 mg.mL^{-1} /puit) selon le protocole décrit par Garcia Fernandez et al., (2019). Après incubation, les différents échantillons ont été filtrés et analysés par UHPLC-UV-MS pour quantifier le juncusol solubilisé. L'intégration des aires sous courbe du juncusol à $\lambda = 280 \text{ nm}$ grâce à la méthode de quantification développée (**Chapitre 3 partie 2.3**) nous a permis d'obtenir une estimation de la teneur en juncusol qui a été solubilisé en contact de chaque cyclodextrine/polymère : 0,41 ; 20,87 ; 9,90 ; 43,60 et 29,87 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivement pour l' H_2O ultrapure (témoin), la β -CD, le Poly- β -CD, l'HP- β -CD et le Poly-CTR-HP- β -CD (**Figure 38**).

Nos résultats confirment que la β -CD et ses dérivés augmentent véritablement la solubilité du juncusol dans l'eau, et l'HP- β -CD a permis la meilleure solubilisation. Toutefois, comme le CHT est chargé positivement, il a été plus pertinent de choisir un polymère de β -CD qui soit chargé négativement afin de favoriser l'établissement des interactions entre les 2 polymères. Ainsi, nous avons sélectionné le Poly-CTR-HP- β -CD pour la formulation de l'hydrogel.

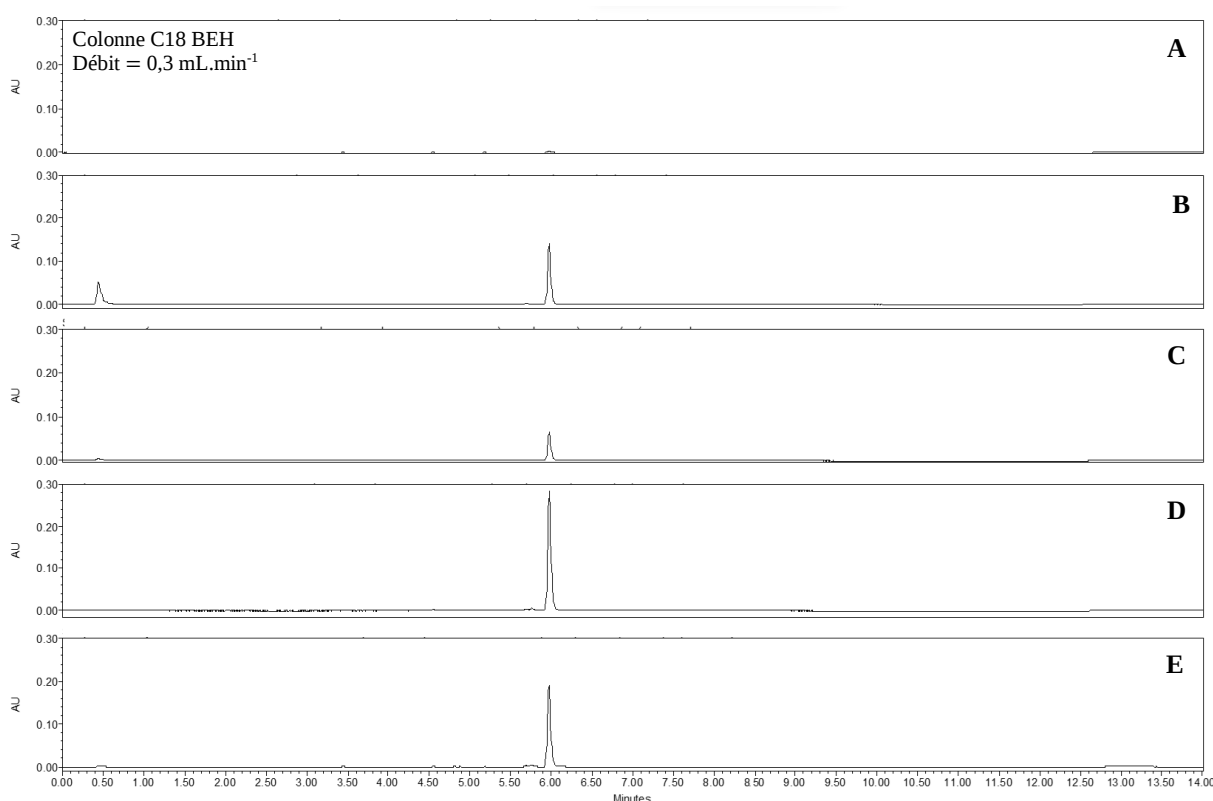


Figure 38. Chromatogrammes obtenus par UHPLC-UV à $\lambda = 280$ nm (mise à l'échelle Y = 0,3) du juncusol solubilisé dans (A) l' H_2O ultrapure ; (B) la $\beta\text{-CD}$; (C) le Poly- $\beta\text{-CD}$; (D) l'HP- $\beta\text{-CD}$ et (E) le Poly-CTR-HP- $\beta\text{-CD}$

3.2. Hydrogels de CHT/Poly-CTR-HP- $\beta\text{-CD}$ /Juncusol : formation et caractérisation macroscopique

3.2.1. Formation des hydrogels de CHT/Poly-CTR-HP- $\beta\text{-CD}$ /Juncusol

De précédents travaux menés au sein du laboratoire de l'équipe INSERM U1008 "Advanced Drug Delivery Systems" ont permis de mettre au point certains paramètres et l'ensemble des étapes à suivre pour élaborer des hydrogels physiques de CHT/Poly-CTR-HP- $\beta\text{-CD}$ homogènes. Parmi les paramètres importants, on notera la concentration en CHT qui doit être de 3% m/v et la granulométrie des poudres des différents polymères qui doit être $< 125 \mu\text{m}$. Les étapes de formation d'un hydrogel homogène consistent à mettre dans un premier temps en suspension aqueuse les poudres de CHT et de Poly-CTR-HP- $\beta\text{-CD}$ co-broyées, puis d'acidifier le milieu par de l'acide lactique. En effet, l'acidification déclenche la dissolution des fines particules du CHT et la protonation de ses groupes aminés. Lors de cette dissolution, les chaînes solvatées du CHT induisent une augmentation de la viscosité, permettant ainsi aux groupes aminés protonés disponibles (NH_3^+) d'interagir avec les groupes carboxyles (COO^-) du Poly-

CTR-HP- β -CD. Ceci conduit à la formation d'un complexe électrolytique. La réticulation de ce dernier induit la formation d'un hydrogel physique de CHT/Poly-CTR-HP- β -CD (**Figure 39**).

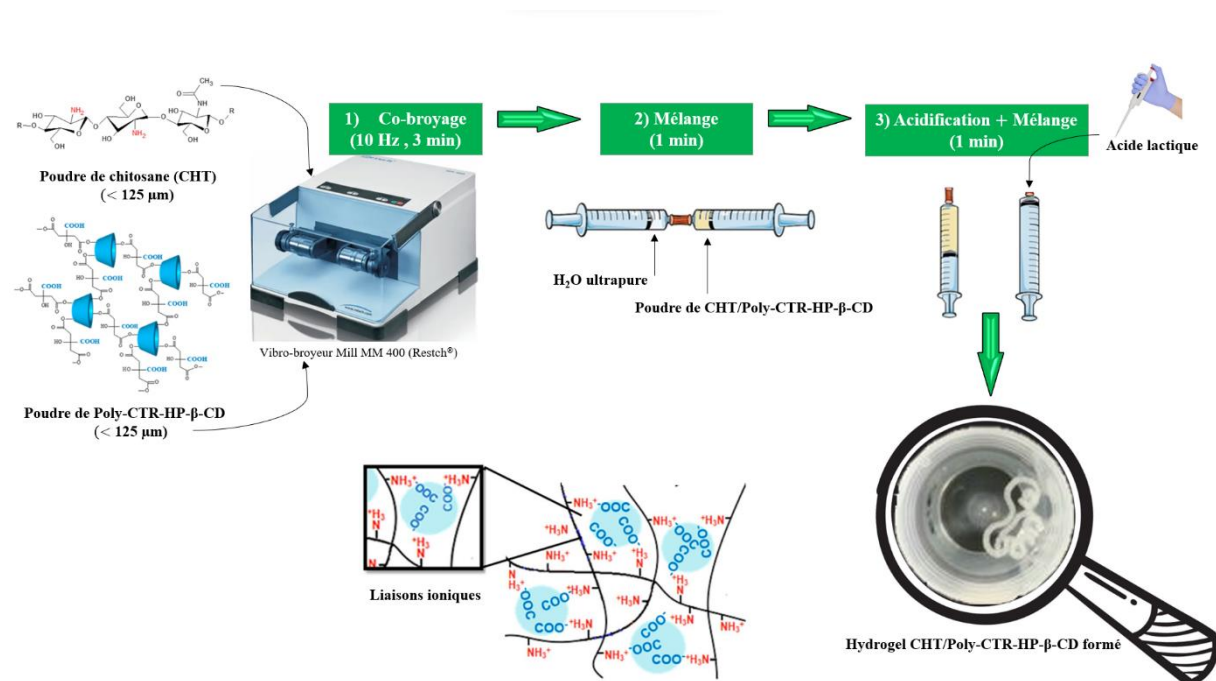


Figure 39. Représentation schématique des différentes étapes aboutissant à la formation des hydrogels de CHT/Poly-CTR-HP- β -CD (figure de l'article de Palomino-Durand et al., (2019) adaptée)

3.2.2. Caractérisation macroscopique des hydrogels

3.2.2.1. Test du flacon retourné

Le test du flacon retourné permet d'établir les premières observations qualitatives quant à la formation de l'hydrogel (gélification) ainsi que sa stabilité. Ainsi, il permet d'observer la compacité de l'hydrogel et son écoulement ou pas sous l'action de son propre poids. L'ensemble des formulations testées en CHT/Poly-CTR-HP- β -CD/Juncusol (3:0:0 ; 3:0:1 ; 3:3:0 ; 3:2:0 et 3:2:1) ont permis de générer des gels transparents homogènes immédiatement après leurs injections (c'est-à-dire à T_{0h}) au fond des flacons en verre. Aucune séparation de phase poudre/solvant n'a été observée. D'après la **Figure 40**, nous remarquons que les témoins : 3:0:0 (hydrogel de CHT sans Poly-CTR-HP- β -CD et sans juncusol) et 3:0:1 (hydrogel de CHT/Juncusol) présentent un écoulement complet à T_{24h} . Par opposition, les hydrogels avec les formulations : 3:3:0, 3:2:0 et 3:2:1 ne s'écoulent pas sous l'effet de leurs poids durant

l'expérience et même après 24 h d'incubation à 37 °C. Une étude rhéologique permettra d'approfondir ces résultats macroscopiques.

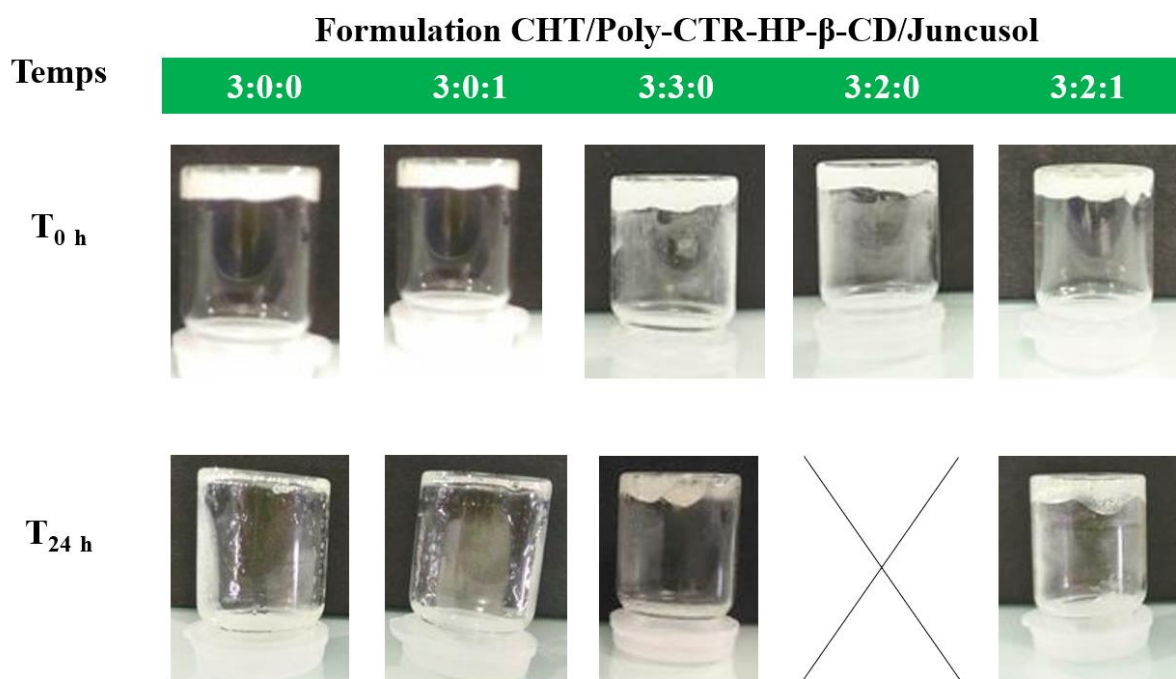


Figure 40. Observations de la formation et de la stabilité des hydrogels de CHT/Poly-CTR-HP-β-CD/Juncusol à différents ratios (3:0:0 ; 3:0:1 ; 3:3:0 ; 3:2:0 et 3:2:1) à T_{0 h} et T_{24 h} par le test du flacon retourné. La photo de la formulation (3:2:0) est absente pour T_{24 h} en raison d'un problème technique, mais l'aspect de l'hydrogel est le même que celui obtenu pour les formulations (3: 3:0) et (3:2:1).

3.2.2.2. Intégrité structurelle des hydrogels dans du PBS

Les différents hydrogels préparés ont été injectés dans du PBS (pH = 7,4) à 37 °C dans le but d'évaluer leur stabilité et leur intégrité (= cohésion du cordon) dans le temps (pendant 24 h). D'après la **Figure 41**, nous observons que les 5 hydrogels injectés présentent une structure en forme de cordon ininterrompu avec une surface lisse. Les 2 témoins (3:0:0 et 3:0:1) ont commencé à se déformer dans le PBS et à se désintégrer dès les 30 premières minutes de l'expérience (photos non prises) jusqu'à dispersion totale à T_{24 h}. Pour le témoin 3:0:1, cela pourrait s'expliquer par l'absence ou le manque de liaisons ioniques entre le CHT et le juncusol. En contrepartie, les hydrogels 3:3:0 ; 3:2:0 et 3:2:1 montrent une meilleure stabilité dimensionnelle et une meilleure intégrité structurelle car ils possèdent une bonne cohésion de cordon même à T_{24 h}.

Même si la formulation 3:3:0 a pu générer un hydrogel stable et intègre visuellement, nous avons fait le choix de ne pas la retenir car le mélange du contenu des 2 seringues interconnectées a été difficilement réalisé lors de la suspension des poudres co-broyées de CHT/Poly-CTR-HP- β -CD avec de l' H_2O ultrapure. Nous avons alors opté pour la formulation 3:2:0 (et 3:2:1 en présence du juncusol) pour le reste de cette étude.

La mesure de la force d'injection sera envisagée pour vérifier que l'hydrogel est bien utilisable en clinique. En effet, l'hydrogel ne doit pas être trop difficile à injecter. La valeur de la force d'injection ne doit pas dépasser 50 newtons (Vo et al., 2016).

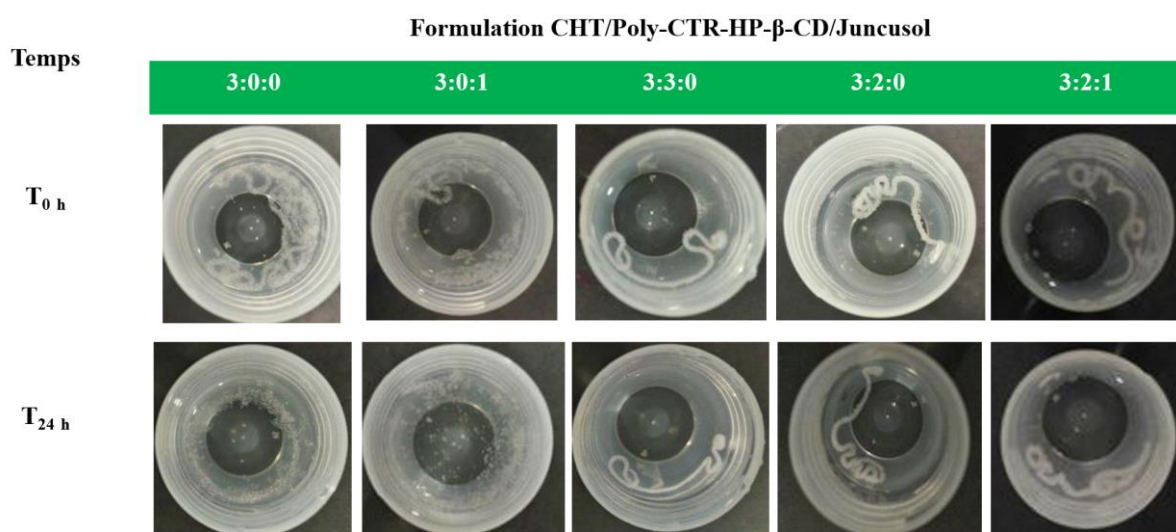


Figure 41. Évaluation qualitative de l'intégrité et de la stabilité structurelle des cordons des hydrogels de CHT/Poly-CTR-HP- β -CD/Juncusol à différents ratios (3:0:0 ; 3:0:1 ; 3:3:0 ; 3:2:0 et 3:2:1) directement après injection (à T_0 h) dans du PBS (pH = 7,4) et après 24 h d'incubation à 37 °C

3.3. Étude de cinétique de libération du juncusol

Les études de libération *in vitro* sont extrêmement importantes dans le processus de contrôle qualité en industrie pharmaceutique. Elles doivent être bien maîtrisées avant de pouvoir procéder aux essais cliniques sur les animaux et l'Homme. Ces dernières permettent d'anticiper la cinétique de libération du principe actif (PA) et de suivre le comportement de la matrice contenant ce dernier. De nombreux équipements dédiés à ces études sont décrits dans les pharmacopées américaine et japonaise, tels que notamment le *paddle apparatus* (USP 2) ou encore le *flow-through cell dissolution tester* (USP 4).

D'un point de vue clinique, les systèmes de délivrance de PA les plus efficaces (hydrogel de CHT/Poly-CTR-HP- β -CD dans notre cas d'étude) seraient ceux qui permettent de délivrer sur une période prolongée une dose constante de PA (juncusol ici). Cette cinétique dépend de plusieurs paramètres et elle peut être modulée en fonction des propriétés des gels.

3.3.1. En condition statique par prélèvement ponctuel manuel

Dans un premier temps, nous avons commencé à étudier la cinétique de libération du juncusol en injectant 0,2 mL de l'hydrogel CHT/Poly-CTR-HP- β -CD/Juncusol préparé avec la formulation retenue (3:2:1) dans un pot contenant 30 mL de PBS. Des prélèvements ponctuels ont été réalisés comme décrit dans le **Chapitre 3 partie 5.6.1** et le juncusol libéré a été quantifié par UHPLC-UV. Pour ce test préliminaire, l'hydrogel a été formé en effectuant un co-broyage de poudre de CHT et de Poly-CTR-HP- β -CD. Le juncusol a ensuite été ajouté aux poudres co-broyées, puis l'ensemble a été mis en suspension dans de l'H₂O ultrapure à l'aide des seringues interconnectées avant d'ajouter de l'acide lactique pour obtenir l'hydrogel final. La courbe orangée sur la **figure 42** montre qu'au bout de 168 h, seulement 4,8% du juncusol a été libéré. Ce pourcentage est extrêmement faible et pourrait résulter d'une complexation incomplète du juncusol avec le Poly-CTR-HP- β -CD en raison de la brièveté de l'étape de suspension (seulement 1 min de mélange). Cette expérience devra être reproduite au moins en trois répétitions indépendantes.

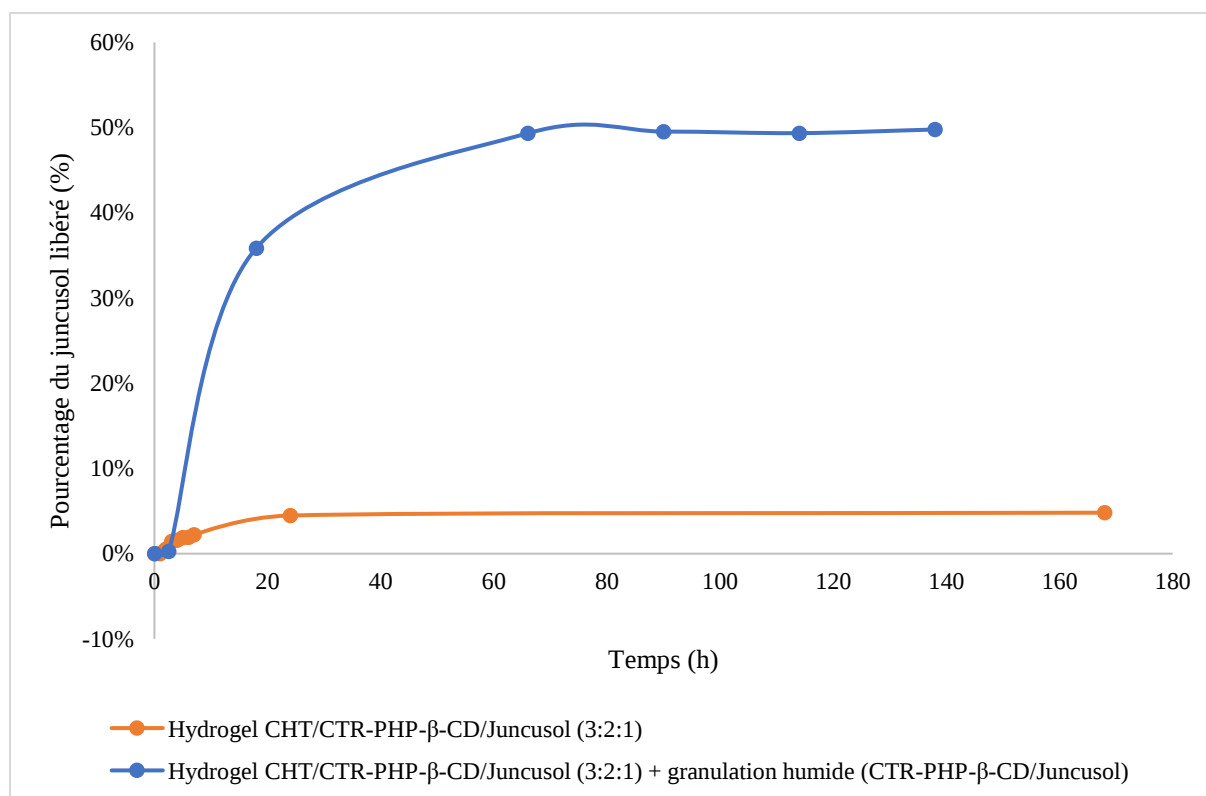


Figure 42. Cinétique de libération du juncusol à partir des hydrogels de CHT/Poly-CTR-HP-β-CD/Juncusol en condition statique ($V_{\text{PBS}} = 30 \text{ mL}$, 80 rpm et 37 °C) avec (courbe bleue, $n = 2$) ou sans granulation humide (courbe orangée, $n = 1$)

Pour remédier à cette problématique, nous avons décidé de réaliser une granulation par voie humide entre le juncusol et le Poly-CTR-HP-β-CD en amont de l'étape de co-broyage des poudres de CHT et de Poly-CTR-HP-β-CD et en utilisant de l' H_2O comme liant (un faible volume d'eau a été utilisé) (**Figure 43**). Ce procédé offre de nombreux avantages dont notamment une amélioration de la biodisponibilité, une certaine homogénéité et une amélioration des propriétés électrostatiques des poudres. Après séchage et tamisage de la poudre de Poly-CTR-HP-β-CD/Juncusol (taille de poudre $< 125 \mu\text{m}$) issue de la granulation humide, cette dernière a été co-broyée avec la poudre du CHT et un hydrogel a été préparé. De la même manière, un suivi de la libération du juncusol a été réalisé ($n = 2$, 2 expériences indépendantes réalisées en triplicata). D'après la **Figure 42** (courbe bleue), nous remarquons une augmentation nette et rapide du juncusol libéré suite à la réalisation de la granulation humide : le juncusol est libéré en 24 h et la quantité libérée est 10 fois plus importante que celle sans granulation humide (49,7% **versus** 4,8%). Ainsi, la technique d'incorporation du PA au sein de l'hydrogel semble être un paramètre essentiel qui interfère dans la libération du PA.

Chapitre 2 : Résultats et discussion : Mise en place d'une formulation topique : hydrogel de chitosane-cyclodextrine chargé de juncusol

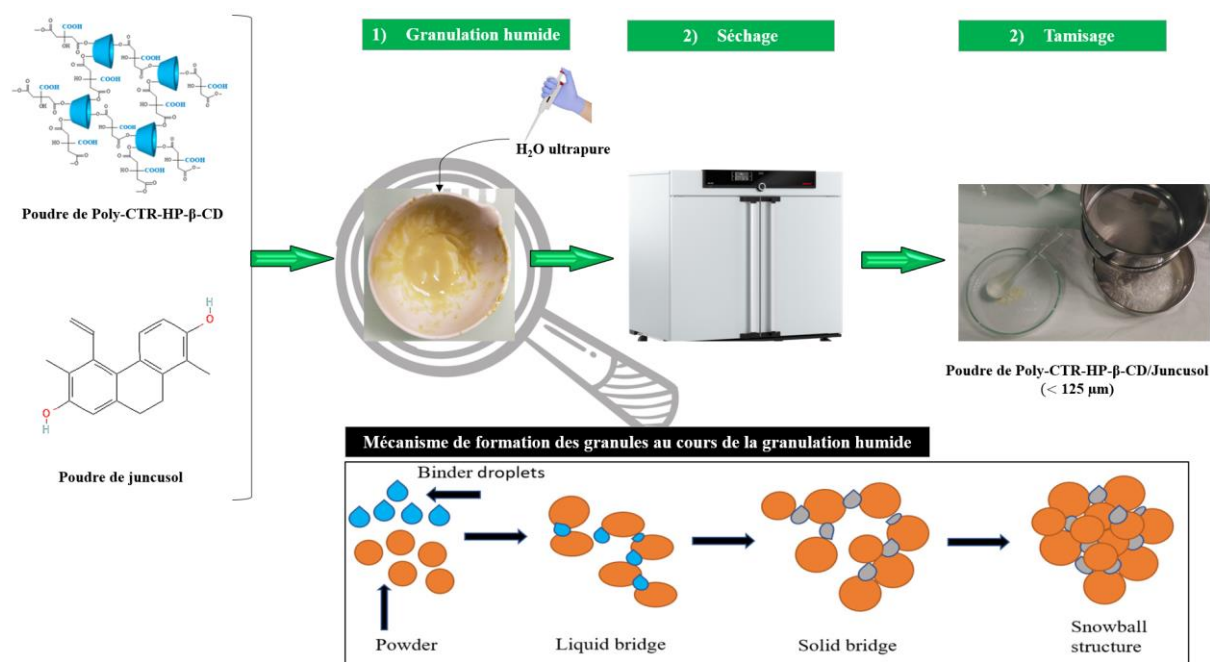


Figure 43. Représentation schématique de la préparation de poudre de Poly-CTR-HP-β-CD/juncusol en effectuant une granulation par voie humide

Toutefois, malgré cette amélioration du profil de libération, nous notons un plateau à 49% de T_{66 h} à T_{138 h}. Ce dernier pourrait résulter d'une saturation du milieu de libération en juncusol. Cette hypothèse sera en effet à vérifier. On respectera la condition SINK qui permet de minimiser l'effet de ralentissement qu'aurait une saturation du milieu sur la dissolution et la libération de la substance active. Pour une forme galénique placée dans un milieu donné, la limite idéale (*perfect sink conditions*) est de ne pas dépasser une concentration de 10% de la substance active dans ce milieu. Cette limite de solubilité du juncusol à ne pas dépasser dans le milieu pourra être calculée sur la base de sa solubilité dans le PBS que l'on divisera par 10.

À ce stade, nous avons décidé de garder cette formulation incluant une granulation humide Poly-CTR-HP-β-CD/Juncusol et d'augmenter le volume du milieu de libération pour voir si nous allons pouvoir libérer plus de 50% du PA.

3.3.2. En condition dynamique par la méthode de dissolution en flux continu

Afin de pouvoir se rapprocher des conditions physiologiques réelles, nous avons opté pour la réalisation d'un essai en condition dynamique et ceci en appliquant la méthode de dissolution en flux continu. L'expérience a été réalisée à l'aide d'un SOTAX® CE7 Smart-USP IV, et un

volume en PBS égal à 500 mL/hydrogel a été appliqué. Pour cette expérience, nous avons cherché à comparer la cinétique de libération du juncusol de la formulation retenue (3:2:1) à celle de l'hydrogel témoin (3:0:1) constitué uniquement de CHT et de juncusol. La cinétique de libération du juncusol de la formulation 3:2:1 est plus importante que celle du témoin : 24,8% **versus** 18,9% à $T_{72\text{ h}}$ (**Figure 44**). Par contre, la libération du juncusol de la formulation 3:2:1 en condition dynamique est moins importante que celle en condition statique (24,8% **versus** 49,7%). Nous pensons que cette baisse du profil de libération du juncusol pourrait se justifier par le fait que le volume de libération fixé en condition dynamique (500 mL) n'est pas optimal pour assurer une bonne libération du juncusol. Une seconde hypothèse pourrait être la présence d'interactions entre le juncusol avec certains composants de l'appareil SOTAX® USP IV (phénomène de sorption). Ceci reste à confirmer par des essais de libération supplémentaires. Le phénomène de sorption pourra également être vérifié en passant dans l'appareil SOTAX® USP IV une solution soluble de juncusol dans le PBS puis en mesurant sa concentration en fonction du temps. Si sa concentration diminue au cours du temps, le composé peut en effet se bloquer dans les tuyaux. Une autre hypothèse est sa possible dégradation au cours du temps bien que ce soit un composé stable.

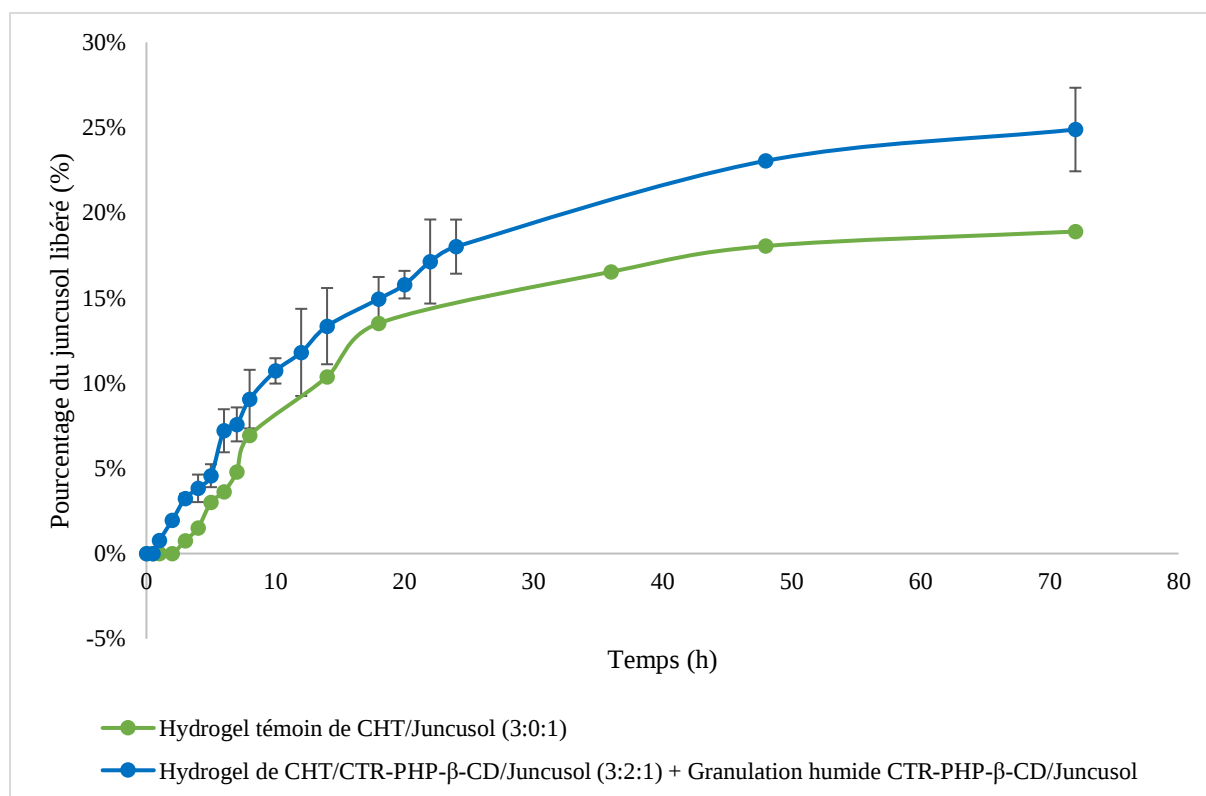


Figure 44. Cinétique de libération du juncusol à partir des hydrogels de CHT/Poly-CTR-HP-β-CD/Juncusol en condition dynamique (SOTAX® UPSIV : $V_{PBS} = 500$ mL, $37^{\circ}C$, flux = 5 mL.min⁻¹ et $37^{\circ}C$). Sur cette figure, un seul réplicat a été présenté pour l'hydrogel témoin (= courbe verte) et un duplicata a été présenté pour la formulation (3:2:1 ; courbe bleue).

Afin de pouvoir expliquer la différence des profils de libération du juncusol en conditions statique et dynamique, de nouvelles expériences seront nécessaires. De plus, il serait pertinent d'aboutir à une libération totale du juncusol. Une fois que la cinétique de libération est mise au point et afin de comprendre le mécanisme de libération du PA, une étude de modélisation basée sur les modèles *Zero-order release*, *First-order release Higuchi model* et *Korsmeyer-Peppas model*, pourrait être menée.

3.4. Évaluation de l'activité antibactérienne de l'hydrogel de CHT/Poly-CTR-HP-β-CD/Juncusol

Nous avons réalisé un test préliminaire de *kill-time assay* avec la formulation 3:2:1 de l'hydrogel de CHT/Poly-CTR-HP-β-CD/Juncusol sur l'isolat clinique *S. aureus* T28.1 (résistant à la méticilline et isolé d'un pied diabétique) pour évaluer la cinétique de réduction de la croissance bactérienne.

D'après la **Figure 45**, nous observons, pour l'hydrogel témoin (sans juncusol), une réduction d' $1 \log_{10}$ (UFC.mL⁻¹) au cours des 8 premières heures de mise en culture qui double après 24 h. L'hydrogel contenant le PA induit un déclin plus important après 8 h de culture ($> 3 \log_{10}$ (UFC.mL⁻¹)) et atteint le seuil de détection fixé à $1 \log_{10}$ (UFC.mL⁻¹) en fin d'expérience. Ainsi, la présence du PA dans la formulation induit un effet antibactérien bactéricide contre la souche de SARM T28.1. Cette expérience sera toutefois à reproduire pour conforter les résultats obtenus.

La légère activité antibactérienne déterminée pour l'hydrogel témoin pourrait être liée aux propriétés intrinsèques du CHT. En effet, le CHT est capable grâce à la présence des groupements amines (NH₃⁺) de créer des interactions électrostatiques avec la membrane microbienne, qui elle, est chargée négativement par la présence des peptidoglycanes et des acides lipotéichoïques. Des altérations au niveau de la perméabilité cellulaire microbienne peuvent en résulter et engendrent par la suite la libération du matériel intracellulaire bactérien (Hosseinnejad and Jafari, 2016 ; Tsai and Su, 1999). De plus, l'étude de Chung and Chen (2008) a pu montrer que le CHT est capable de se lier aux enzymes et aux nucléotides bactériens causant la perturbation de la structure cellulaire de *S. aureus*. Young and Kauss (1983) ont proposé un autre mécanisme d'action impliquant la capacité du CHT à modifier la quantité de calcium sur les parois cellulaires. Ainsi dans ce dernier cas, le CHT exerce son potentiel antibactérien en interférant sur la stabilité des peptidoglycanes et en modifiant l'équilibre osmotique de la paroi membranaire (Goy et al., 2009). D'autres mécanismes d'action justifiant l'activité antibactérienne du CHT ont été décrits dans la littérature tels que par exemple son implication dans la stabilité énergétique de la membrane où il interfère avec la chaîne de transport d'électrons et les processus de réduction de l'oxygène (Raafat et al., 2008) ou encore sa capacité à chélater les ions métalliques (Zn²⁺, Cu²⁺, Mg²⁺, Cd²⁺ et d'autres cations bivalents) ; le CHT provoque ainsi des dommages au niveau de l'intégrité de la membrane bactérienne (Guibal, 2004).

Après avoir reproduit l'expérience du *kill time* pour conforter les résultats à 24 h, il pourra être pertinent d'étudier également le potentiel d'activité de l'hydrogel à 72 h afin de vérifier si celui-ci garde une légère activité à 72 h après la libération du juncusol.

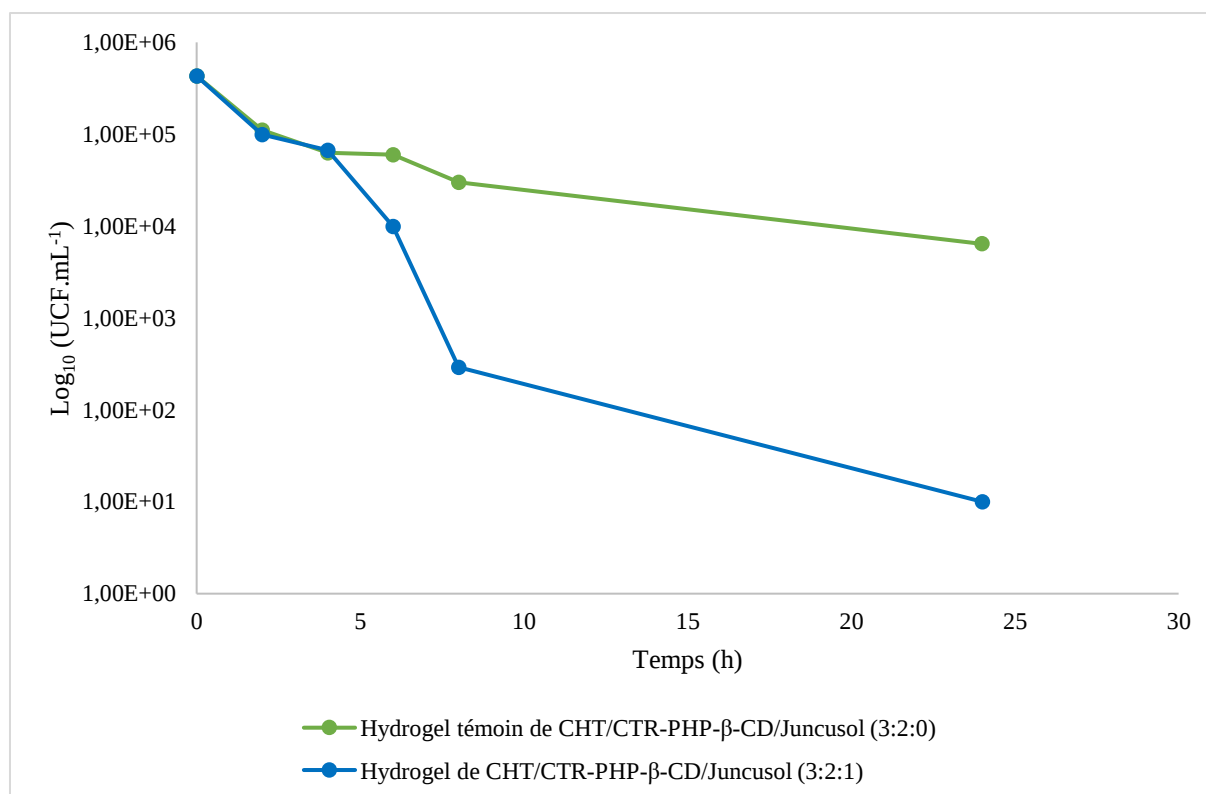


Figure 45. Courbe de croissance (n = 1) de l'isolat clinique *S. aureus* T28.1 en présence de l'hydrogel de CHT/Poly-CTR-HP-β-CD/Juncusol ou de l'hydrogel témoin sans juncusol

3.5. Conclusions et perspectives

De cette étude préliminaire, nous pouvons ainsi retenir plusieurs résultats d'intérêt qui resteront à conforter :

- (1) Le polymère de cyclodextrine de type Poly-CTR-HP-β-CD a été sélectionné pour la formation de l'hydrogel.
- (2) La granulation humide améliore le profil de libération du juncusol.
- (3) La formulation 3:2:1 (CHT/Poly-CTR-β-CD/Juncusol) est retenue pour la suite des expérimentations.
- (4) Même si seulement 50% du juncusol est libéré de l'hydrogel, nous avons obtenu une bonne activité antibactérienne.

Des expériences complémentaires restent à envisager afin d'approfondir nos connaissances sur le potentiel antibactérien de cette formulation sélectionnée :

- (1) La mesure de la force d'injection permettra de vérifier que l'hydrogel est bien utilisable en clinique.

- (2) La limite de solubilité du juncusol à ne pas dépasser dans le milieu sera à déterminer afin de vérifier le respect de la condition *perfect sink* qui permet de minimiser l'effet de ralentissement qu'aurait une saturation du milieu sur la dissolution et la libération de la substance active.
- (3) Le profil de libération du juncusol pourra être amélioré afin de parvenir à une libération complète ou en tout cas optimisée du juncusol.
- (4) La cinétique de libération du juncusol sera modélisée.
- (5) Une étude rhéologique de l'hydrogel (sans et avec juncusol) permettra de vérifier ses propriétés viscoélastiques (caractères *shear-thinning* et *self-healing*).

4. Étude préliminaire de la biodisponibilité des composés phénanthréniques issus des espèces de *Juncus*

Les composés phénanthréniques présents dans les espèces de *Juncus* ont été largement décrits dans la littérature pour leurs activités biologiques (antivirale, antibactérienne, anti-inflammatoire...) (Bús et al., 2018b ; Elshamy et al., 2012 ; Qi et al., 2020 ; Sahuc et al., 2019). Toutefois, très peu d'études portent sur la biodisponibilité et la pharmacocinétique de ces composés. Compte tenu de l'importance de ces données dans le cas d'une potentielle application clinique avec une administration par voie orale, nous avons collaboré avec l'équipe du Dr Benoît Cudennec et Pr Rozenn Ravallec (UMRt BioEcoAgro 1158, Université de Lille) pour étudier ces aspects.

4.1. Étude de la digestion gastro-intestinale statique *in vitro* de l'extrait brut méthanolique des rhizomes de *J. inflexus* localité 3 (JI3 EBMR)

L'administration orale des molécules actives est souvent favorisée de par le confort et la praticité qu'elle offre aux patients. Toutefois, il est parfois difficile de concevoir et de mettre sur le marché des formulations efficaces qui soient capables d'assurer une absorption intestinale suffisante et reproductible de la molécule bioactive. En effet, après administration d'une forme galénique par la voie orale, les molécules bioactives subissent de nombreux phénomènes depuis leur passage de la lumière intestinale jusqu'à leur apparition dans la circulation sanguine. Ainsi le PA peut subir des transformations structurelles et fonctionnelles qui peuvent interférer sur sa biodisponibilité. À cet effet, nous avons décidé dans un premier temps d'étudier la digestibilité des composés phénanthréniques présents dans l'extrait brut méthanolique des rhizomes de *J. inflexus* localité 3. Pour ce faire, nous avons réalisé une expérience de digestion gastro-intestinale statique *in vitro* ($n = 1$) en suivant le protocole harmonisé INFOGEST (Brodkorb et al., 2019) et nous avons cherché à comparer les profils chromatographiques du JI3 EBMR au début et à la fin de l'expérience.

Les deux échantillons obtenus en fin d'expérience, partie « digérée » et partie « non digérée » (**Chapitre 3, partie 6.1**), ont été analysés par UHPLC-UV-MS. Leurs chromatogrammes obtenus à $\lambda = 214$ nm ont été comparés à celui de JI3 EBMR avant digestion et à celui du témoin de la digestion blanche (**Figure 46**). L'analyse des données acquises montre une ressemblance des profils chromatographiques de JI3 EBMR avant et après digestion,

notamment au niveau de la zone enrichie en composés phénanthréniques (encadré bleu en trait plein sur la **Figure 46**). Nous pouvons déduire de nos résultats que les composés phénanthréniques ne semblent pas être affectés, ou très peu, par les peptidases digestives (α -amylase, pepsine, lipase et pancréatine). Ils restent ainsi intacts après la digestion. Par ailleurs, nous remarquons la présence de pics plus polaires, très rapprochés et mal séparés, (encadré rouge en pointillé sur la **Figure 46**) pour la partie « digérée », retrouvés également sur le chromatogramme de la digestion blanche. Ces derniers pourraient correspondre aux peptides dérivant de l'autolyse des enzymes protéolytiques comme par exemple ceux de la pepsine.

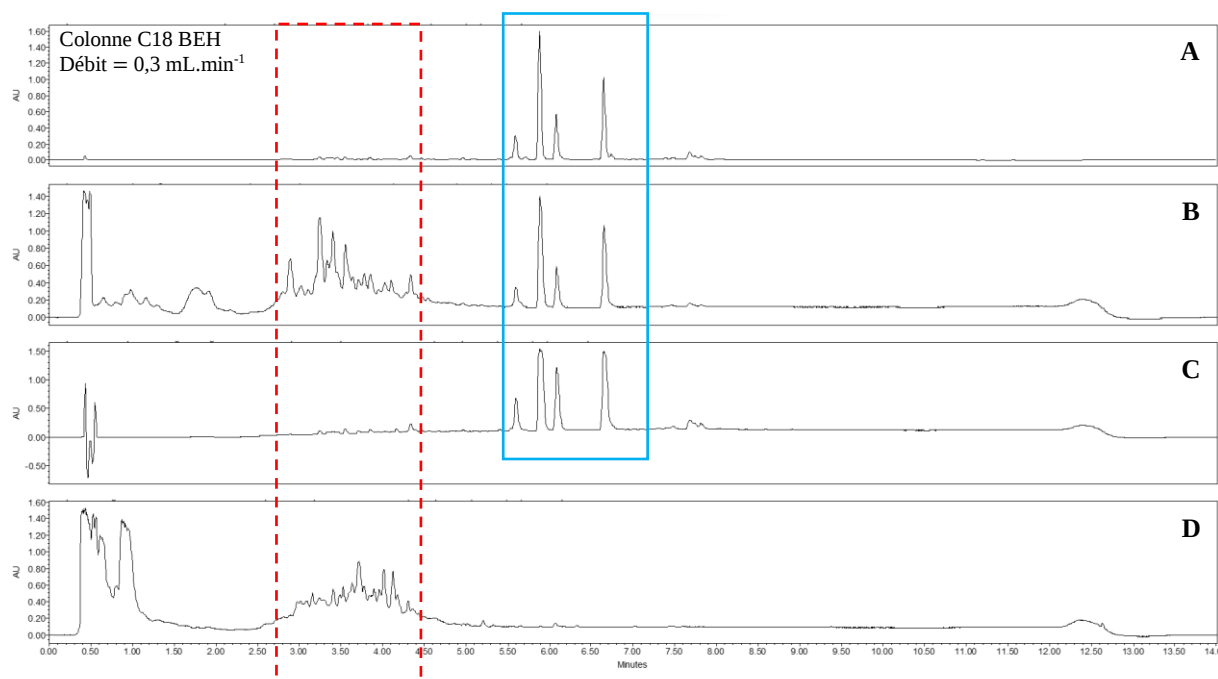


Figure 46. Chromatogrammes des échantillons de l'extrait brut méthanolique des rhizomes de *J. inflexus* localité 3 obtenus à $\lambda = 214$ nm par UHPLC-UV-MS (A) avant digestion gastro-intestinale statique *in vitro* ; et après digestion : (B) partie « digérée », (C) partie « non digérée » et (D) digestion blanche. L'encadré bleu en trait plein montre la présence des dérivés phénanthréniques du *Juncus*. L'encadré rouge en pointillé visualise probablement les peptides dérivant de l'autolyse des enzymes protéolytiques.

4.2. Évaluation de la cytotoxicité des composés phénanthréniques : test de cytotoxicité CCK-8

Avant de pouvoir poursuivre l'étude de biodisponibilité des composés phénanthréniques (effusol, juncusol, 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol et juncuénine B), l'étude de la cytotoxicité de ces derniers a dû être réalisée sur le modèle cellulaire ciblé, imitant au plus proche les caractéristiques de perméabilité de la barrière intestinale humaine, la

monocouche de coculture cellulaire Caco2/HT29-MTX (Béduneau et al., 2014). Les cellules Caco-2 sont des cellules dérivant d'une tumeur du côlon humain. Elles sont particulièrement utilisées *in vitro* pour modéliser la barrière intestinale car elles ont la particularité de pouvoir se développer en monocouches pour former une barrière similaire à la muqueuse intestinale. Elles expriment ainsi de nombreux transporteurs et enzymes impliqués dans l'absorption et le métabolisme de diverses substances comme les nutriments et les molécules actives. Les cellules HT29-MTX sont également des cellules dérivant d'une tumeur du côlon humain avec la particularité de sécréter du mucus, simulant ainsi un environnement intestinal plus réaliste avec une couche de mucus protectrice. Elles sont souvent utilisées pour étudier l'interaction entre les substances actives et la muqueuse intestinale, en tenant compte du mucus pouvant influencer l'absorption et la perméabilité (Gagnon et al., 2013).

La gamme de concentrations testées pour les différents composés a été choisie sur la base de recherches bibliographiques disponibles sur d'autres modèles cellulaires (**Tableau 6, Chapitre 1, partie 3.6.2**) : 100 ; 75 ; 50 ; 25 ; 12,5 ; 6,25 ; 3,125 et 1,563 μM . Au sein de cette expérience, 2 temps de contact ont été testés : 2 h et 24 h.

D'après la **Figure 47A**, nous remarquons qu'après 2 h d'incubation, l'effet cytotoxique sur la coculture cellulaire Caco2/HT29-MTX à la concentration la plus élevée testée (100 μM) est léger pour la juncuénine B (90,4% de viabilité cellulaire) mais plus important pour l'effusol > le 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol > le juncusol (65%, 69,5% et 73,7% de viabilité cellulaire respectivement). Par contre, nous constatons qu'en augmentant le temps de contact des composés phénanthréniques avec la coculture cellulaire Caco2/HT29-MTX (24 h) (**Figure 47B**), l'effet cytotoxique des composés phénanthréniques augmente notamment pour le 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol ; le pourcentage de viabilité cellulaire passe de 90,4% à 37,10%.

Remarque : pour l'effusol, une probable erreur expérimentale (problème de dilution ou inversion des concentrations lors du dépôt dans les plaques) pourrait expliquer l'incohérence de résultats obtenue pour les concentrations 75 μM et 100 μM .

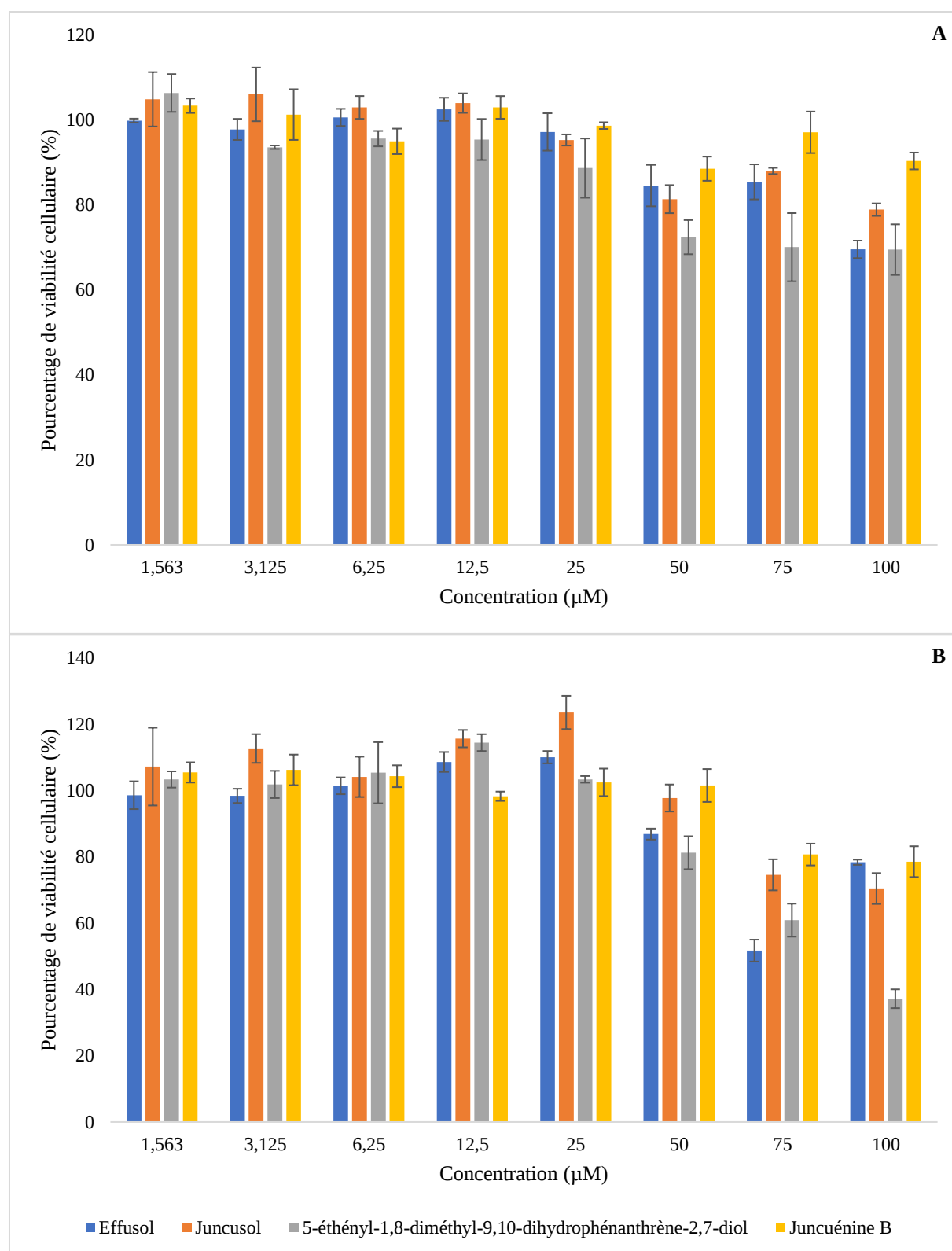


Figure 47. Histogrammes montrant les pourcentages de viabilité cellulaire de la monocouche Caco2/HT29-MTX (calculés par rapport au témoin DMSO) obtenu par le test CCK-8 après (A) 2 h et (B) 24 h de contact avec les différents composés phénanthréniques. Ces données sont le résultat d'un triplicata d'une seule expérience.

Aucune valeur de concentration cytotoxique à 50% (CC_{50}) n'a pu être déterminée aux temps de contact 2 h et 24 h car les composés phénanthréniques n'ont pas présenté, ou peu, d'effet cytotoxique sur la monocouche Caco2/HT29-MTX avec la gamme de concentrations testées. En revanche, nous avons pu estimer la CC_{50} du 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol à 24 h grâce au logiciel GraphPad Prism version 10.0.2 (**Figure 48**). Elle a été estimée à près de 82 μ M. Il serait toutefois intéressant de renouveler l'expérience avec une gamme de concentrations plus large ($> 100 \mu$ M) afin de pouvoir affiner la valeur du R^2 pour ce dernier et déterminer les valeurs de CC_{50} des autres composés phénanthréniques.

De nombreuses valeurs de CC_{50} ont été antérieurement reportées dans la littérature pour les composés phénanthréniques. Cependant, en fonction du test utilisé et de la lignée cellulaire employée, ces valeurs varient de façon importante. Par exemple, l'équipe de Gainche et al., (2020) a pu déterminer une concentration médiane inhibitrice (CI_{50}) de 10 μ M pour le juncusol sur une lignée cellulaire monocyttaire humaine THP-1, après 24 h de temps de contact, grâce au test de résazurine. Par opposition, l'étude d'Ishiuchi et al., (2015) a montré qu'à la même concentration et pour une incubation de 24 h, le juncusol ne provoque pas d'effet cytotoxique sur les cellules HT22 ($93\% \pm 3,6$ de viabilité cellulaire). Il devient par contre toxique à 100 μ M ($25,4\% \pm 6,2$). Ces valeurs ont été déterminées par cette équipe par le test MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Dans la même étude, l'effusol et la juncuénine B se sont également montrés cytotoxiques à 100 μ M avec $9,9\% \pm 3,6$ et $13,6\% \pm 2,4$ de viabilité cellulaire respectivement.

L'équipe d'Ishiuchi et ses collaborateurs (2015) a mis en exergue des relations structure/activité et a montré que certains éléments structuraux pouvaient participer à l'effet cytotoxique des composés phénanthréniques, notamment l'absence de saturation de la liaison en C-9/C-10, la présence d'un groupement vinyle et la position des groupements méthyle, vinyle et hydroxyle sur les carbones C-5, C-6, C-7 et C-8.

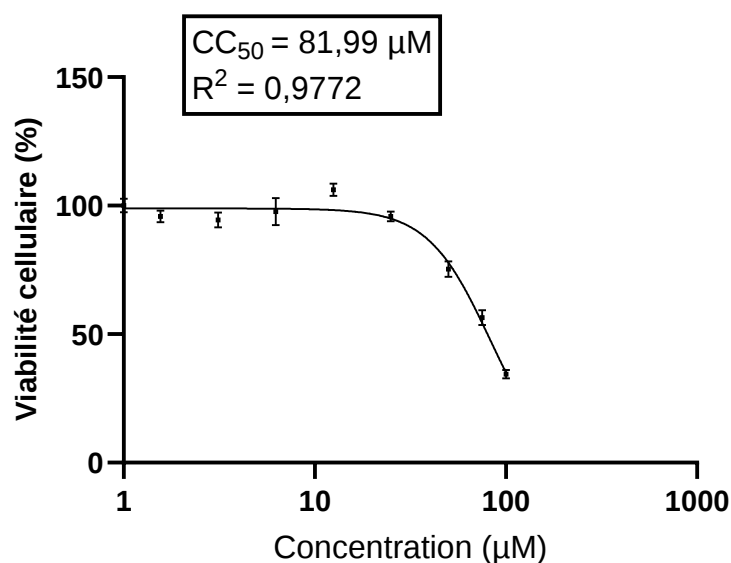


Figure 48. Détermination de la cytotoxicité du 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol sur la monocouche de coculture cellulaire CaCo2/HT29-MTX après 24 h de contact. Les données sont exprimées en moyenne de pourcentage de viabilité cellulaire $\pm$ SEM par rapport au témoin négatif contenant du milieu DMEM pour lequel une valeur de 100 a été attribuée. L'expérience a été réalisée en triplicata. La CC₅₀ a été obtenue grâce au logiciel GraphPad Prism version 10.0.2.

4.3. Passage de barrière intestinale *in vitro* à travers le modèle cellulaire Caco2/HT29-MTX

La connaissance des modalités mécanistiques de l'absorption trans-épithéliale d'une molécule bioactive est indispensable au développement de formes pharmaceutiques permettant une absorption maximale. De cette manière, la biodisponibilité du PA est fortement influencée par la vitesse et l'intensité de son déplacement à travers la paroi intestinale. Elle dépend des caractéristiques physico-chimiques de la molécule étudiée, des propriétés galéniques de la formulation qui la contient et de la perméabilité effective de la barrière intestinale. La détermination expérimentale de la perméabilité intestinale des PAs et des mécanismes mis en jeu représente un objectif majeur dès les premières phases de développement pharmaceutique. C'est à cet effet que nous avons décidé de mener des expériences de passage de barrière intestinale *in vitro* sur le modèle cellulaire Caco2/HT29-MTX avec le juncusol, composé phénanthrénique bioactif purifié à partir des rhizomes de *J. inflexus* localité 3. Les expériences que nous avons réalisées visent à acquérir des informations sur la capacité du juncusol à traverser la barrière intestinale *in vitro* et sur la manière dont il est absorbé.

Pour ce faire, le juncusol a été mis dans le compartiment apical à une concentration non cytotoxique, préalablement déterminée, égale à 12,5 μM . Différents temps de contact avec la monocouche de coculture cellulaire Caco2/HT29-MTX ont été réalisés : $T_{15 \text{ min}}$, $T_{30 \text{ min}}$, $T_{1 \text{ h}}$ et $T_{2 \text{ h}}$. À la fin de l'expérience, le contenu des différents compartiments apicaux et basolatéraux a été prélevé et évaporé à sec, puis repris dans du MeOH et analysé par UHPLC-UV-MS.

Au début et à la fin des expériences de passage de barrière intestinale *in vitro*, l'intégrité de la monocouche de coculture cellulaire Caco2/HT29-MTX a été vérifiée par la mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER). Cette dernière permet de mesurer, d'une manière fiable et non invasive, le transfert ionique à travers la monocouche pour s'assurer de l'intégrité de la dynamique des jonctions serrées (*tight junctions* : TJs) et vérifier l'absence de fuites. Les données de la littérature montrent une relation de proportionnalité entre la valeur du TEER et les jonctions serrées de la monocouche de cellules Caco-2 (Duizer et al., 1999 ; Srinivasan et al., 2015). En effet, il se peut que le composé testé, le juncusol dans notre étude, devienne toxique pour le modèle cellulaire Caco2/HT29-MTX après un long contact. La valeur du TEER pour le modèle CaCo2/HT29-MTX doit être supérieure à 500 $\Omega.\text{cm}^2$. Les valeurs obtenues pour chacune de nos expériences ont toujours été supérieures à cette valeur justifiant ainsi une bonne intégrité de la monocouche (Hoffmann et al., 2021). A la fin de l'expérience, cette intégrité a été également vérifiée par une seconde technique utilisant un témoin négatif, le *Lucifer yellow* (LY). Nous avons pu déterminer une bonne relation linéaire entre la gamme de concentrations de LY utilisée et les valeurs de l'absorbance (DO) : $R^2 = 0,9996$ (**Figure 49**). Grâce aux paramètres de l'équation ainsi déterminée, nous avons pu calculer le coefficient de perméabilité apparente (P_{app}) pour chaque insert contenant la monocouche de coculture cellulaire Caco2/HT29-MTX suivant l'équation :

$$P_{app} (\text{cm.s}^{-1}) = \frac{\Delta Q}{\Delta t} \times \frac{V_b}{A \times C_0}$$

Les valeurs de P_{app} déterminées (données non montrées) répondaient aux exigences expérimentales car elles ont été bien inférieures à $10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$. Ce résultat a confirmé que la monocouche de coculture cellulaire Caco2/HT29-MTX reste bien intègre après 2 h de contact avec le juncusol.

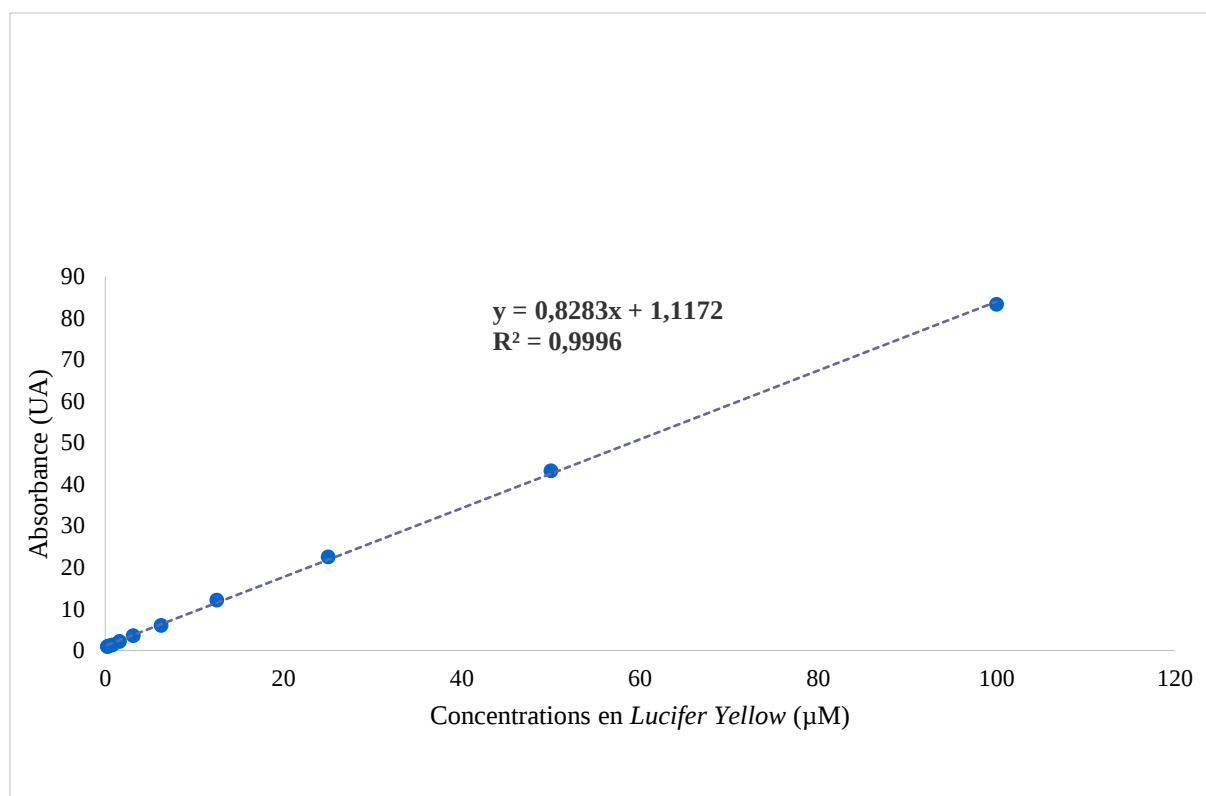


Figure 49. Gamme étalon du *Lucifer Yellow* (LY)

À l'issue de l'expérience de passage de barrière intestinale *in vitro* du juncusol, l'analyse par UHPLC-UV-MS des différents échantillons récupérés à partir des compartiments apicaux est représentée par les chromatogrammes **B** → **E**, obtenus à $\lambda = 280$ nm, de la **Figure 50**. En augmentant le temps de contact avec la monocouche de coculture cellulaire Caco2/HT29-MTX, on observe une diminution de l'intensité du pic de juncusol ($t_r = 5,59$ min) : 0,035 UA ($T_{15\text{ min}}$) → 0,01 UA ($T_{2\text{ h}}$). Ceci pourrait suggérer que le juncusol arrive à traverser la barrière intestinale *in vitro*. Nous remarquons, par ailleurs, l'apparition de 2 pics plus polaires d'intensité moins importante à $t_r = 4,556$ min et $t_r = 4,788$ min (encadré de la **Figure 50**) dont l'intensité semble également augmenter au cours du temps. L'analyse des différents chromatogrammes obtenus à $\lambda = 280$ nm des échantillons récupérés à partir des compartiments basolatéraux (**Figure 51**) montre qu'on retrouve le juncusol du côté basolatéral de la monocouche. Ce dernier semble s'accumuler petit à petit au cours du temps. L'intensité de son pic semble plus importante à $T_{2\text{ h}}$. En outre, nous retrouvons à nouveau les 2 pics précédemment détectés dans les compartiments apicaux. L'analyse de leurs spectres UV montre que leur maximum d'absorbance correspond à $\lambda = 280$ nm tout comme les composés phénanthréniques isolés de *J. inflexus* durant notre étude. À ce niveau, nous avons émis 2 hypothèses quant à l'origine de ces composés :

Hypothèse 1 : ils correspondent à des métabolites du juncusol, ce qui signifie qu'une partie du juncusol a été peut-être transformée au contact de la monocouche de coculture cellulaire Caco2/HT29-MTX.

Hypothèse 2 : ils correspondent à des composés relargués par la monocouche de coculture cellulaire Caco2/HT29-MTX en présence du juncusol.

Lors de notre première expérience, il n'a pas été possible de déterminer avec exactitude la masse molaire de ces composés plus polaires formés en raison de leur mauvaise réponse en masse. Nous avons ainsi décidé de reproduire les expériences.

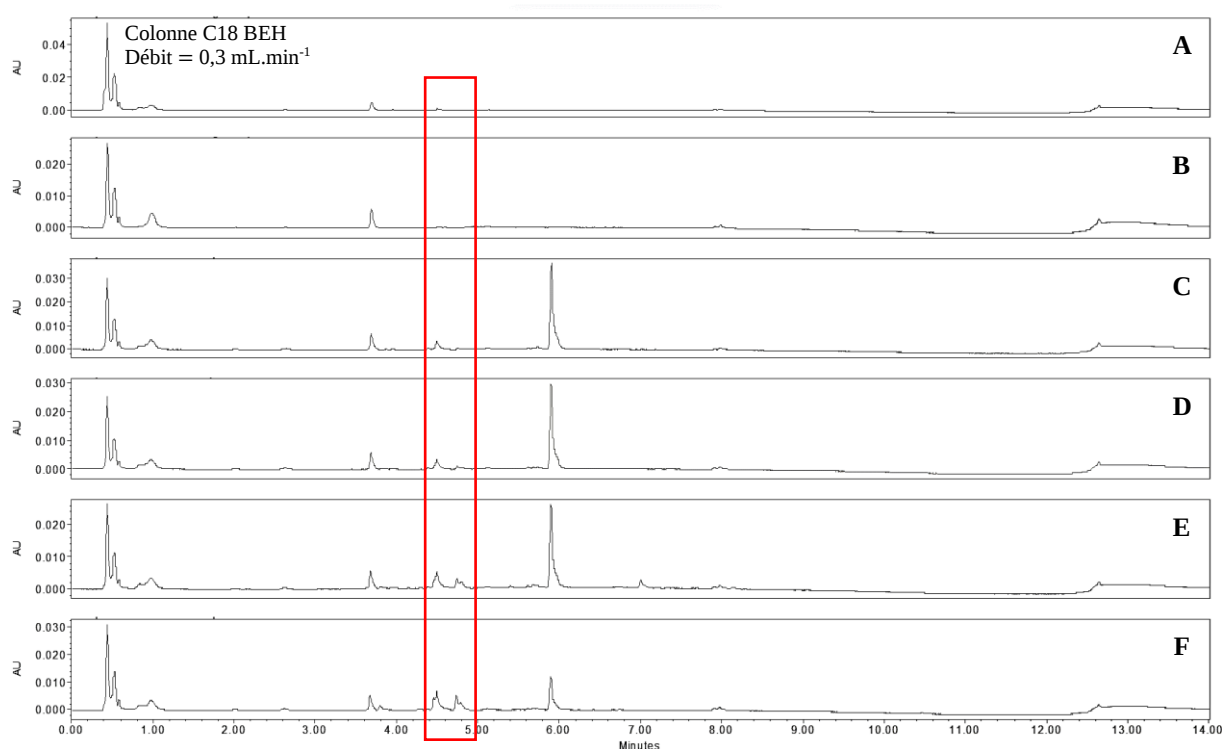


Figure 50. Chromatogrammes obtenus par UHPLC-UV à $\lambda = 280$ nm des différents échantillons récupérés à partir des compartiments apicaux : témoin DMSO (A) traitement T_{15 min}, (B) traitement T_{2 h} ; et juncusol (C) traitement T_{15 min}, (D) traitement T_{30 min}, (E) traitement T_{1 h}, (F) traitement T_{2 h}

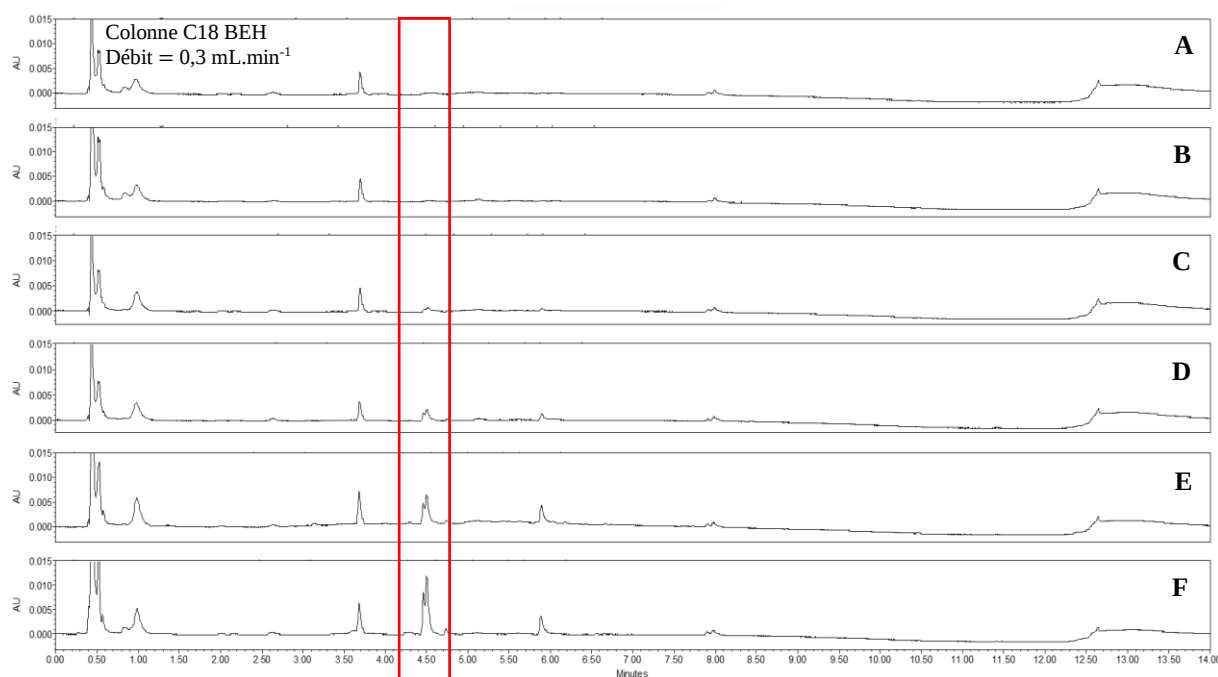


Figure 51. Chromatogrammes obtenus par UHPLC-UV à $\lambda = 280$ nm (mise à l'échelle Y = 0,015) des différents échantillons récupérés à partir des compartiments basolatéraux : témoin DMSO (A) traitement T₁₅ min, (B) traitement T₂ h; et juncusol (C) traitement T₁₅ min, (D) traitement T₃₀ min, (E) traitement T₁ h, (F) traitement T₂ h

L'expérience de passage de barrière intestinale *in vitro* du juncusol a été reproduite plusieurs fois (n = 5 répétitions) et s'est montrée très reproductible. Afin de pouvoir approfondir nos résultats, nous avons envisagé de quantifier la quantité du juncusol (en pourcentage) qui se trouve dans les compartiments apicaux et basolatéraux à la fin de l'expérience (à T₂ h) et ceci en l'exprimant par rapport à la quantité du juncusol déposée au départ et qui représente les 100% (**Figure 52**). Ce travail a été réalisé en moyennant la méthode de quantification développée pour le juncusol par UHPLC-UV-MS (**Chapitre 3 partie 2.2.3**).

Nos résultats montrent que la quantité du juncusol déposée du côté apical décroît progressivement au cours du temps. Au bout de 2 h, seulement 39% du juncusol se trouve dans le compartiment apical (**Figure 52A**). Par ailleurs, nous avons estimé que seulement 10% du juncusol se retrouve dans le compartiment basolatéral (à T₂ h) (**Figure 52B**). Cette observation souligne que le juncusol traverse « en partie » la monocouche de coculture cellulaire Caco2/HT29-MTX et que ce dernier a probablement été transformé ou métabolisé par les cellules constituant la monocouche, notamment par les Caco2 qui expriment les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des cellules de l'intestin grêle. Il est également possible qu'une partie du juncusol ait été dégradée au cours de ce passage de barrière intestinale. Une

autre hypothèse serait que le juncusol soit resté piégé en partie dans les cellules de la barrière intestinale *in vitro*. Pour vérifier cela, une lyse cellulaire pourrait être envisagée, et le contenu de ces dernières pourrait être analysé par UHPLC-UV-MS.

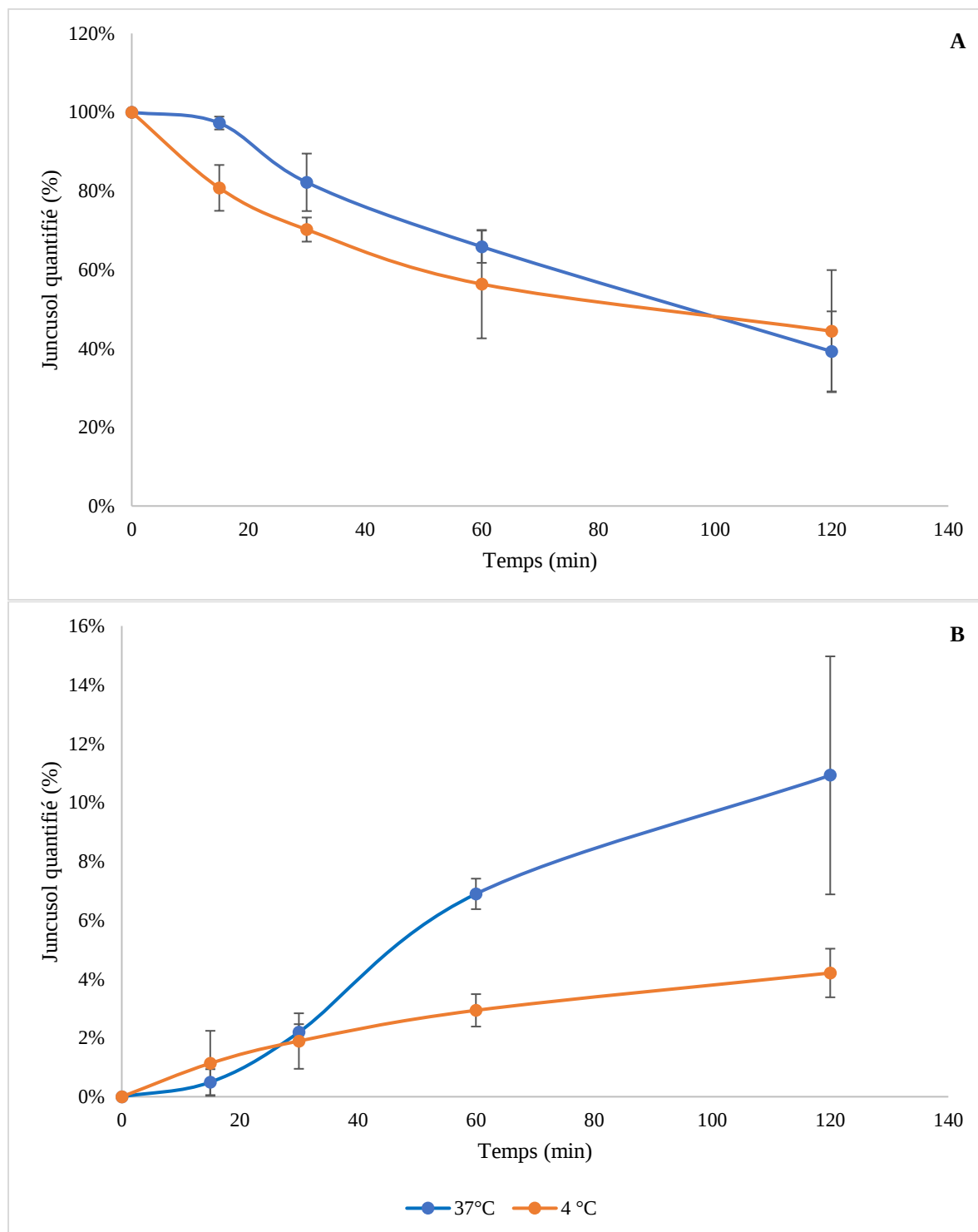


Figure 52. Cinétique de passage de barrière intestinale *in vitro* du juncusol sur le modèle de monocouche de coculture cellulaire Caco2/HT29-MTX (**A**) dans le compartiment apical (**B**) dans le compartiment basolatéral. Les

données à 37 °C sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM de 5 expériences réalisées en duplicata. Les données à 4 °C sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM de 2 expériences réalisées en duplicata.

De la même manière, nous avons reproduit l'expérience à 4 °C pour vérifier si la température pouvait avoir un effet sur la cinétique du transport du juncusol à travers la monocouche de coculture cellulaire Caco2/HT29-MTX (**Figure 52A**). D'après les courbes obtenues pour les compartiments apicaux, nous constatons que la cinétique de passage du juncusol à 4°C est légèrement plus importante que celle à 37°C : 80,7% **versus** 97,2% à $T_{15 \text{ min}}$, 70,2% **versus** 82,2% à $T_{30 \text{ min}}$ et 56,3 **versus** 65,8% à $T_{1 \text{ h}}$. Dans les compartiments basolatéraux, la cinétique du juncusol à 37 °C semble être plus importante que celle à 4 °C. Nous avons déterminé une quantité de juncusol plus que 2 fois plus importante à 37 °C à la fin de l'expérience : 10,9% **versus** 4,2% à $T_{2 \text{ h}}$. Ainsi, l'accumulation du juncusol en plus faible quantité dans le compartiment basolatéral à 4 °C, pourrait être expliqué par le fait que la température affecte la fluidité de la monocouche cellulaire. À partir de l'ensemble de nos résultats, nous pouvons à priori conclure que la température aurait un effet sur l'accumulation du juncusol dans le compartiment basolatéral.

À ce stade de l'étude, nous avons souhaité approfondir la compréhension de la potentielle transformation du juncusol au contact de la monocouche de coculture cellulaire Caco2/HT29-MTX et expliquer l'apparition de 2 composés plus polaires dans les compartiments apicaux et basolatéraux absorbant à la même longueur du juncusol. Afin de pouvoir améliorer le signal en spectrométrie de masse, nous avons combiné les échantillons des différentes expériences après avoir réalisé la quantification du juncusol de façon séparée dans les compartiments apicaux et basolatéraux. Les échantillons ont été évaporés et repris avec un volume minimal en MeOH puis injectés en UHPLC-UV-MS (analyseur de type quadripôle). L'analyse des spectres de masse en mode négatif de ces 2 composés éluant à $t_r = 4,556 \text{ min}$ et $t_r = 4,788 \text{ min}$ ont donné respectivement les ions moléculaires $m/z [M - H]^-$ de 441 et 345. Nous avons ensuite confirmé ces résultats à l'aide d'un spectromètre de masse haute résolution plus sensible (LC-ESI-Q-TOF). Ce travail a été réalisé en collaboration avec nos collègues de la plateforme analytique de l'UMRt BioEcoAgro 1158 (Université de Lille, site FST). La **Figure 53** montre que les résultats obtenus par HRMS et MS/MS sont en accord avec ceux obtenus précédemment par LC-MS. En effet, les résultats donnent des ions moléculaires $m/z [M - H]^-$ de 441,1615 et de 345,0798 en mode négatif pour les deux composés éluant à $t_r = 4,556 \text{ min}$ et $t_r = 4,788 \text{ min}$. Les spectres de masse issus de la fragmentation montrent par ailleurs des pertes respectives de 176 Da et de 80 Da. Les données de la littérature suggèrent que ces pertes pourraient

correspondre à des réactions de glucuronidation ($m/z +176$) et de sulfatation ($m/z +80$) (Teng et al., 2012). La monocouche cellulaire Caco2/HT29-MTX abrite en effet de multiples transporteurs, récepteurs et enzymes métaboliques tels que le cytochrome P450 1A (CYP1A), les sulfotransférases (SULT), les UDP-glucuronosyltransférases (UGT) et les glutathion S-transférases (GST) (Sun et al., 2008). Ainsi, nous pouvons conclure que les composés à $t_r = 4,556$ min et $t_r = 4,788$ min correspondent respectivement à des métabolites du juncusol : le premier étant le juncusol glucuronidé et le second le juncusol sulfaté. La position de la glucuronidation et de la sulfatation reste à déterminer, mais nécessiterait une purification des composés afin de les analyser par RMN.

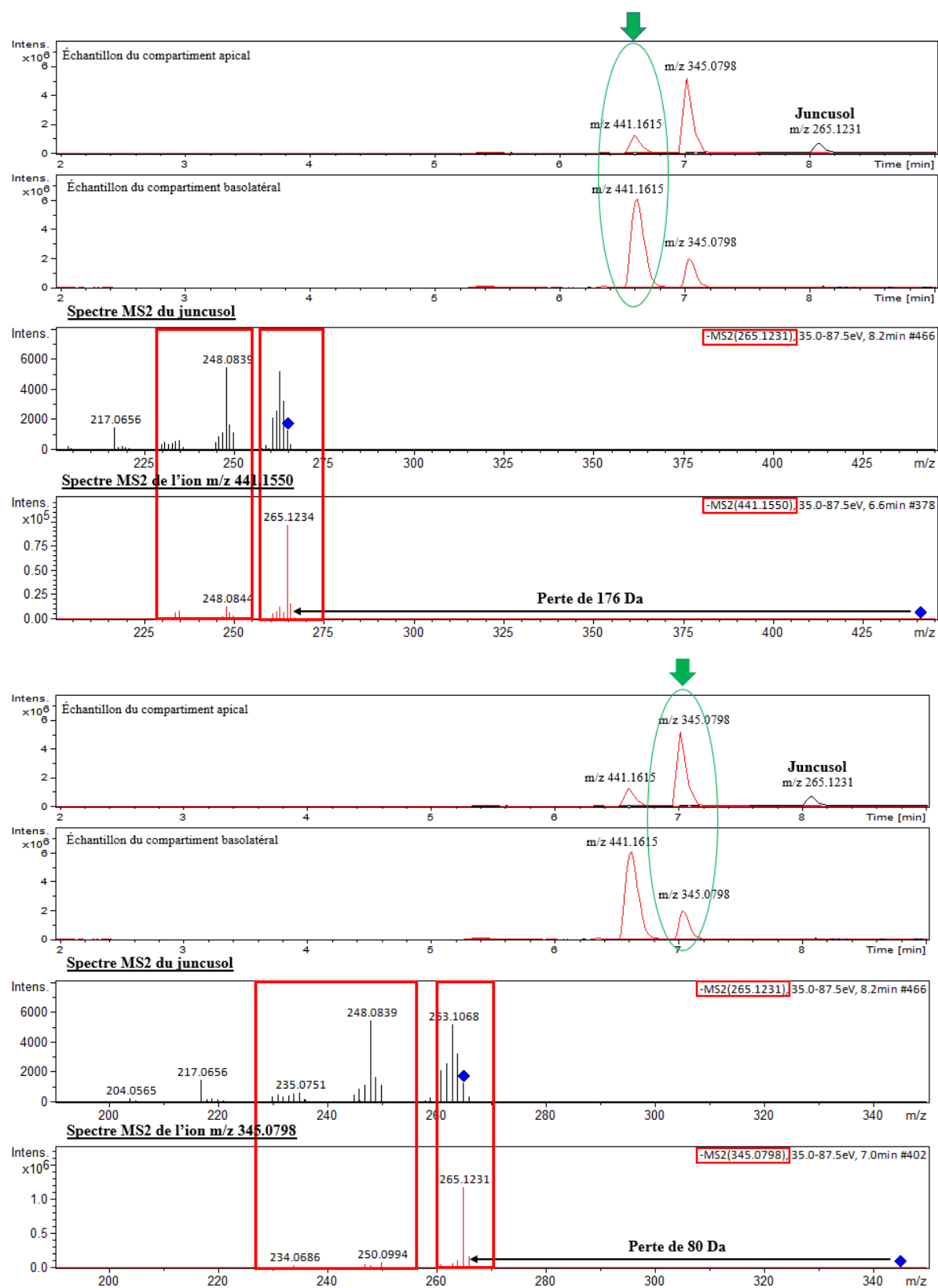


Figure 53. Données obtenues en HRMS et profil de fragmentation MS/MS en mode négatif obtenus par LC-HRMS (ESI-Q-TOF) des composés à (A) $t_r = 4,556$ min et (B) $t_r = 4,788$ min, identifiés dans les échantillons des compartiments apicaux et basolatéraux après passage de barrière intestinale (Caco2/HT29-MTX) *in vitro* du juncusol

D'une manière générale, la réaction de glucuronidation se produit plus souvent que la réaction de sulfatation au niveau des cellules Caco2. L'étude de Barrington et son équipe a démontré qu'au niveau des cellules Caco2, le kaempferol, flavonol très étudié, excrété sous sa forme glucuronidée prédomine de 2 fois le kaempférol sous sa forme sulfatée (Barrington et al., 2009). De plus l'étude de Courtois et al., (2017) a mentionné que la principale voie métabolique du dimère de resvératrol, l' ϵ -viniférine, chez les rats est celle de la glucuronidation : plus de 73% d' ϵ -viniférine ont été biotransformés via cette réaction.

Perspectives pour la partie passage de barrière intestinale *in vitro* :

Dans le cadre de notre étude, il serait intéressant de quantifier les composés identifiés : le juncusol sous sa forme glucuronidée et sulfatée dans les compartiments apicaux et basolatéraux pour avoir une idée de la forme prédominante au niveau du modèle cellulaire Caco2/HT29-MTX. Cette quantification demanderait dans un premier temps de les purifier, ce qui semble difficile en raison des faibles quantités disponibles, ou de les produire de façon synthétique. Une autre façon de produire du juncusol glucuronidé serait de passer par des modèles de microsomes de foie. La comparaison des profils chromatographiques obtenus par le biais de cette dernière expérience avec ceux des expériences de passage de barrière intestinal *in vitro* déjà réalisées pourrait permettre de conforter nos résultats.

Des expériences supplémentaires pourraient être également envisagées dans le but d'approfondir nos connaissances sur le mode de transport du juncusol à travers la barrière intestinale : transport actif ou passif. Afin d'étudier un éventuel transport actif, ces essais nécessiteraient l'emploi d'inhibiteurs de transporteurs d'efflux tels que par exemple le vérapamil (inhibiteur de la glycoprotéine P) ou l'indométacine (inhibiteur de la protéine MRP 2, *multidrug resistance-associated protein 2*).

CHAPITRE 3 :

MATÉRIELS & MÉTHODES

Chapitre 3 : Matériels & Méthodes

1. Matériel végétal

Les 3 espèces de *Juncus*, utilisées dans le cadre de notre étude, ont été collectées dans 2 régions françaises, la région Bretagne et la région Nouvelle-Aquitaine, au cours du mois de Juillet 2018 (Tableau 18 et Figures 54 et 55). L'identification botanique des différentes espèces a été réalisée par le Dr Gabriel Lefèvre et le Pr Céline Rivière et un herbier de chaque plante a été déposé au laboratoire de pharmacognosie de l'Université de Lille, France.

Lieux de collecte des *Juncus* utilisés dans l'étude

Espèce	Abréviation	Parties de plante étudiées	Lieu de collecte	Coordonnées
<i>Juncus acutus</i> L.	JA1	Rhizomes, tiges, inflorescences	Bretagne, localité 1	48° 48' 44" Nord, 3° 05' 27" Ouest
<i>Juncus acutus</i> L.	JA2	Rhizomes, tiges	Bretagne, localité 2	48° 49' 50" Nord, 3° 04' 30" Ouest
<i>Juncus inflexus</i> L.	JI3	Rhizomes, tiges	Nouvelle-Aquitaine, localité 3	44° 59' 44" Nord, 0° 26' 41" Ouest
<i>Juncus maritimus</i> Lam.	JM1	Rhizomes, tiges	Bretagne, localité 1	48° 48' 44" Nord, 3° 05' 27" Ouest

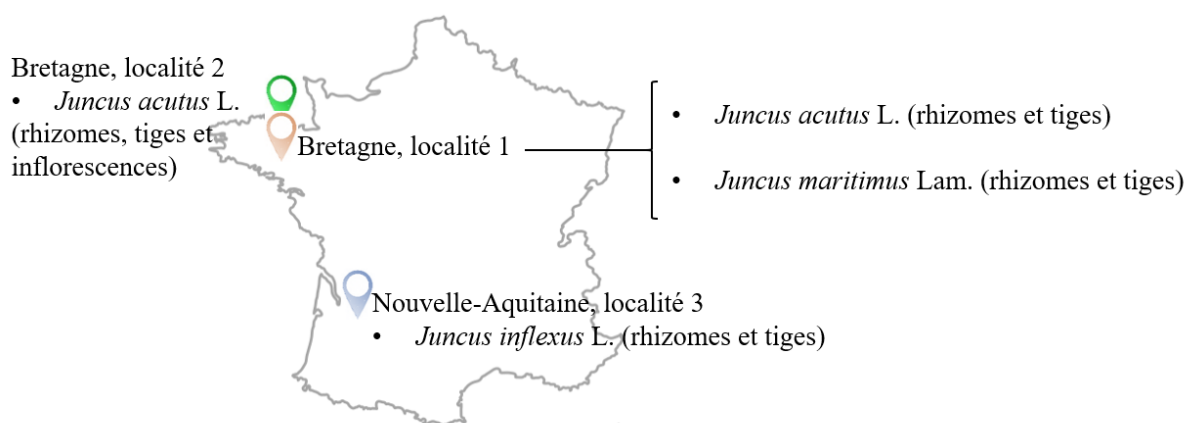
Figure 54. Carte de localisation des différents échantillons de *Juncus* collectés



Figure 55. Photos des plantes collectées (A) *Juncus maritimus* Lam. (Bretagne, localité 1), (B) *Juncus acutus* L. (Bretagne, localité 2), (C) *Juncus inflexus* L. (Nouvelle-Aquitaine, Localité 3) (Photos prises par le Dr Gabriel Lefèvre et le Pr Céline Rivière durant Juillet 2018)

Les échantillons de *Juncus* collectés ont été séchés à 30 °C à l’abri de la lumière. Les différentes parties végétales ont ensuite été séparées, réduites en poudre fine et conservées dans des bocaux en verre à l’abri de la lumière et de l’humidité.

2. Étude phytochimique des espèces de *Juncus* étudiées

2.1. Préparation des extraits et des sous-extraits de *Juncus*

Afin d’obtenir des extraits bruts, des extractions solide-liquide (S/L) de chacune des poudres de plante ont été réalisées dans le méthanol (MeOH) et ceci en effectuant des sessions de macérations successives de 12 h sous agitation, à température ambiante et à l’abri de la lumière.

À la fin de chaque macération, le filtrat récupéré a été évaporé à 30 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif (Heidolph™, Schwabach, Allemagne). Chaque extrait méthanolique concentré a été ensuite dilué dans de l'eau distillée, congelé à – 20 °C pendant une nuit puis lyophilisé sous vide à – 50 °C à l'aide d'un lyophilisateur à ballons (Telstar Cryodos™, Espagne) pour une meilleure conservation et une meilleure manipulation.

Le rendement de chaque extrait brut méthanolique (%) a été calculé sur la base du poids sec de poudre de départ : 20 g pour les rhizomes et les tiges et 10 g pour les inflorescences (**Tableau 19**).

Tableau 18. Rendements des extractions solide/liquide (S/L) réalisées pour les différentes espèces de *Juncus* (%)

Espèce	Partie de plante	Abréviation	Rendement (%)
<i>J. acutus</i> (JA1)	Rhizomes	JA1 EBMR	9,6
	Tiges	JA1 EBMT	12,3
	Inflorescences ouvertes	JA1 EBMIO	2,7
	Inflorescences fermées	JA1 EBMIF	8,5
<i>J. acutus</i> (JA2)	Rhizomes	JA2 EBMR	6,95
	Tiges	JA2 EBMT	11,85
<i>J. maritimus</i> (JM1)	Rhizomes	JM1 EBMR	11,25
	Tiges	JM1 EBMT	11,6
<i>J. inflexus</i> (JI3)	Rhizomes	JI3 EBMR	5,2
	Tiges	JI3 EBMT	11,5

Les sous-extraits (**Tableau 20**) ont été obtenus en réalisant une extraction liquide-liquide (L/L) à partir des extraits bruts méthanoliques étudiés, JA2 EBMT et JI3 EBMR, en utilisant des solvants de polarité croissante : dichlorométhane (CH₂Cl₂) < acétate d'éthyle (AcOEt) < eau (H₂O). Pour une extraction maximale, la phase aqueuse a été épuisée par 4 × 300 mL de CH₂Cl₂ (Carlo Erba Reagents®, Val de Reuil, France) puis d'AcOEt (Carlo Erba Reagents®, Val de Reuil, France). Avant évaporation des phases organiques à l'aide d'un évaporateur rotatif, du sulfate de sodium anhydre (Na₂SO₄) a été ajouté pour éliminer les traces résiduelles d'eau. Les extraits aqueux (Aq) ont été congelés pendant une nuit, puis lyophilisés.

Tableau 19. Rendements des extractions liquide/liquide (L/L) réalisées sur les extraits bruts méthanoliques de tiges de *J. acutus* localité 2 et rhizomes de *J. inflexus* localité 3 (%)

Partie de plante	Quantité (en g)	Rendement (%)		
		Sous-extrait CH ₂ Cl ₂	Sous-extrait AcOEt	Sous-extrait Aq
JA2 EBMT	5,15	7,13	4,54	72,58
JI3 EBMR	9,7	34,44	7,73	42,22

2.2. Analyse par UHPLC-UV-MS des extraits, sous-extraits, fractions et composés purifiés à partir des espèces de *Juncus* étudiées

La caractérisation des extraits bruts, sous-extraits, fractions obtenues par CPC ainsi que les composés phénanthréniques purifiés à partir des espèces de *Juncus* étudiées a été réalisée grâce à une UHPLC-UV-MS du laboratoire de pharmacognosie (Faculté de pharmacie de Lille) avec une méthode d'analyse mise au point pour les *Juncus*. Il s'agit d'un équipement de la gamme Acquity UPLC H-Class Waters® System (Guyancourt, France). Il est muni de deux pompes indépendantes, d'un détecteur à barrettes de diodes (DAD), d'un spectromètre de masse de type quadripôle avec comme mode d'ionisation l'électrospray (ESI). L'ensemble est piloté par le contrôleur de console local Acquity UPLC. La phase stationnaire utilisée est une colonne inverse C18 BEH (2,1 × 50 mm, 1,7 µm) de chez Waters®. La phase mobile est composée de 2 solvants : (A) H₂O ultrapure (Millipore Integral 5 Milli-Q, Merck™, Allemagne) + 0,1% d'acide formique (Carlo Erba Reagents®, Val de Reuil, France) et (B) acétonitrile (ACN) (Carlo Erba Reagents®, Val de Reuil, France) + 0,1% d'acide formique.

Le débit et la température de la colonne ont été respectivement fixés à 0,3 mL.min⁻¹ et 30 ± 5 °C. La gamme de longueurs d'onde a été fixée entre 200 et 790 nm avec une résolution de 1,2 nm. L'ionisation a été effectuée en mode négatif et positif avec une gamme de masse comprise entre 100 et 950 Da. La tension du capillaire a été fixée à 0,9 kV. La tension du cône « *cone voltage* » a été fixée à 15 V. Le volume d'injection a été fixé à 2 µL pour la plupart des analyses, mais dans certains cas, un volume de 4 µL a été utilisé pour avoir une meilleure intensité. Le gradient d'élution développé est le suivant : 10 % → 100 % (B) (0 – 9 min), 100 % (B) (9 – 11 min) et 10 % (B) (1 – 14 min). Les échantillons ont été préparés à 1 mg.mL⁻¹ dans du MeOH de qualité analytique et filtrés sur une membrane PTFE de 0,4 µm avant d'être injectés. Seuls les standards commerciaux incluant la lutéoline (Sarsyntex) et la lutéoline-7-O-glucoside (Sarget), ainsi que les dérivés phénanthréniques de *Juncus* purifiés en interne au sein du laboratoire de pharmacognosie (le juncusol par exemple) ont été préparés à 0,1 mg.mL⁻¹. Les

données acquises ont été comparées à celles disponibles dans la littérature ainsi qu'aux bases de données en ligne telle que PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

La pureté de chaque dérivé phénanthrénique purifié a été déterminée à partir des chromatogrammes PDA, plus précisément au MaxPlot en appliquant l'algorithme d'intégration « Apex Track » du logiciel Empower® version 3.

2.3. Quantification du juncusol par UHPLC-UV

Pour nos travaux concernant l'inclusion du juncusol dans un hydrogel (**Chapitre 2, partie 3**) et son étude de biodisponibilité (**Chapitre 2, partie 4**), il a été nécessaire de développer une méthode de quantification en suivant les recommandations de l'IHC (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* ; <https://www.ich.org/>) et de l'Agence Européenne du Médicament (EMA, 2011). La validation des paramètres de sélectivité, linéarité (R^2), exactitude, limites de détection et quantification (LOD et LOQ), précision (intra-jour et inter-jour) est en effet indispensable pour attester l'exactitude des données de quantification acquises. Cette quantification du juncusol a été réalisée sur la base de la détection UV par UHPLC-UV-MS en suivant différentes étapes (**Figure 56**). La méthode de séparation développée dans **la partie 2.2 du Chapitre 3** a été employée car elle est bien adaptée pour la séparation et l'identification du juncusol. Parallèlement, une méthode de traitement des données acquises a été créée. La quantification du juncusol a été réalisée à $\lambda = 280$ nm, correspondant à l'un des maximums d'absorbance du produit. La gamme étalon établie s'est appuyée sur 8 concentrations [50 ; 100 ; 250 ; 500 ; 1000 ; 2500 ; 5000 et 10000 ng.mL⁻¹] en juncusol permettant d'obtenir une courbe de calibration à partir des aires sous courbes mesurées. La fonction de réponse linéaire obtenue a pour équation : $y = 18,7 x + 896$ avec $R^2 = 0,999804$ (**Figure 57**). Cette courbe de calibration enregistrée a permis ensuite de quantifier le juncusol dans les différents échantillons. Comme le coefficient de détermination R^2 est proche de 1, la linéarité de la méthode a été bien validée. La LOD ($= 3 \times \frac{\sigma_b}{a}$) a été évaluée à 50 ng.mL⁻¹ et la LOQ ($= 10 \times \frac{\sigma_b}{a}$) a été fixée à 100 ng.mL⁻¹ (avec σ_b est l'écart-type de l'ordonnée à l'origine et a est le coefficient directeur de la droite de calibration). En outre, l'injection d'un blanc MeOH avant et après la série d'analyses a permis de confirmer l'absence d'interférences aux temps de rétention du juncusol dosé, confirmant ainsi la sélectivité de la méthode. Toutefois, la précision de la méthode analytique n'a pas encore été validée et sera envisagée pour compléter ce travail.

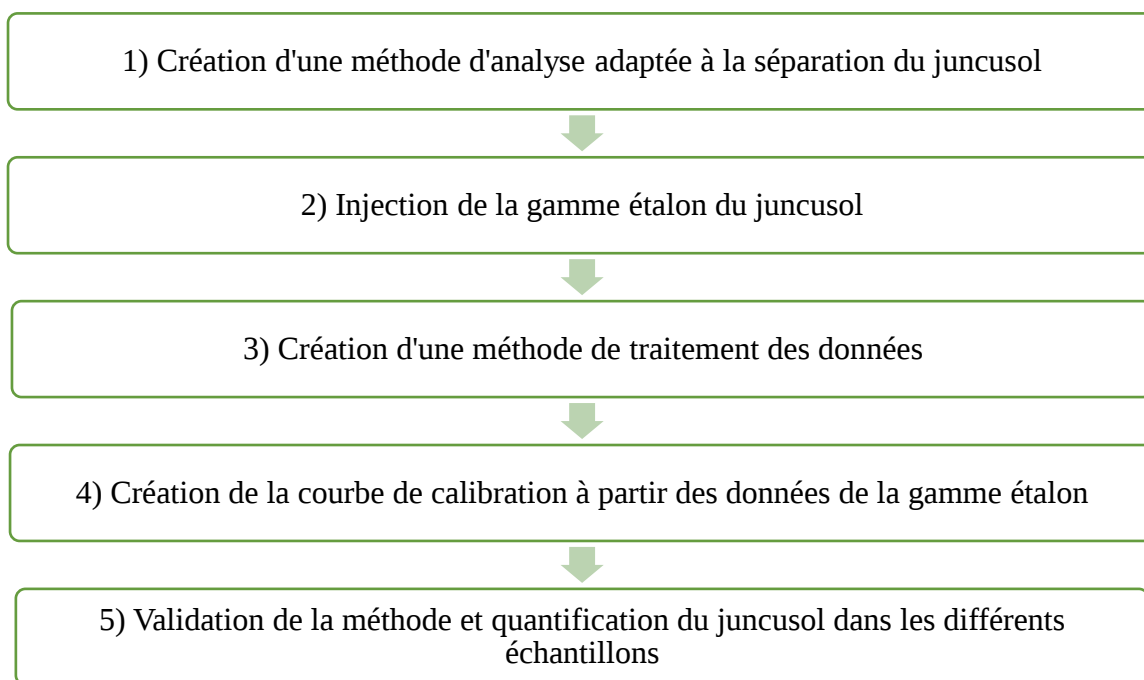


Figure 56. Workflow des étapes à suivre pour établir la quantification du juncosol sur le logiciel Empower® 3 version 3

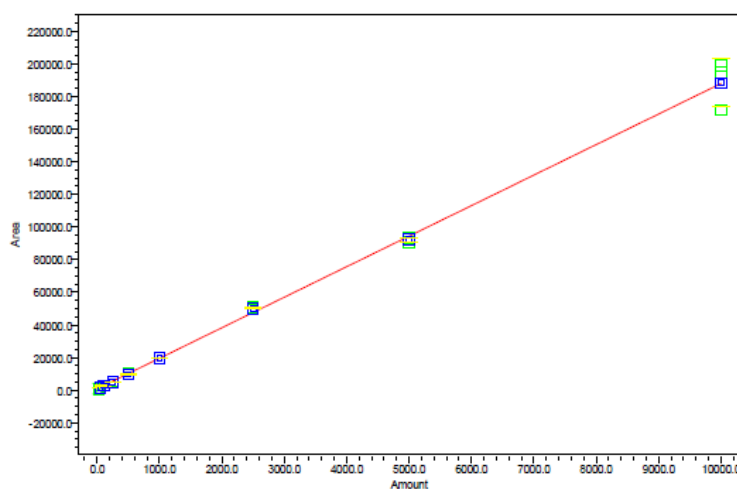


Figure 57. Courbe de calibration du juncosol créée en utilisant le logiciel Empower® 3 version 3

2.4. Fractionnement de *J. acutus* et de *Juncus inflexus* par différentes techniques chromatographiques préparatives

2.4.1 Fractionnement des sous-extraits actifs des tiges de *Juncus acutus*

2.4.1.1. Fractionnement du sous-extrait AcOEt des tiges de *J. acutus* par HPLC semi-préparative

Le fractionnement de l'extrait AcOEt par HPLC semi-préparative a été réalisé durant le début de la pandémie de la COVID-19. Ce travail a été effectué entre mars et mai 2020 par ma directrice de thèse, le Pr Céline Rivière, qui a eu l'autorisation de manipuler en raison des travaux du laboratoire en lien avec la recherche d'antiviraux contre le coronavirus SARS-CoV-2. Ces travaux faisaient aussi lien avec le stage de Master 2 de Rawen Ben Malek.

L'HPLC semi-préparative est composée de 2 pompes binaires haute pression Shimadzu® LC-20AP, d'un détecteur à barrette de diodes Shimadzu® SPD-M20A et d'un module de communication CBM-20A. Cet équipement est piloté grâce au logiciel LabSolutions™ version 1.25. Le fractionnement a été réalisé en phase inverse sur une colonne semi-préparative Vision HT C18 HL (5 µm, 250 × 10 mm) (Grace, numéro de lot 60/036), après avoir mis au point la méthode sur une colonne analytique correspondante. La phase mobile était composée d'H₂O ultrapure (Millipore Integral 5 Milli-Q, Merck™, Trosly-Breuil, France) + 0,1 % d'acide formique (Merck™, Darmstadt, Allemagne) (solvant A) et d'ACN (Carlo Erba Reagents®, Val de Reuil, France) (solvant B). Le gradient mis au point pour ce fractionnement commence à 5% de solvant B pour atteindre 100 % en 60 min. Le débit a été fixé à 3 mL.min⁻¹. Au total, 8 injections de 12,5 mg du sous-extrait AcOEt des tiges de *Juncus acutus* préalablement solubilisés dans 500 µL de MeOH ont été réalisées. Le suivi du fractionnement a été principalement effectué à 2 longueurs d'onde : 254 nm et 280 nm. 12 fractions (F1 → F12) ont été obtenues à la fin de l'expérience. Elles ont été, par la suite, analysées par UHPLC-UV-MS. La fraction F7 renferme à 92% la lutéoline, composé antiviral contre HCoV-229-E. Son identification a été réalisée par UHPLC-UV-MS par comparaison avec un standard commercial (Sarsyntex).

2.4.1.2. Fractionnement du sous-extrait aqueux (Aq) des tiges de *Juncus acutus* par chromatographie de partage centrifuge (CPC)

Avant de procéder au fractionnement du sous-extrait Aq des tiges de *J. acutus* par CPC, plusieurs systèmes ternaires de solvants, testés avec différentes proportions, ont été évalués : AcOEt/ACN/H₂O, AcOEt/Isopropanol/H₂O et AcOEt/Butanol/H₂O. Ce travail a été également réalisé dans le cadre des travaux de Rawen Ben Malek. Le système ternaire composé d'AcOEt/Isopropanol/H₂O (7:3:10 ; v/v/v) a été retenu car il a permis d'obtenir un coefficient de partage (K_d) proche de 1 pour la lutéoline-7-*O*-glucoside ($K_d = 1,022$). La lutéoline, molécule bioactive contre le HCoV-229E est par contre restée dans la phase supérieure du système de solvant sélectionné.

La CPC (Armen instruments®, Saint-Avé, France) disponible au laboratoire de pharmacognosie (Faculté de Pharmacie de Lille) est composée d'un rotor d'une capacité de 250 mL. Les autres modules (pompes, détecteur, communication, logiciel) sont les mêmes que pour l'HPLC semi-préparative. Un collecteur automatique (Gilson® FC 204, Villiers-le-Bel, France) a été également ajouté pour recueillir les fractions à la fréquence souhaitée durant les programmes l'élution et d'extrusion. Dans un premier temps, 1 g du sous-extrait Aq des tiges de *J. acutus* a été dissous dans 8 mL du mélange de phases organique et aqueuse (1:1, v/v) puis filtré à travers un filtre à seringue en polytétrafluoroéthylène (PTFE) (0,45 µm). Ensuite, le rotor de la CPC a été rempli par la phase stationnaire (phase inférieure) à un débit égal à 30 mL.min⁻¹ (500 rpm) en mode ascendant. L'équilibration a été atteinte en introduisant la phase mobile (phase supérieure) à 1600 rpm à un débit de 30 mL.min⁻¹. Une fois le volume mort atteint (100 mL), l'échantillon a été introduit dans la colonne à travers une vanne d'injection équipée d'une boucle d'échantillonnage de 10 mL. L'élution a été réalisée à 8 mL.min⁻¹ et suivie à $\lambda = 254$ nm. Les fractions ont été collectées toutes les 1 min. Puis, l'extrusion permettant de récupérer les composés ayant une forte affinité pour la phase stationnaire a été réalisée à 30 mL.min⁻¹ pendant 30 minutes. À la fin de l'expérience, un rinçage a été effectué avec un mélange d'EtOH/H₂O (1:1) à 500 rpm. Les 105 fractions récupérées ont été caractérisées par HPLC-UV-MS puis regroupées en 12 fractions selon les similarités de leurs profils phytochimiques. Les 12 fractions ont été ensuite concentrées à l'aide d'un concentrateur sous vide centrifuge réfrigéré (Genevac™, Fisher-Scientific, Illkirch, France). Les fractions F3 et F4 analysées par UHPLC-UV-MS renferment de la lutéoline, tandis que les fractions F5 et F6 contiennent la lutéoline-7-*O*-glucoside identifiée sur base de la comparaison avec un standard commercial (Sarget).

2.4.2. Fractionnement du sous-extrait CH₂Cl₂ des rhizomes de *Juncus inflexus* et purification des composés phénanthréniques d'intérêt

2.4.2.1. Fractionnement du sous-extrait CH₂Cl₂ des rhizomes de *Juncus inflexus* par CPC

Les essais d'optimisation du fractionnement du sous-extrait CH₂Cl₂ des rhizomes de *J. inflexus* par CPC ont été effectués dans le cadre des travaux de stage de M2 de Rawen Ben Malek. Différents systèmes quaternaires de type Arizona, composés de *n*-heptane/AcOEt/MeOH/H₂O ont été testés. Finalement, le système Arizona P constitué du mélange *n*-heptane/AcOEt/MeOH/H₂O (6:5:6:5, v/v) a été retenu car il a permis d'obtenir un coefficient de partage (K_d) proche de 1 pour le juncusol (K_d = 1,068) et également une bonne répartition des composés du sous-extrait CH₂Cl₂ des rhizomes de *J. inflexus* entre les 2 phases du système. Le même équipement de CPC utilisé pour le fractionnement du sous-extrait Aq des tiges de *J. acutus* a été employé ici.

1 g du sous-extrait CH₂Cl₂ des rhizomes de *J. inflexus* a été dissous dans 8 mL du mélange de phases organique et aqueuse (1:1, v/v) puis filtré à travers un filtre en papier à l'aide d'un entonnoir Büchner. L'expérience de CPC a été réalisée en mode ascendant où la phase liquide la plus légère constituant la phase mobile percole à travers la phase liquide lourde (phase stationnaire). Le rotor de 250 mL a été initialement rempli avec environ 400 mL de phase stationnaire à un débit de 30 mL.min⁻¹ à 500 rpm. Ensuite, la phase mobile a été pompée à travers la phase précédemment introduite dans le rotor à 1600 rpm et à un débit de 8 mL.min⁻¹ jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint (volume mort de 110 mL). L'échantillon a été introduit dans la colonne à travers une vanne d'injection équipée d'une boucle d'échantillonnage de 10 mL. Des fractions de 8 mL ont été collectées toutes les minutes pendant 60 min. Le profil d'élution a été suivi à 2 longueurs d'onde : 254 nm et 280 nm, grâce au logiciel LabSolutions™ version 1.25. Afin de pouvoir récupérer les molécules ayant une forte affinité pour la phase stationnaire, une extrusion a été réalisée à 30 mL.min⁻¹ en maintenant la même vitesse de rotation du rotor (1600 rpm) pendant 15 min. À la fin de l'expérience, 91 fractions ont été obtenues. Ces dernières ont été caractérisées par UHPLC-UV-MS puis regroupées en 8 fractions (**Tableau 21**) en fonction des similitudes de leurs profils phytochimiques. Elles ont été finalement concentrées à l'aide d'un concentrateur sous vide centrifuge réfrigéré (Genevac™, Fisher-Scientific, Illkirch, France) et conservées au congélateur à - 20 °C jusqu'aux prochaines analyses et expériences.

Tableau 20. Récapitulatif des quantités (mg) et des rendements (%) des différentes fractions obtenues par CPC à partir du sous-extrait CH₂Cl₂ des rhizomes de *J. inflexus* localité 3 (JI3)

Fraction	Quantité (mg)	Rendement (%)
F'1	2,55	0,32
F'2	106,9	13,47
F'3	37,21	4,69
F'4	397,47	50,09
F'5	12,81	1,61
F'6	11,08	1,40
F'7	17,77	2,24
F'8	47,4	6,01

2.4.2.2. Purification par HPLC préparative des composés phénanthréniques à partir de la fraction la plus active F'4 (obtenue par CPC à partir du sous-extrait CH₂Cl₂ des rhizomes de *J. inflexus*)

Le passage à l'échelle préparative s'est fait une fois que des résultats de séparation satisfaisants ont été obtenus pour la fraction F'4, enrichie en dérivés phénanthréniques, par HPLC analytique.

L'HPLC préparative du laboratoire de pharmacognosie se compose des mêmes modules que l'HPLC semi-préparative. La purification a été effectuée en utilisant la colonne Interchim C18 HQ (5 µm, 250 × 21.1 mm) (numéro de lot : 250/212) comme phase stationnaire. La phase mobile a été composée d'H₂O ultrapure (Millipore Integral 5 Milli-Q, Merck™, Trosly-Breuil, France) + 0,1 % d'acide formique (Merck™, Darmstadt, Allemagne) (solvant A) et d'ACN (Carlo Erba Reagents®, Val de Reuil, France) (solvant B). Le programme d'élution employé est le suivant : 40 % → 70 % (B) (0 – 50 min), 70 % → 100 % (B) (50 – 55 min) et 100% (B) (55 – 60 min). Le débit a été fixé à 15 mL.min⁻¹, et la fraction F'4 a été solubilisée dans du MeOH de qualité analytique et filtrée sur une membrane PTFE 0,45 µm. L'élution a été suivie à λ = 254 nm et à λ = 280 nm. Les composés phénanthréniques collectés à l'issue de la première injection ont été analysés par UHPLC-UV-MS pour s'assurer de l'absence de mélange de composés. Un total de 6 injections (volume de chaque injection = 500 µL) a été réalisé permettant l'injection de 370 mg de la fraction F'4. Les 8 composés obtenus (5 majoritaires et 3 minoritaires, **Tableau 22**) ont été enfin évaporés à l'aide d'un concentrateur sous vide centrifuge réfrigéré (Genevac™, Fisher-Scientific, Illkirch, France) puis stockés à – 20 °C pour les prochaines analyses et expériences.

Afin de recueillir des informations précises sur leur temps de rétention, leur longueur d'onde, leur maximum d'absorbance, leurs ions moléculaires ainsi que leurs pourcentages de pureté,

chaque composé phénanthrénique a été analysé par UHPLC-UV-MS selon la méthode décrite dans la **partie 2.2**.

Tableau 21. Récapitulatif des quantités (mg) et des rendements (%) des différents composés obtenus par HPLC préparative à partir de la fraction active F'4 obtenue par CPC à partir du sous-extrait CH₂Cl₂ des rhizomes de *J. inflexus* localité 3 (JI3)

	Composé	Quantité (mg)	Rendement (%)
Composés majoritaires	Composé 6	12,9	3,49
	Composé 8	138,66	37,48
	Composé 9	44,65	12,07
	Composé 11	78	21,08
	Composé 12	3,66	0,99
Composés minoritaires	Composé 5	0,6	0,16
	Composé 7	0,34	0,09
	Composé 10	0,77	0,21

2.4.2.3. Purification par HPLC préparative d'autres composés phénanthréniques à partir de la fraction F'2 (obtenue par CPC à partir du sous-extrait CH₂Cl₂ des rhizomes de *J. inflexus*)

2.4.2.3.1. Optimisation de la méthode de séparation des composés phénanthréniques par HPLC analytique

La séparation des composés phénanthréniques se trouvant dans la fraction F'2, issue de la CPC réalisée sur le sous-extrait CH₂Cl₂ des rhizomes de *J. inflexus*, a d'abord été optimisée sur l'HPLC analytique du laboratoire de Pharmacognosie. La chaîne HPLC est composée de 2 pompes Shimadzu® LC-10 AS, d'un détecteur à barrettes de diode Shimadzu® SPD-M20A, d'un module de communication SIL-10AP et d'un module de contrôle SCL-10 Avp. L'ensemble a été piloté grâce au logiciel LabSolutions™ version 1.25. Des essais d'optimisation ont été réalisés sur différentes phases stationnaires : la colonne Interchim® Uptisphere strategy C18-HQ (5 µm, 250 × 4,6 mm) précédée d'une pré-colonne C18, la colonne Grace™ Vision HT C18 HL (5 µm, 250 × 4,6 mm, 120 Å) précédée d'une pré-colonne C18 HL (5 µm, 7,5 × 4,6 mm) et la colonne Phenomenex® Kinetex F5 (pentafluorophenyl)

(5 μ m, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 100 Å). La meilleure séparation a été obtenue en employant la colonne Phenomenex® Kinetex F5 avec une phase mobile composé d'H₂O ultrapure (Millipore Integral 5 Milli-Q, Merck™, Allemagne) + 0,1% d'acide formique (Carlo ERBA Reagents®, Italie) (solvant A) et d'ACN (solvant B). Le gradient d'élution retenu est le suivant : 40 % $\rightarrow$ 60 % (B) (0 – 60 min) et 100 % (B) (65 – 75 min) avec un débit fixé à 1 mL.min⁻¹. Pour ces expériences d'optimisation, la fraction F'2 a été solubilisée dans du MeOH de qualité analytique à une concentration finale égale à 10 mg.mL⁻¹ puis filtrée sur membrane PTFE 0,45 μ m. Le volume d'injection a été fixé à 20 μ L/injection, et le suivi de l'élution a été réalisé à deux longueurs d'onde λ = 254 nm et λ = 280 nm.

2.4.2.3.2. Purification des composés issus de la fraction F'2 par HPLC préparative

La méthode de séparation mise au point par HPLC analytique pour la purification des composés phénanthréniques se trouvant dans la fraction F'2, a été transposée à l'échelle préparative en utilisant la colonne Kinetex F5 préparative (5 μ m, 250 $\times$ 21,2 mm, 100 Å). La chaîne HPLC préparative employée a été la même que celle utilisée pour la purification des composés à partir de F'4. Le débit a été fixé à 17 mL.min⁻¹ car il a permis d'obtenir une pression proche de celle obtenue en HPLC analytique.

Les 4 composés phénanthréniques collectés à l'issue de la première injection ont été analysés par UHPLC-UV-MS pour s'assurer de l'absence de mélange de composés. Un total de 5 injections (volume de chaque injection = 500 μ L) a été réalisé permettant l'injection de 312 mg de la fraction F'2 (152 mg obtenus à partir des 2 CPC réalisées durant cette thèse + 160 mg provenant de la CPC réalisée durant le stage de M2 de Rawen Ben Malek). Les composés recueillis (**Tableau 23**) ont été évaporés à l'aide d'un concentrateur sous vide centrifuge réfrigéré (Genevac™, Fisher-Scientific, Illkirch, France) puis stockés à – 20 °C pour les prochaines analyses et expériences.

Afin de recueillir des informations précises sur leur temps de rétention, leur longueur d'onde, leur maximum d'absorption, leurs ions moléculaires ainsi que leurs pourcentages de pureté, chaque composé phénanthrénique a été analysé par UHPLC-UV-MS selon la méthode décrite dans la **partie 2.2**.

Tableau 22. Récapitulatif des quantités (mg) et des rendements (%) des différents composés obtenus par HPLC préparative à partir de la fraction F'2 obtenue par CPC à partir du sous-extrait CH₂Cl₂ des rhizomes de *J. inflexus* localité 3 (JI3)

Composé	Quantité (mg)	Rendement (%)
Composé 1	2,5	0,8
Composé 2	6,89	2,21
Composé 3	5,02	1,6
Composé 4	7,4	2,3

2.5. Élucidation structurale des dérivés phénanthréniques isolés à partir des rhizomes de *J. inflexus*

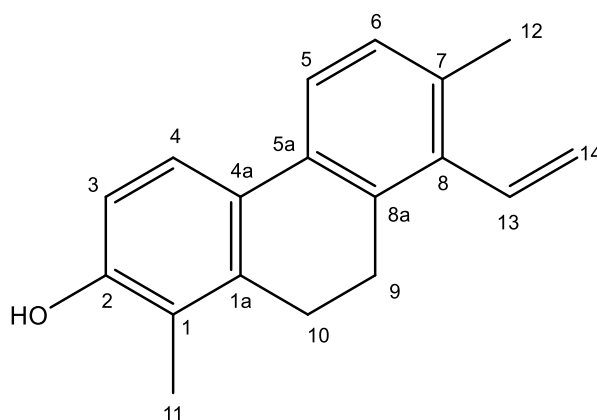
Une fois purifiés, les différents composés phénanthréniques isolés, notamment à partir des rhizomes de *J. inflexus*, ont été soumis à des analyses par spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS). L'analyse et l'acquisition des données ont été effectuées à l'aide d'un spectromètre de masse Thermo Scientific™ Orbitrap Exactive avec pour méthode d'ionisation l'électrospray (ESI). Ces analyses ont été réalisées sur le plateau de spectrométrie de masse de la Faculté de Pharmacie de Lille (ULR 7365 GRITA). L'équipement a été piloté grâce au logiciel Xcalibur (Arlington, VA, USA). Pour les expériences d'HRMS, les échantillons ont été solubilisés dans du MeOH de qualité analytique à une concentration finale de 0,001 mg.mL⁻¹. L'ionisation a été effectuée seulement en mode négatif avec une gamme de masse comprise entre 100 et 950 Da.

Pour l'élucidation structurale, les différents composés ont été analysés par résonance magnétique nucléaire (RMN) à l'aide d'un spectromètre Bruker AVANCE NEO 500 MHz Ultrashield™ du Laboratoire d'Application de Résonance Magnétique Nucléaire (LARMN) de la Faculté de Pharmacie de Lille (Université de Lille). L'analyse, l'acquisition et le traitement des données ont été effectués grâce au logiciel TopSpin version 4.1.4. Pour l'ensemble des expériences, la sonde TXI a été utilisée pour la RMN du proton ¹H et bi-dimensionnelle (CORrelation Spectroscopy : COSY, Heteronuclear Single Quantum Correlation : HSQC ou HSQC-DEPT, et Heteronuclear Multiple-Bond Correlation : HMBC) et la sonde BBO a été utilisée pour l'obtention des spectres en ¹³C. Les échantillons ont été préparés dans du méthanol deutéré (MeOD) (Euriso-Top® (Gif-sur-Yvette, France).

Les composés 1 à 4 issus de la fraction F'2 (**Figure 31**) ont été identifiés par RMN et HRMS, tout comme les composés 6, 8, 9, 11 et 12 issus de la fraction F'4 (**Figure 32**). L'élucidation structurale du composé 1 doit toutefois être confortée par des analyses RMN complémentaires pour vérifier s'il s'agit d'un composé nouveau. Il pourrait s'agir du 8-éthényl-1,7-diméthyl-9,10-dihydrophenanthrène-2-ol. Les autres composés 2, 3, 4, 6, 8, 9, 11 et 12 ont été identifiés comme étant respectivement le 5-éthényl-1,7-diméthyl-9,10-dihydrophenanthrène-2-ol, la juncuénine A, la dehydrojuncuénine A, l'effusol, le juncusol, le 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol, la juncuénine B et la dehydrojuncuénine B. Seuls les composés 5, 7 et 10 n'ont pas pu être identifiés en raison de trop faible rendement. Des analyses en LC-UV-MS leur donnent comme masse molaire probable : 248, 262 et 264 g.mol⁻¹. Leur élucidation structurale par RMN nécessiterait de les purifier en plus grandes quantités. Les données de masse et RMN sont décrites pour chaque composé ci-dessous.

Composé 1 = en cours d'identification

Hypothèse de structure = 8-éthényl-1,7-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2-ol



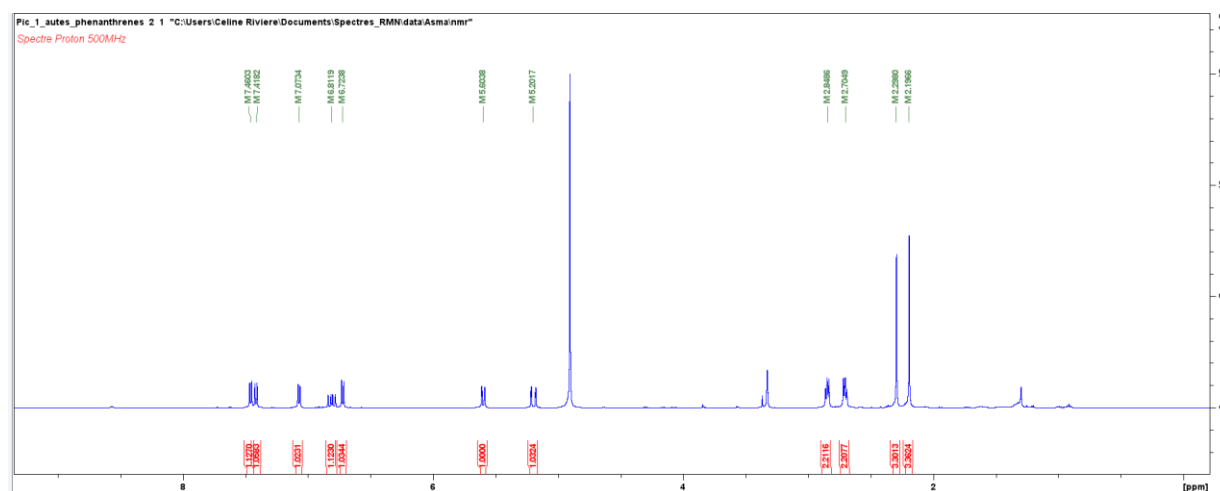
Masse molaire : 250,33 g.mol⁻¹

Formule brute = C₁₈H₁₈O

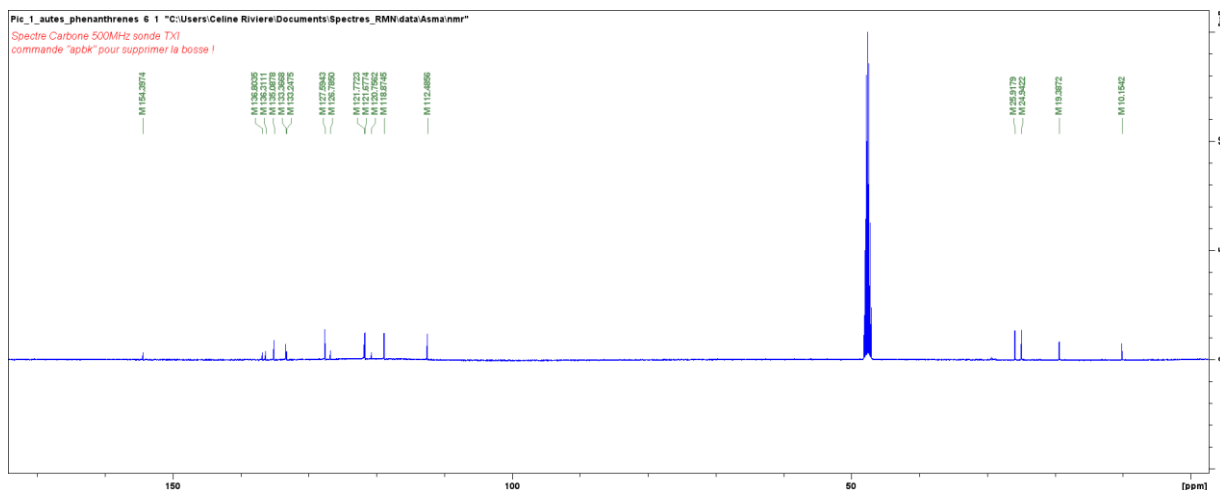
Poudre amorphe blanche ; ESI-MS (ionisation en mode négatif) m/z 249 [M-H]⁻ ; HR-ESI-Orbitrap-MS (ionisation en mode négatif) 249,1285 (calcd. 249,3207 pour C₁₈H₁₇O [M-H]⁻) ; spectre RMN ¹H (MeOD, 500 MHz): δ 7,46 (CH, d, J = 8,1 Hz, H-5), 7,41 (CH, d, J = 8,4 Hz, H-4), 7,07 (CH, d, J = 8,1 Hz, H-6), 6,82 (CH, dd, J = 18, 11,4 Hz, H-13), 6,72 (CH, d, J = 8,4 Hz, H-3), 5,6 (CH, dd, J = 11,4, 2,2 Hz, H-14a), 5,2 (CH, dd, J = 18, 2,2 Hz, H-14b), 2,84 (CH₂, m, H-9), 2,70 (CH₂, m, H-10), 2,30 (CH₃, s, H-12), 2,20 (CH₃, s, H-11), et spectre RMN ¹³C- (MeOD, 125 MHz) : 154,40 (C-2), 136,80 (C-1a), 136,31 (C-8), 135,09 (C-13), 133,37 (C-8a), 133,37 (C-5a), 133,25 (C-7), 127,59 (C-6), 126,78 (C-4a), 121,77 (C-5), 121,68 (C-4), 120,76 (C-1), 118,87 (C-14), 112,48 (C-3), 25,92 (C-9), 24,95 (C-10), 19,39 (C-12), 10,15 (C-11)

Chapitre 3 : Matériels & Méthodes : Phytochimie : RMN des composés phénanthréniques isolés à partir de *Juncus inflexus*

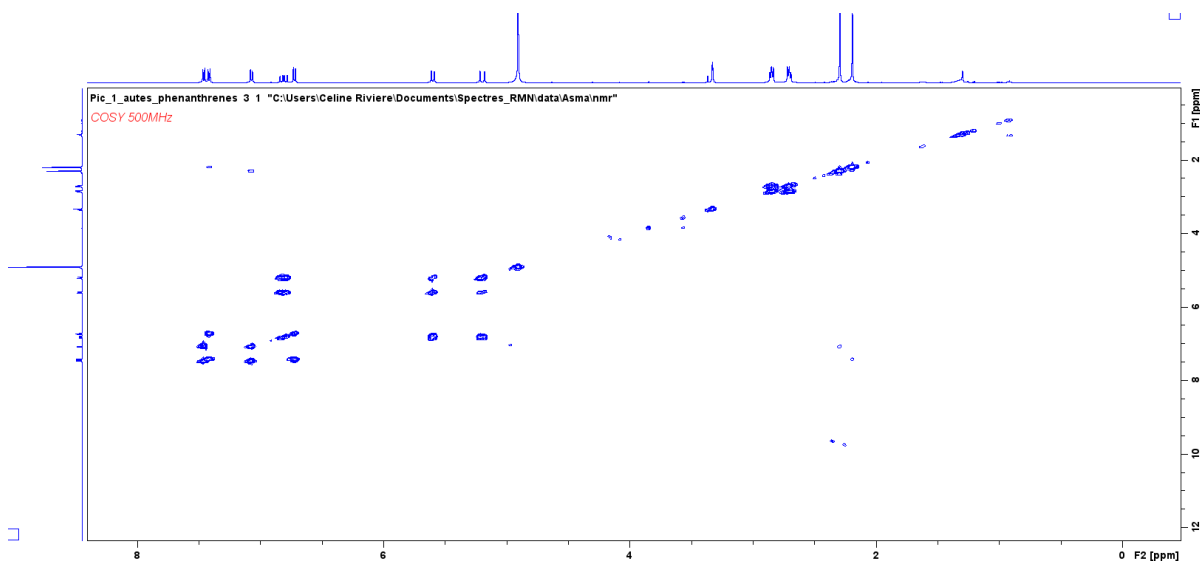
Spectre RMN ^1H du composé 1 dans le MeOD (sonde TXI)



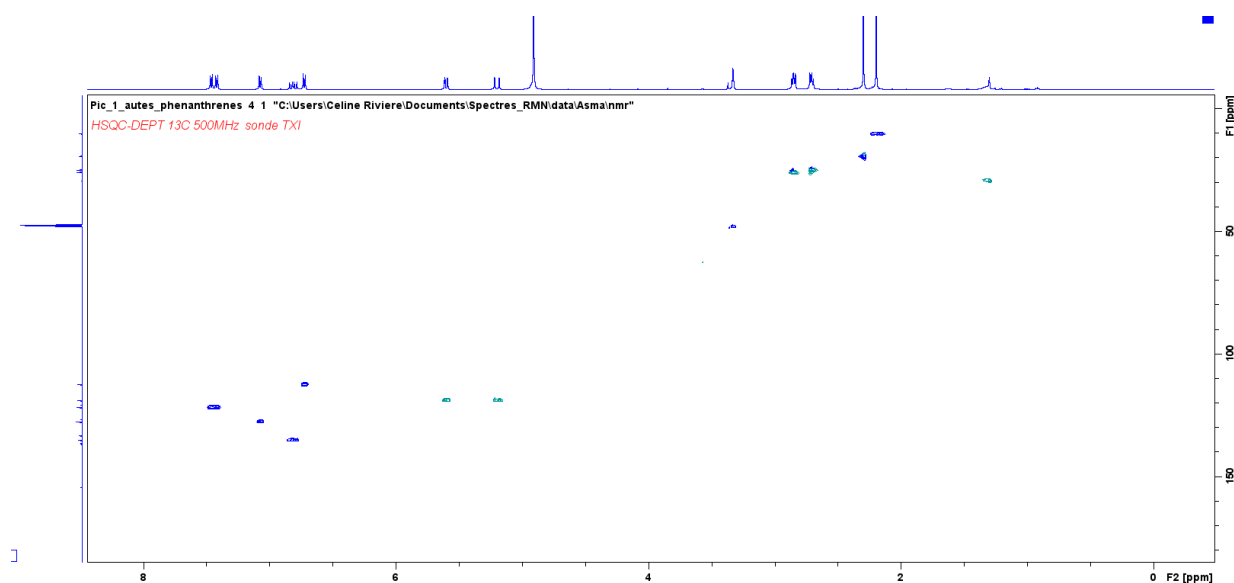
Spectre RMN ^{13}C du composé 1 dans le MeOD (sonde TXI)



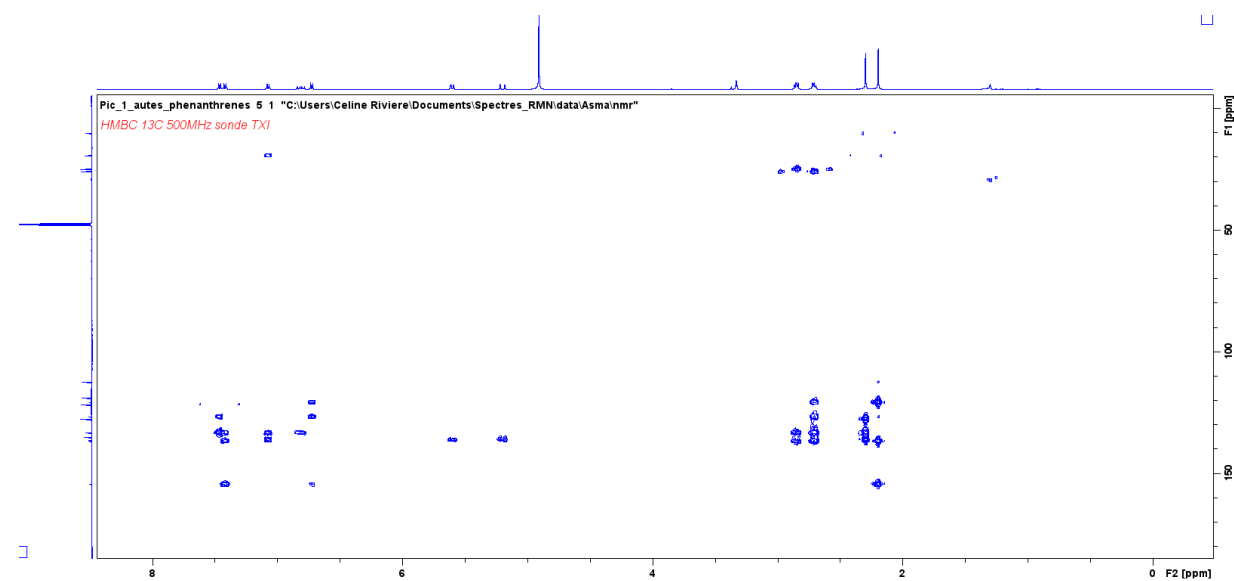
Spectre COSY du composé 1 dans le MeOD (sonde TXI)



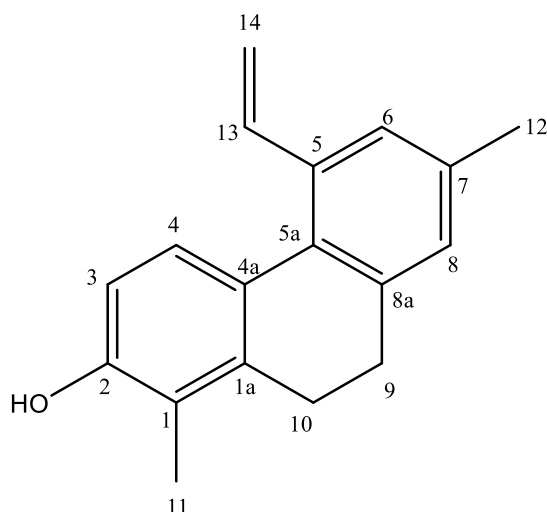
Spectre HSQC-DEPT du composé 1 dans le MeOD (sonde TXI)



Spectre HMBC du composé 1 dans le MeOD (sonde TXI)



Composé 2 = 5-éthényl-1,7-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2-ol



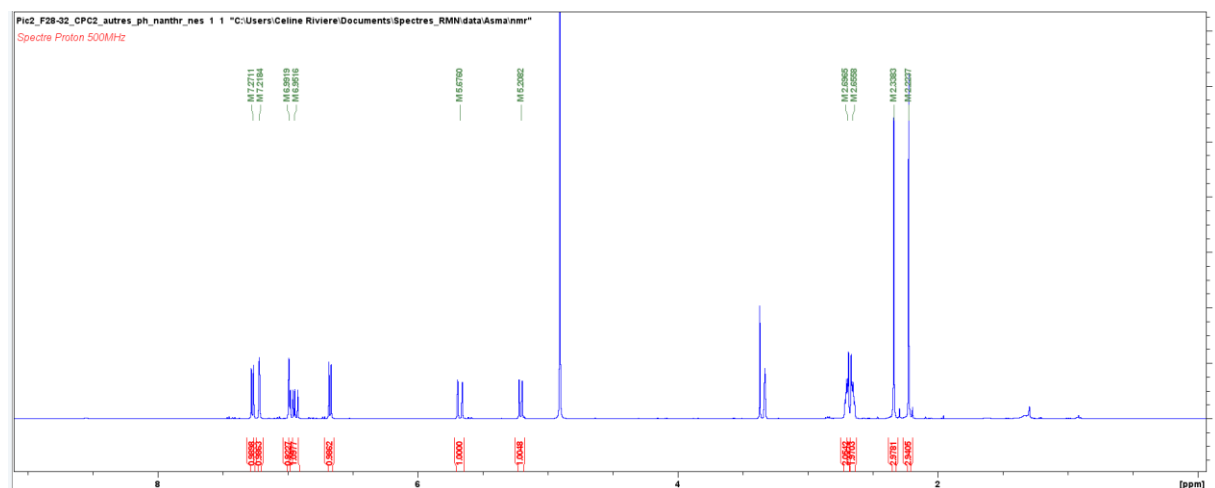
Masse molaire : 250,33 g.mol⁻¹

Formule brute = C₁₈H₁₈O

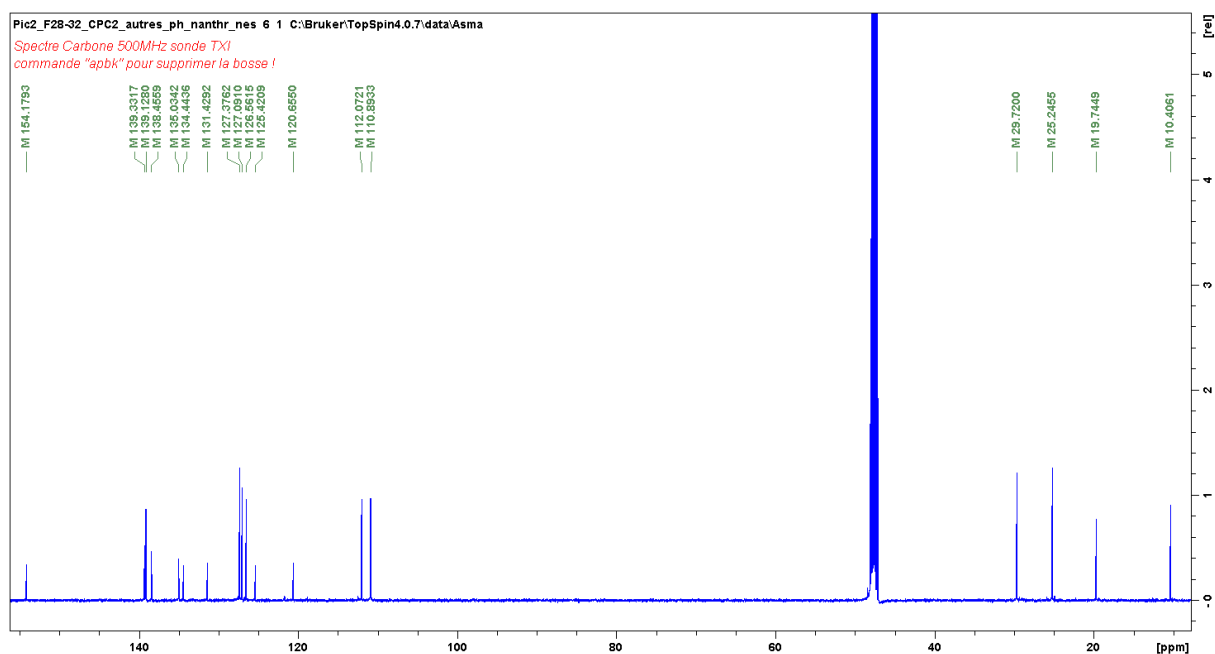
Poudre amorphe blanche ; ESI-MS (ionisation en mode négatif) m/z 249 [M-H]⁻ ; HR-ESI-Orbitrap-MS (ionisation en mode négatif) 249,1285 (calcd. 249,3207 pour C₁₈H₁₇O [M-H]⁻) ; spectre RMN ¹H (MeOD, 500 MHz) : 7,27 (CH, d, J = 8,37 Hz, H-4), 7,22 (CH, s, H-8), 6,99 (CH, s, H-6), 6,95 (CH, dd, J = 17,5, 10,9 Hz, H-13), 6,67 (CH, d, J = 8,42 Hz, H-3), 5,68 (CH, dd, J = 17,5, 1,6 Hz, H-14a), 5,21 (CH, dd, J = 10,9, 1,6 Hz, H-14b), 2,69 (CH₂, m, H-10), 2,65 (CH₂, m, H-9), 2,34 (CH₃, s, H-12), 2,22 (CH₃, s, H-11), et spectre carbone ¹³C (MeOD, 125 MHz) : 154,18 (C-2), 139,33 (C-1a), 139,13 (C-13), 138,45 (C-8a), 135,03 (C-7), 134,44 (C-5), 131,43 (C-5a), 127,38 (C-4), 127,09 (C-6), 126,56 (C-8), 125,42 (C-4a), 120,65 (C-1), 112,07 (C-14), 110,89 (C-3), 29,72 (C-9), 25,24 (C-10), 19,75 (C-12), 10,41 (C-11)

Chapitre 3 : Matériels & Méthodes : Phytochimie : RMN des composés phénanthréniques isolés à partir de *Juncus inflexus*

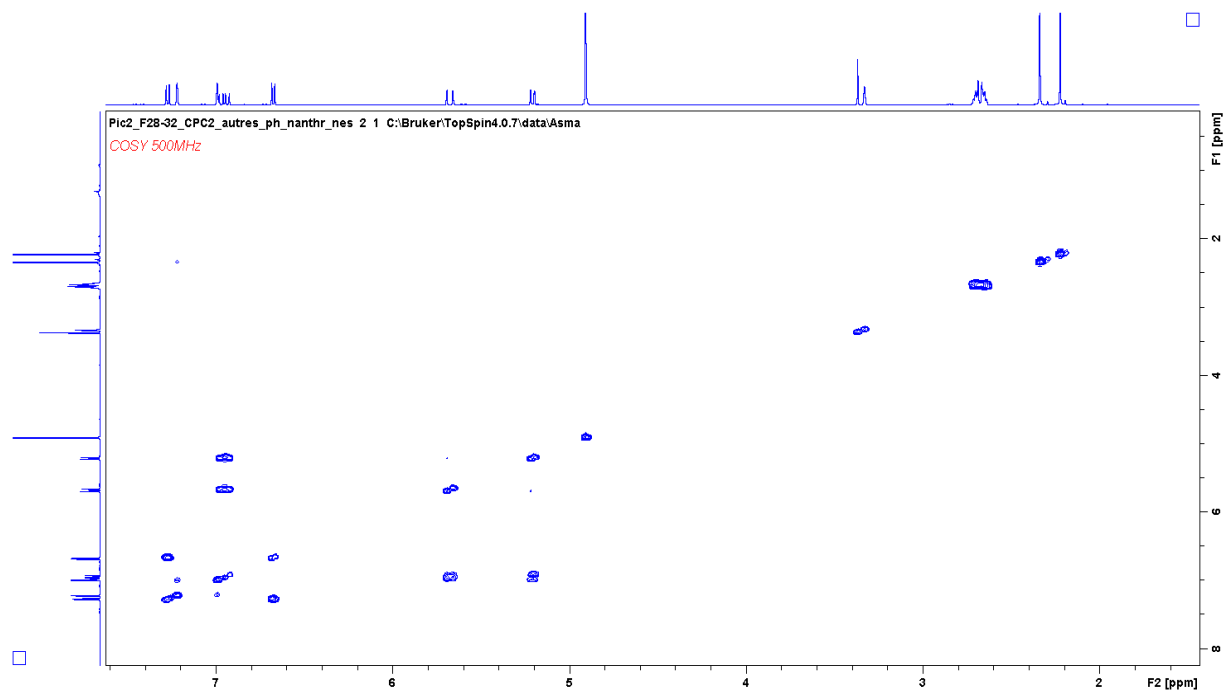
Spectre RMN ^1H du composé 2 dans le MeOD (sonde TXI)



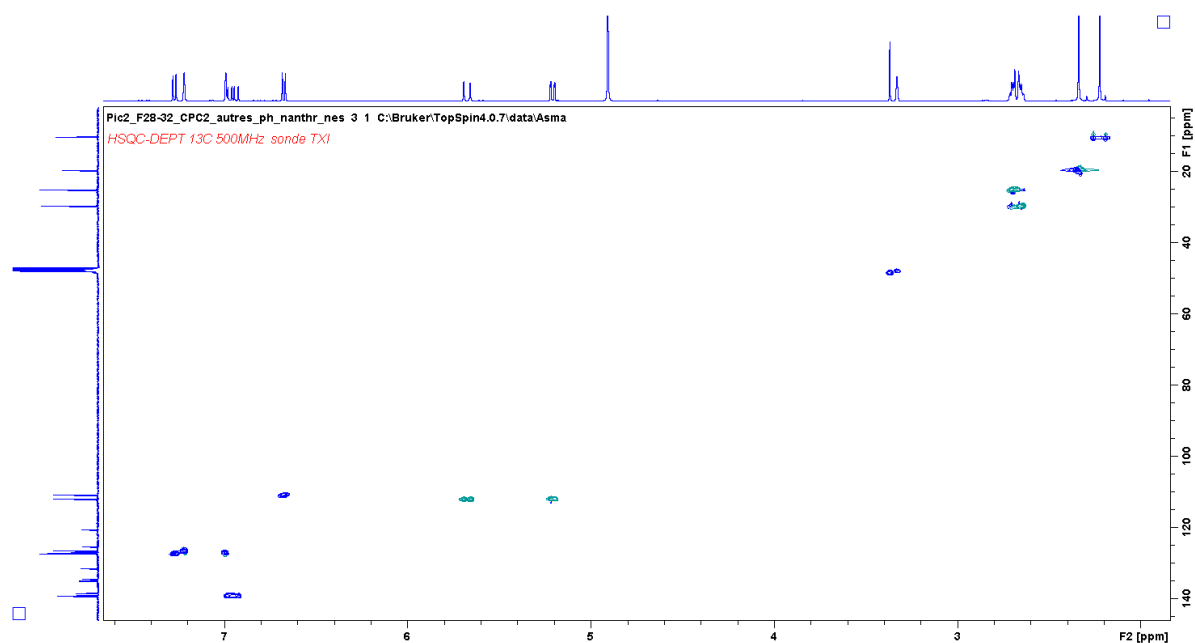
Spectre RMN ^{13}C du composé 2 dans le MeOD (sonde TXI)



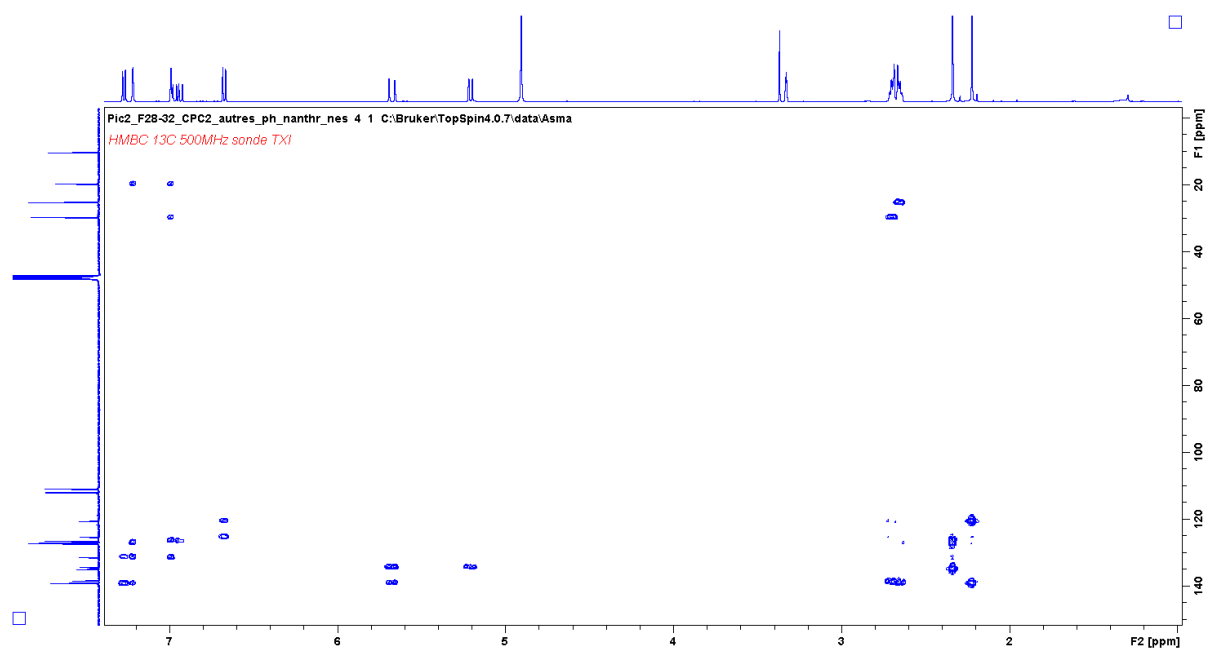
Spectre COSY du composé 2 dans le MeOD (sonde TXI)



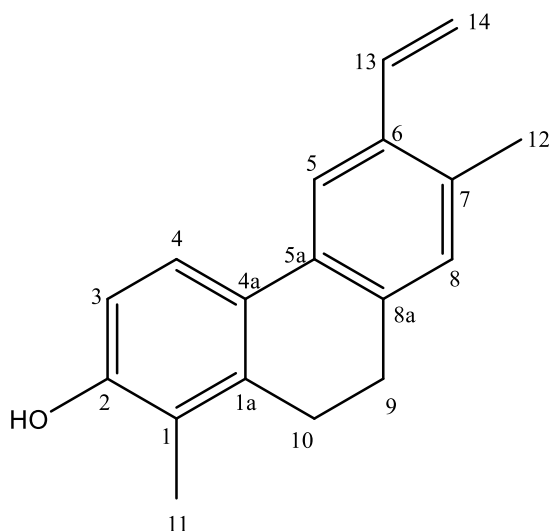
Spectre HSQC-DEPT du composé 2 dans le MeOD (sonde TXI)



Spectre HMBC du composé 2 dans le MeOD (sonde TXI)



Composé 3 = Juncuénine A (= 6-éthényl-1,7-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2-ol)



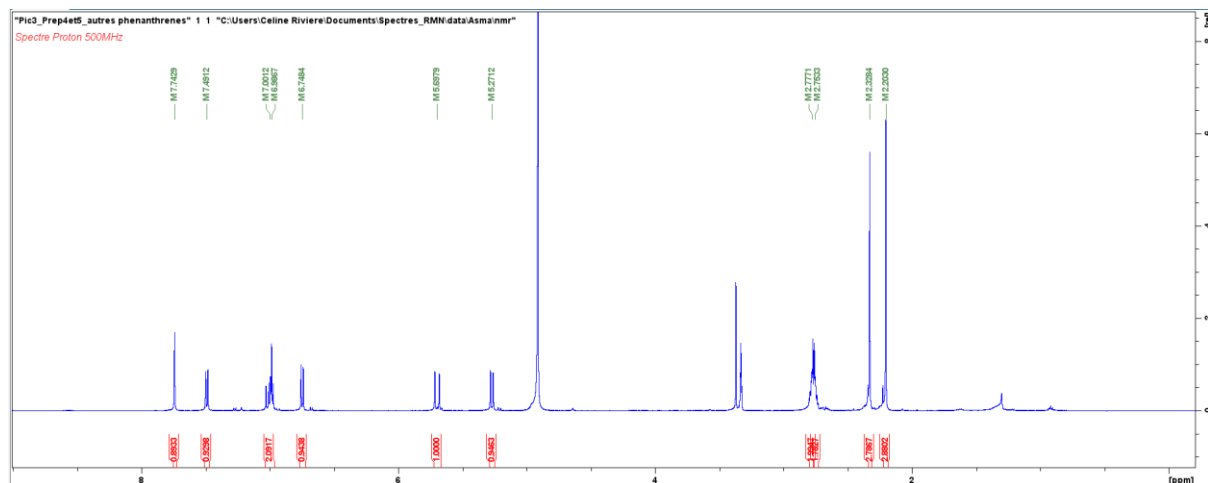
Masse molaire : 250,33 g.mol⁻¹

Formule brute = C₁₈H₁₈O

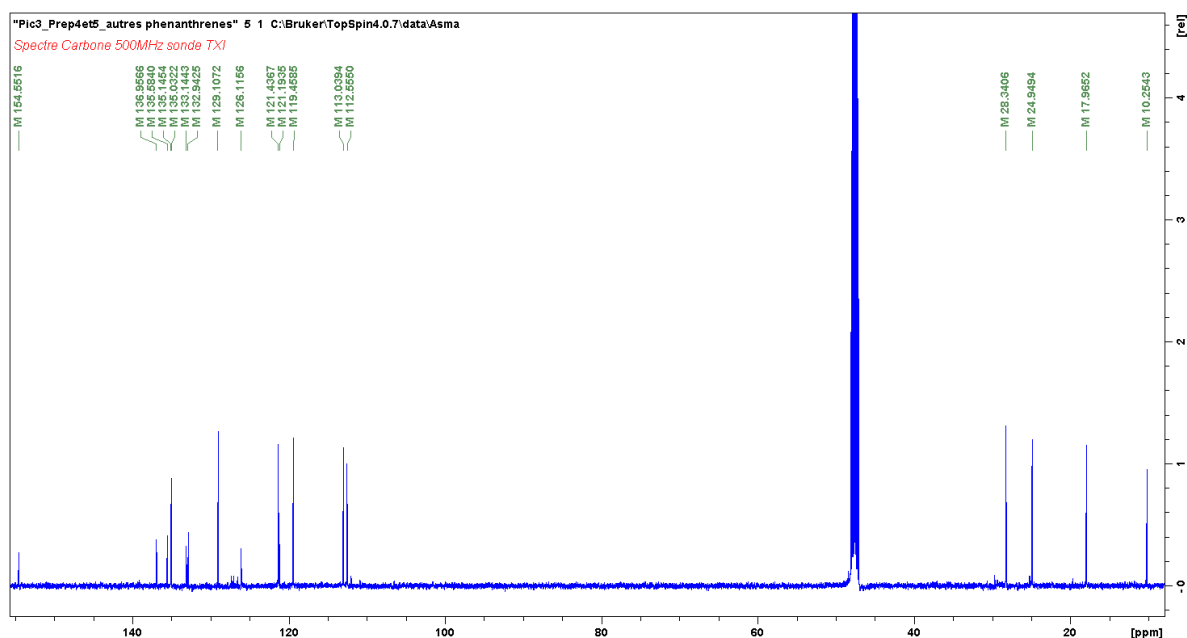
Poudre amorphe blanche ; ESI-MS (mode d'ionisation négative) m/z 249 [M-H]⁻ ; HR-ESI-Orbitrap-MS (mode d'ionisation négative) 249,1287 (calcd. 249,3207 pour C₁₈H₁₇O [M-H]⁻) ; spectre RMN ¹H (MeOD, 500 MHz): 7,74 (CH, s, H-5), 7,49 (CH, d, J = 8,41 Hz, H-4), 7,00 (CH, dd, J = 17,4, 11 Hz, H-13), 6,98 (CH, s, H-8), 6,75 (CH, d, J = 8,41 Hz, H-3), 5,69 (CH, dd, J = 17,4, 1,55 Hz, H-14a), 5,27 (CH, dd, J = 11, 1,55 Hz, H-14b), 2,78 (CH₂, m, H-10), 2,75 (CH₂, m, H-9), 2,33 (CH₃, s, H-12), 2,20 (CH₃, s, H-11), et spectre carbone ¹³C (MeOD, 125 MHz): 154,55 (C-2), 136,95 (C-1a), 135,58 (C-8a), 135,14 (C-6), 135,03 (C-13), 133,14 (C-5a), 132,94 (C-7), 129,10 (C-8), 126,11 (C-4a), 121,43 (C-4), 121,19 (C-1), 119,45 (C-5), 113,03 (C-14), 112,55 (C-3), 28,34 (C-9), 24,94 (C-10), 17,96 (C-12), 10,25 (C-11)

Chapitre 3 : Matériels & Méthodes : Phytochimie : RMN des composés phénanthréniques isolés à partir de *Juncus inflexus*

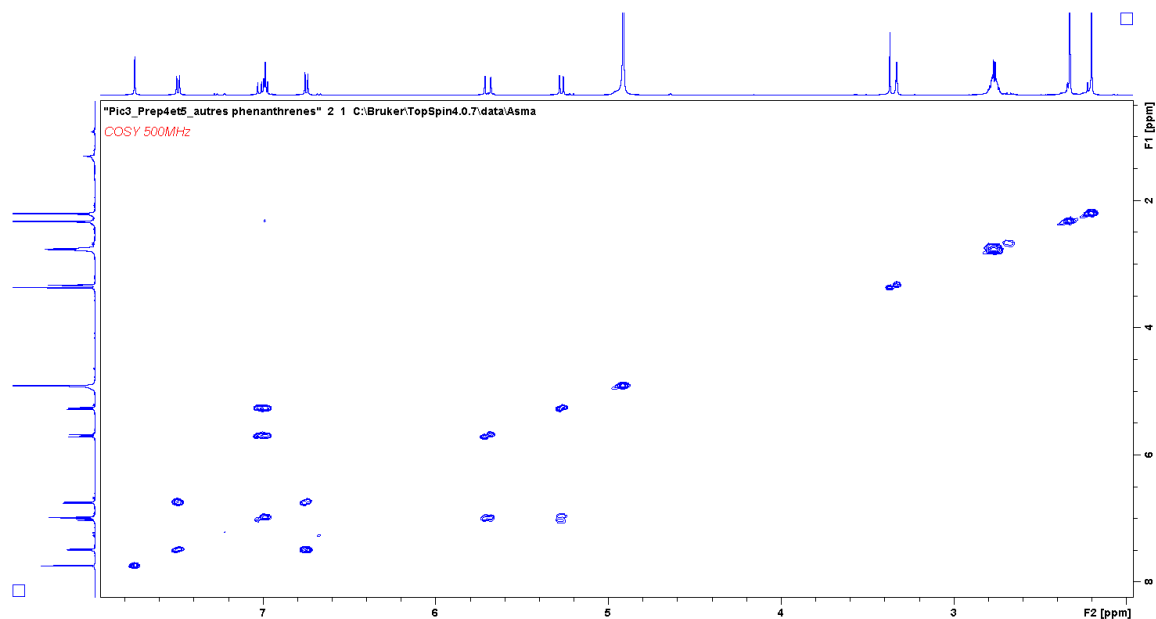
Spectre RMN ^1H du composé 3 dans le MeOD (sonde TXI)



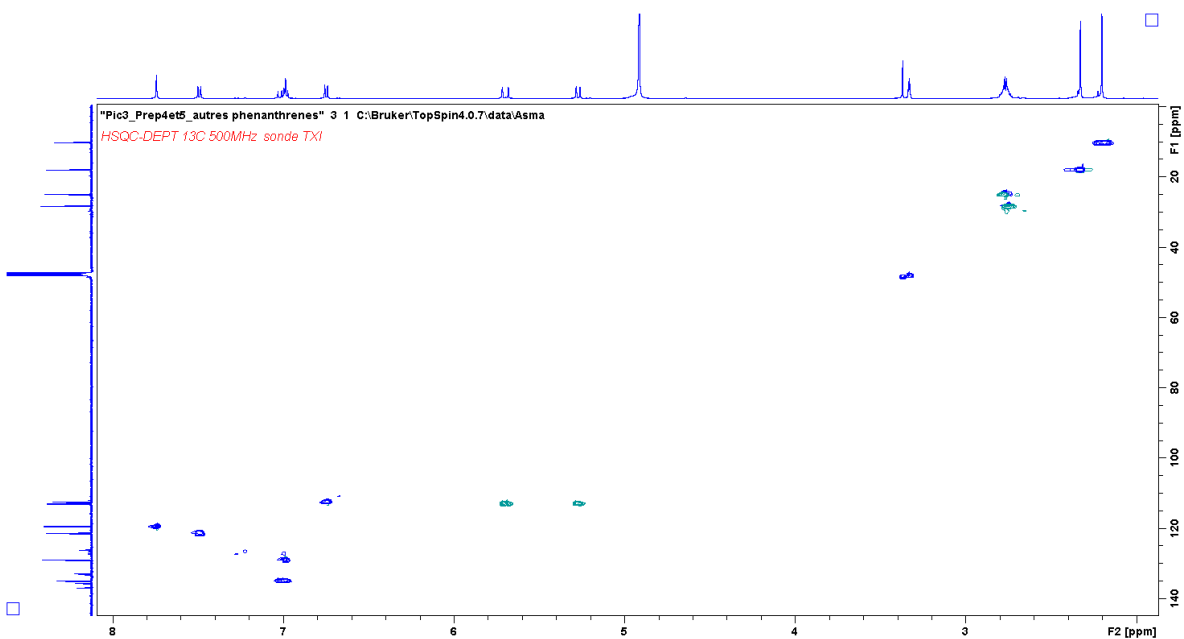
Spectre RMN ^{13}C du composé 3 dans le MeOD (sonde TXI)



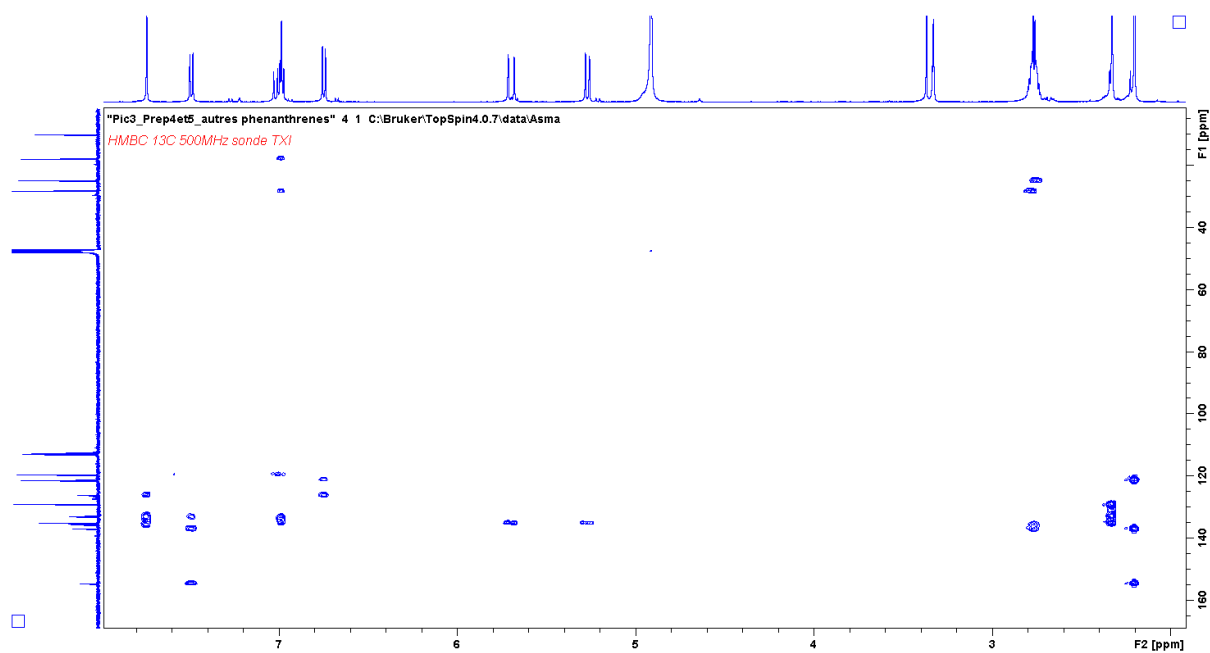
Spectre COSY du composé 3 dans le MeOD (sonde TXI)



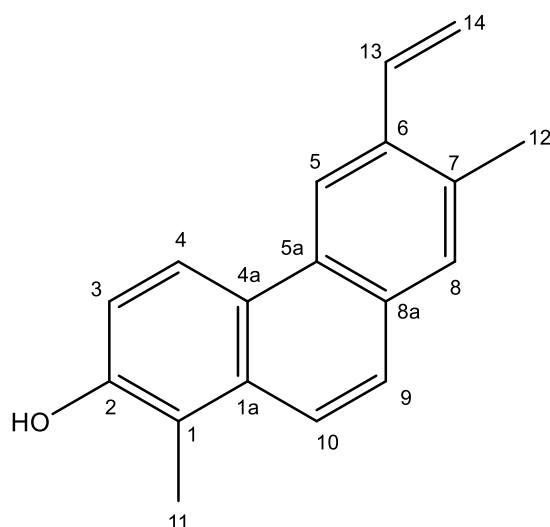
Spectre HSCQ-DEPT du composé 3 dans le MeOD (sonde TXI)



Spectre HMBC du composé 3 dans le MeOD (sonde TXI)



Composé 4 = dehydrojuncuénine A (= 6-éthényl-1,7-diméthylphénanthrène-2-ol)



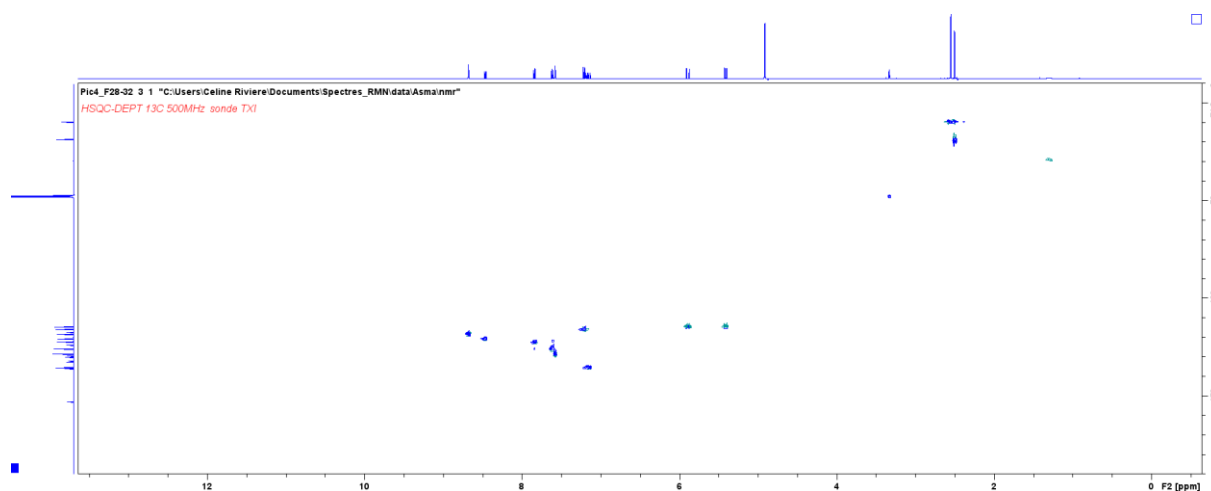
Masse molaire : 248,31 g.mol⁻¹

Formule brute = C₁₈H₁₆O

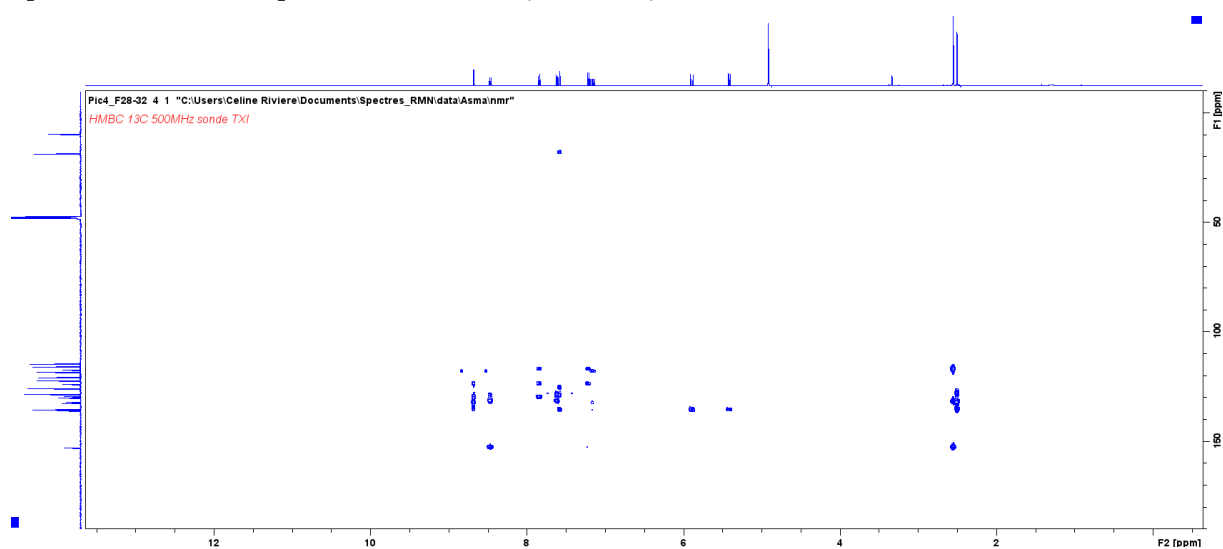
Poudre amorphe blanche ; ESI-MS (mode d'ionisation négative) m/z 247 [M-H]⁻ ; HR-ESI-Orbitrap-MS (mode d'ionisation négative) 247,1125 (calcd. 247,3061 pour C₁₈H₁₅O [M-H]⁻) ; spectre RMN ¹H (MeOD, 500 MHz): 8,68 (CH, s, H-5), 8,46 (CH, d, J = 8,96 Hz, H-4), 7,84 (CH, d, J = 9,22 Hz, H-10), 7,61 (CH, d, J = 9,22 Hz, H-9), 7,58 (CH, s, H-8), 7,21 (CH, d, J = 8,96 Hz, H-3), 7,16 (CH, dd, J = 17,46, 11 Hz, H-13), 5,89 (CH, dd, J = 17,46, 1,55 Hz, H-14a), 5,41 (CH, dd, J = 11, 1,55 Hz, H-14b), 2,55 (CH₃, s, H-11), 2,50 (CH₃, s, H-12), et spectre carbone ¹³C (MeOD, 125 MHz): 152,93 (C-2), 135,97 (C-6), 135,47 (C-13), 132,61 (C-7), 132,14 (C-1a), 130,15 (C-8a), 129,34 (C-5a), 128,56 (C-8), 125,88 (C-9), 123,96 (C-4a), 122,21 (C-10), 120,77 (C-4), 118,43 (C-5), 117,41 (C-1), 115,98 (C-3), 114,59 (C-14), 18,53 (C-12), 9,67 (C-11)

Chapitre 3 : Matériels & Méthodes : Phytochimie : RMN des composés phénanthréniques isolés à partir de *Juncus inflexus*

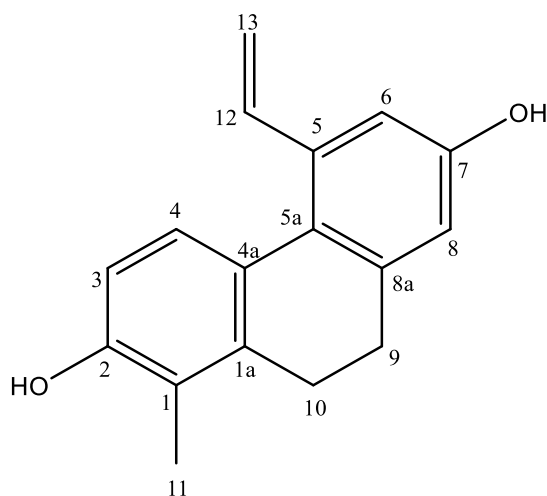
Spectre HSCQ-DEPT du composé 4 dans le MeOD (sonde TXI)



Spectre HMBC du composé 4 dans le MeOD (sonde TXI)



Composé 6 = Effusol (= 5-éthényl-1-méthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol)



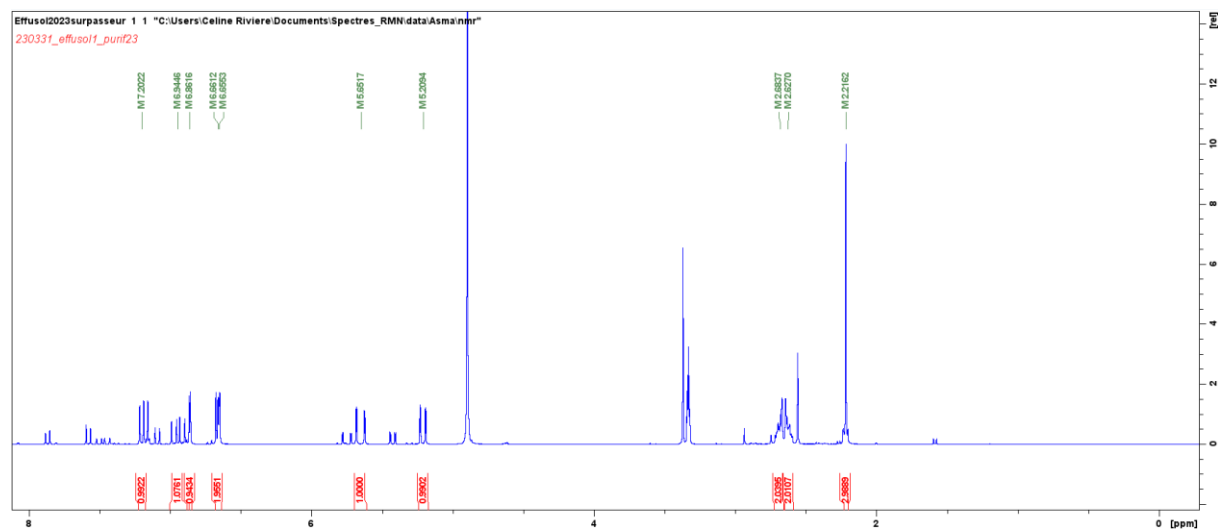
Masse molaire : 252,30 g.mol⁻¹

Formule brute = C₁₇H₁₆O₂

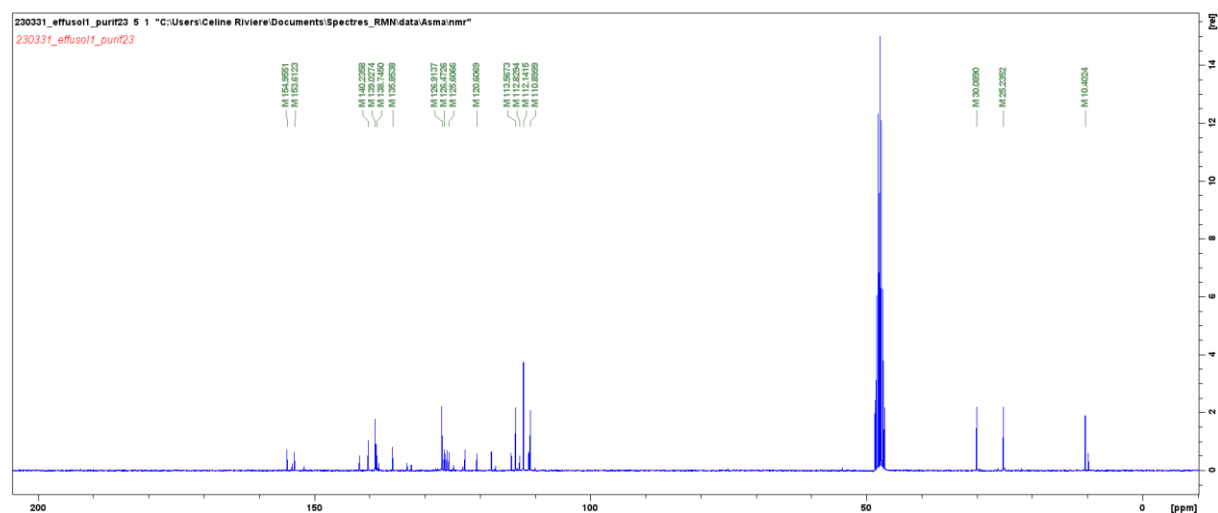
Poudre amorphe jaunâtre ; ESI-MS (ionisation en mode négatif) m/z 251 [M-H]⁻ ; HR-ESI-Orbitrap-MS (ionisation en mode négatif) 251,1072 (calcd. 251,2941 for C₁₇H₁₅O₂ [M-H]⁻) ; spectre RMN ¹H (MeOD, 500 MHz) : 7,20 (CH, d, J = 8,41 Hz, H-4), 6,94 (CH, dd, J = 17,46, 10,81 Hz, H-12), 6,86 (CH, d, J = 2,55 Hz, H-6), 6,66 (CH, d, J = 8,41 Hz, H-3), 6,65 (CH, d, J = 2,55 Hz, H-8), 5,65 (CH, dd, J = 17,46, 1,62 Hz, H-13a), 5,21 (CH, dd, J = 10,81, 1,62 Hz, H-13b), 2,69 (CH₂, m, H-10), 2,63 (CH₂, m, H-9), 2,22 (CH₃, s, H-11), et spectre RMN ¹³C (MeOD, 125 MHz) : 154,95 (C-7), 153,61 (C-2), 140,23 (C-8a), 139,03 (C-12), 138,74 (C-1a), 135,85 (C-5), 126,91 (C-4), 126,47 (C-5a), 125,61 (C-4a), 120,61 (C-1), 113,57 (C-8), 112,83 (C-6), 112,14 (C-13), 110,90 (C-3), 30,09 (C-9), 25,23 (C-10), 10,40 (C-11)

Chapitre 3 : Matériels & Méthodes : Phytochimie : RMN des composés phénanthréniques isolés à partir de *Juncus inflexus*

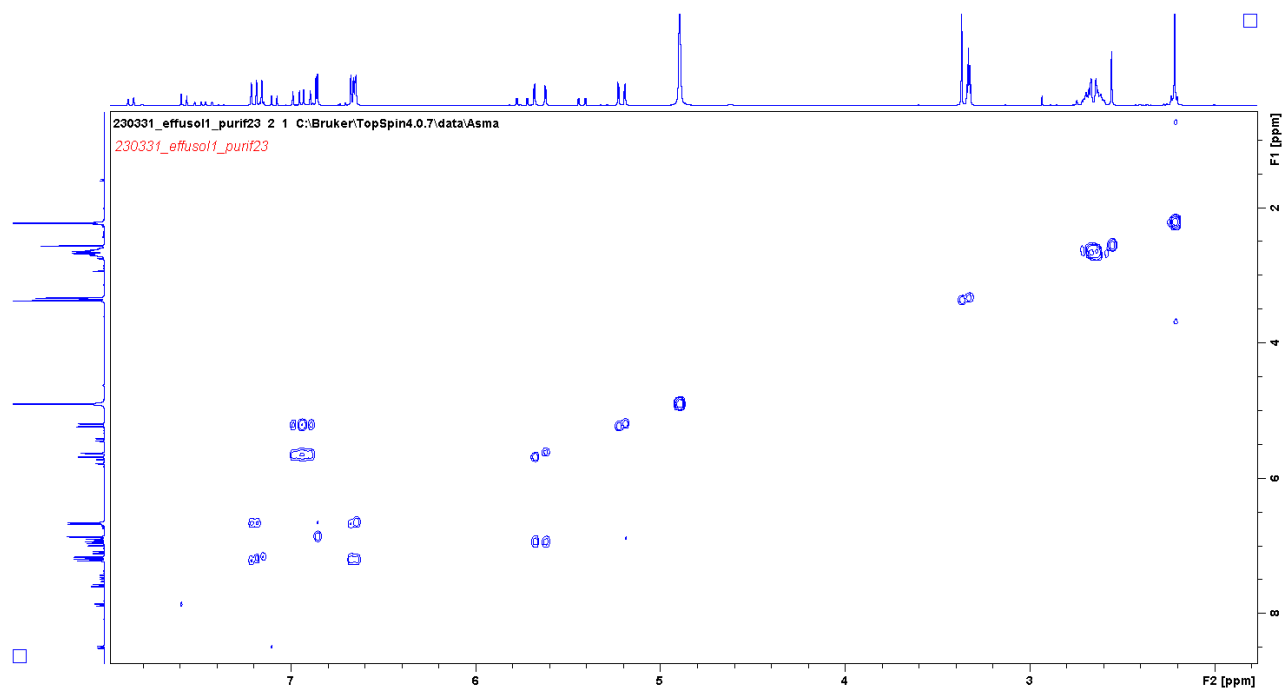
Spectre RMN ^1H du composé 6 dans le MeOD (sonde TXI)



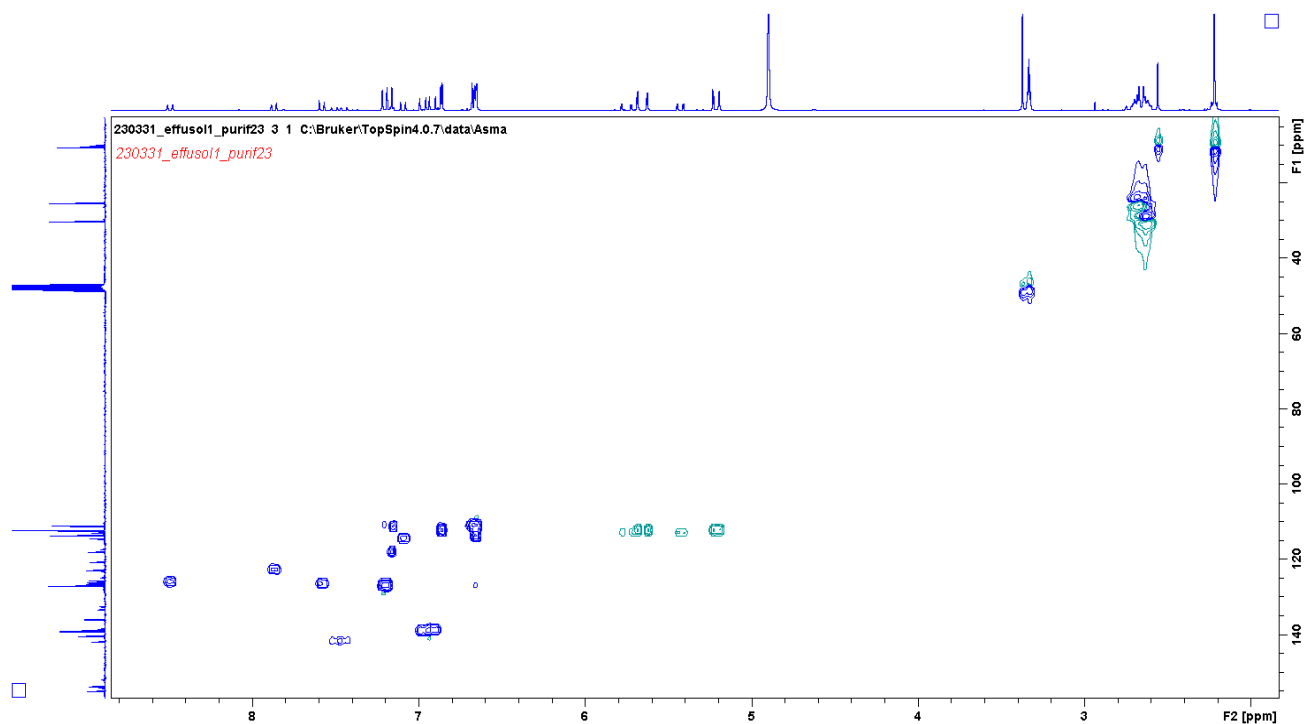
Spectre RMN ^{13}C du composé 6 dans le MeOD (sonde TXI)



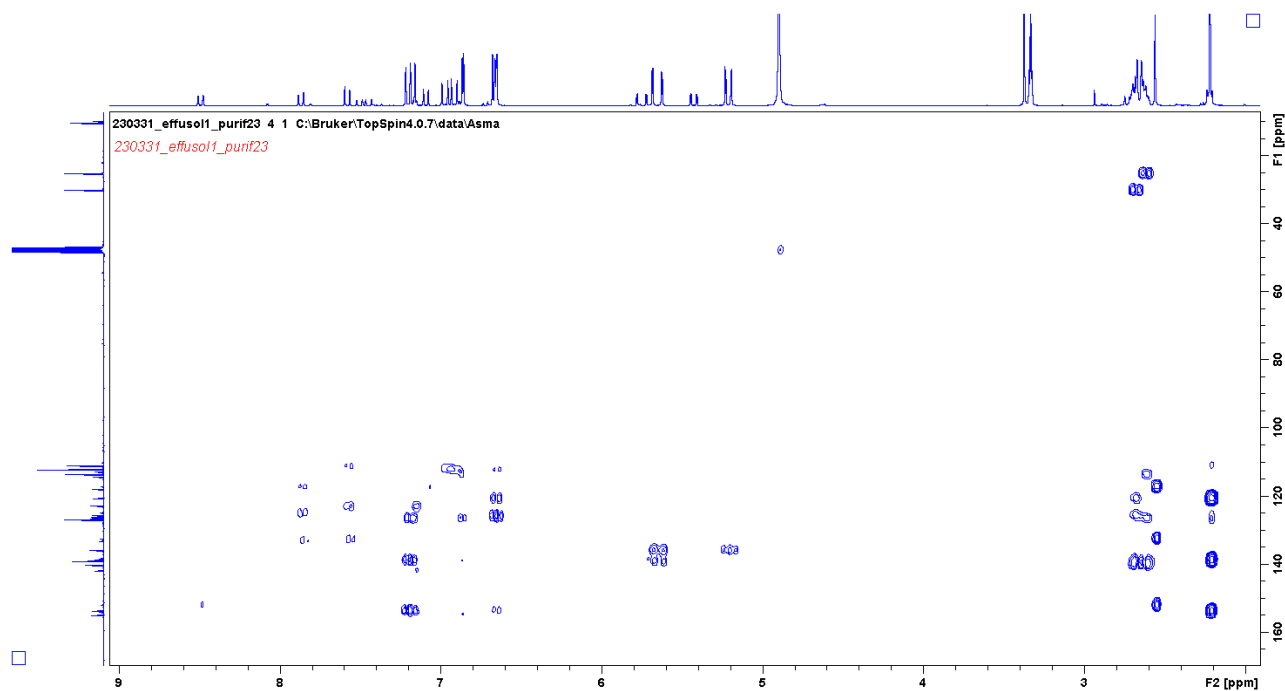
Spectre COSY du composé 6 dans le MeOD (sonde TXI)



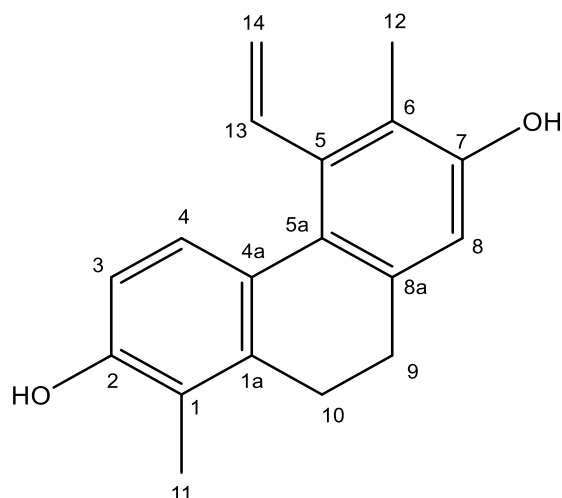
Spectre HSQC-DEPT du composé 6 dans le MeOD (sonde TXI)



Spectre HMBC du composé 6 dans le MeOD (sonde TXI)



Composé 8 = Juncusol (= 5-éthényl-1,6-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol)

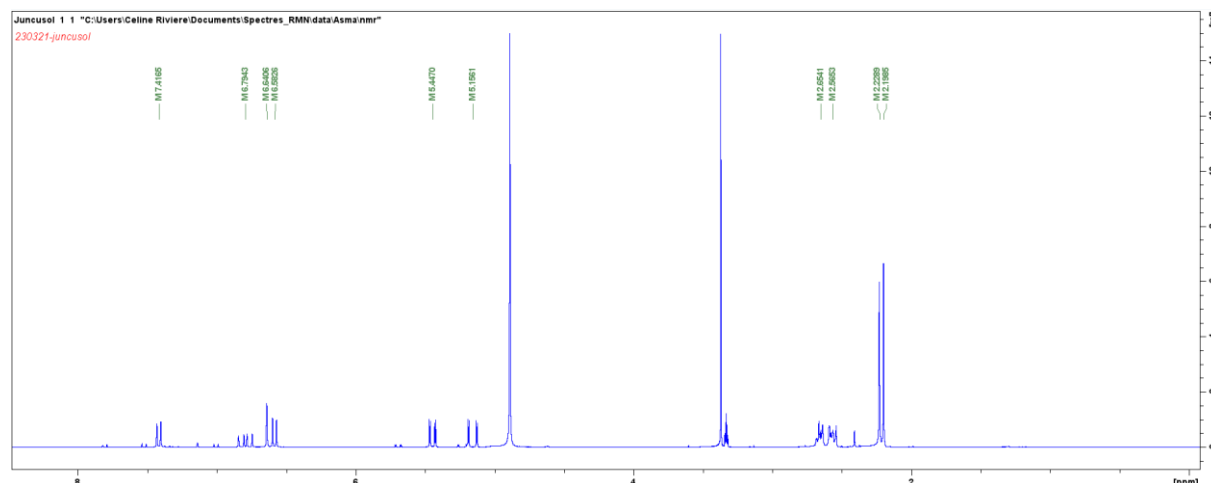


Masse molaire : 266,33 g.mol⁻¹

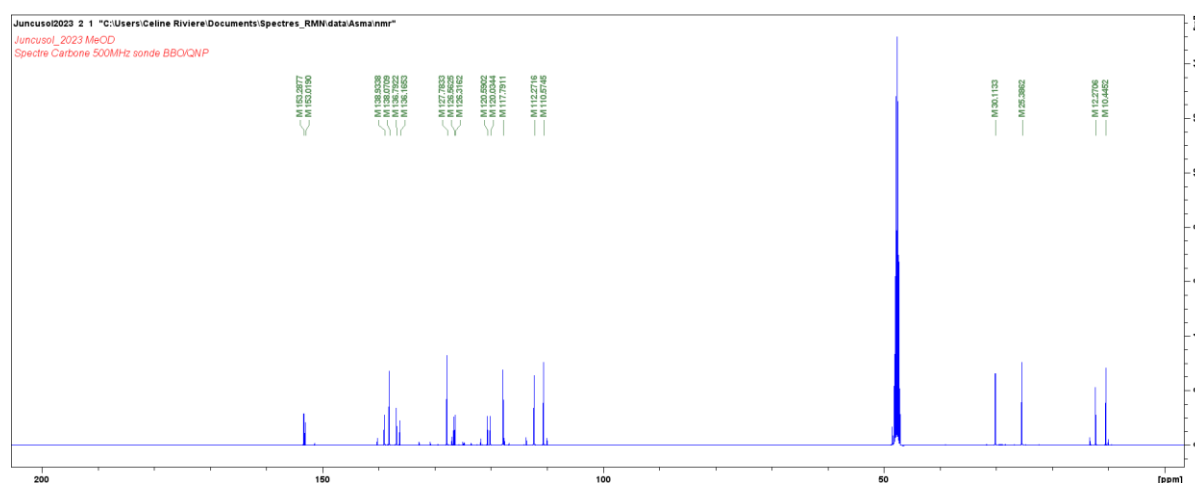
Formule brute = C₁₈H₁₈O₂

Poudre amorphe verdâtre ; ESI-MS (ionisation en mode négatif) m/z 265 [M-H]⁻ ; HR-ESI-Orbitrap-MS (ionisation en mode négatif) 265,1233 (calcd. 265,3197 for C₁₈H₁₇O₂ [M-H]⁻) ; spectre RMN (MeOD, 500 MHz) : δ 7,42 (CH, d, J = 8,5 Hz, H-4), 6,79 (CH, dd, J = 18, 11,4 Hz ; H-13), 6,64 (CH, s, H-8), 6,58 (CH, d, J = 8,5 Hz, H-3), 5,45 (CH, dd, J = 11,4, 2,2 Hz, H-14a), 5,16 (CH, dd, J = 18, 2,2 Hz, H-14b), 2,65 (CH₂, m, H-10), 2,57 (CH₂, m, H-9), 2,23 (CH₃, s, H-12), 2,20 (CH₃, s, H-11), et spectre RMN ¹³C (MeOD, 125 MHz) : 153,29 (C-7), 153,02 (C-2), 138,93 (C-1a), 138,07 (C-13), 136,79 (C-8a), 136,16 (C-5), 127,78 (C-4), 126,56 (C-5a), 126,32 (C-4a), 120,59 (C-6), 120,03 (C-1), 117,79 (C-14), 112,27 (C-8), 110,57 (C-3), 30,11 (C-9), 25,39 (C-10), 12,27 (C-12), 10,44 (C-11)

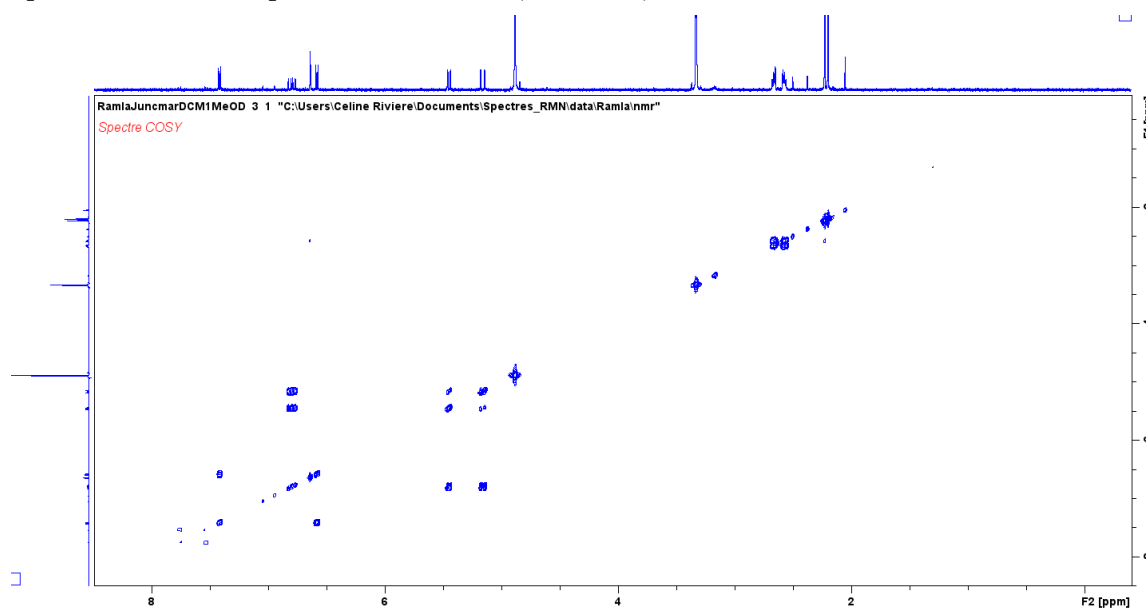
Spectre RMN ^1H du composé 8 dans le MeOD (sonde TXI)



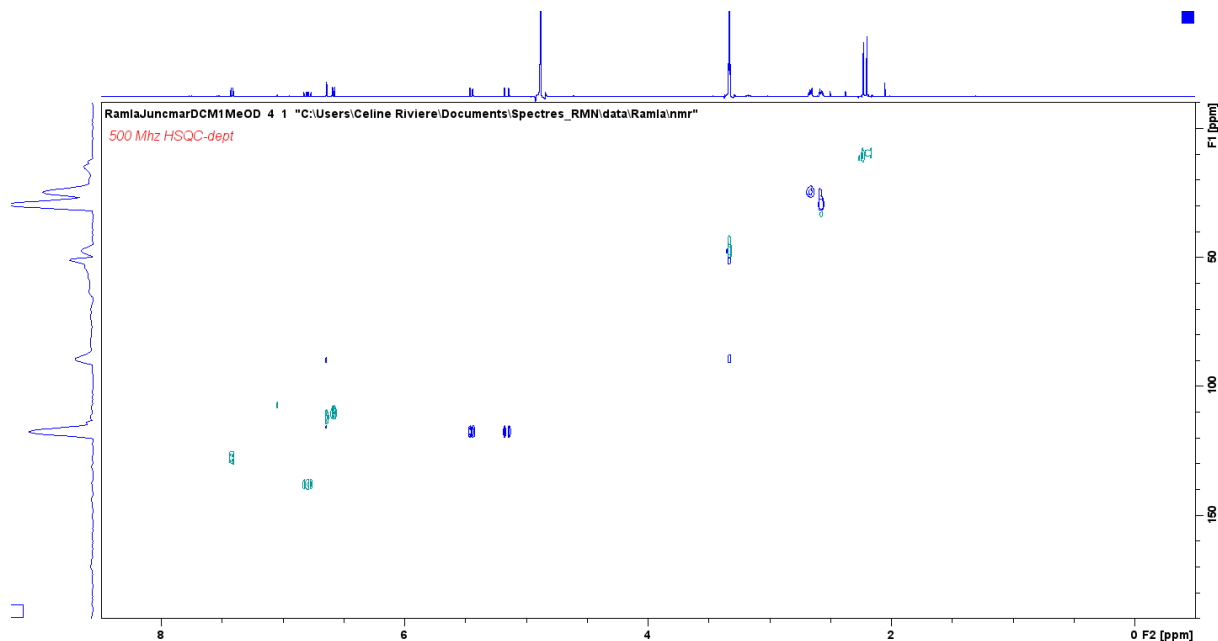
Spectre RMN ^{13}C du composé 8 dans le MeOD (sonde TXI)



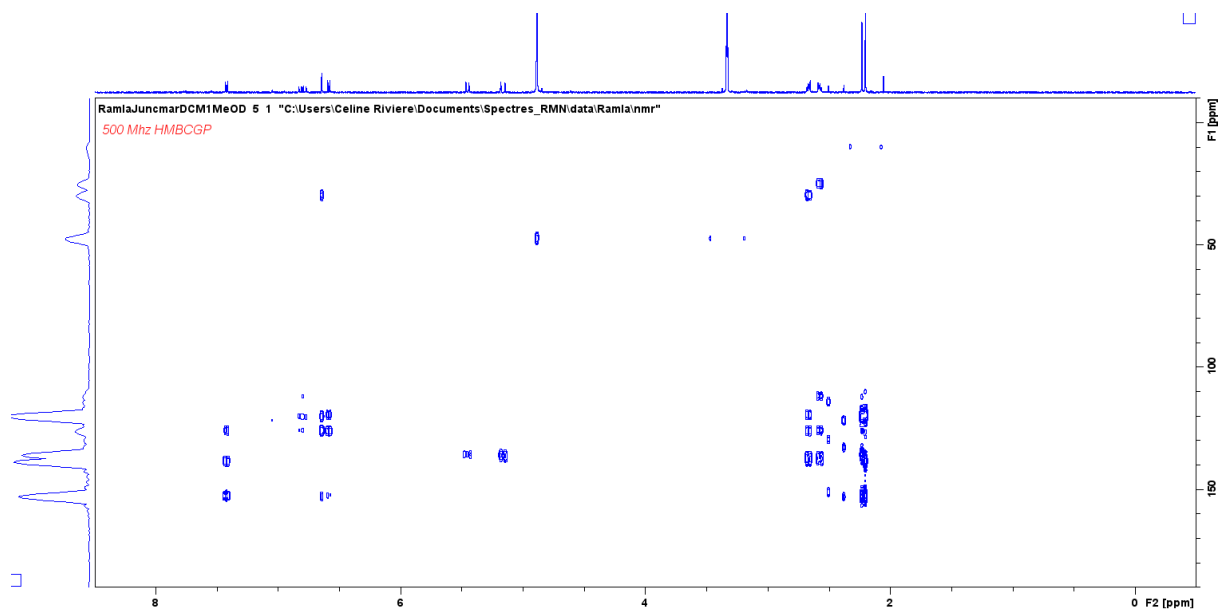
Spectre COSY du composé 8 dans le MeOD (sonde TXI)



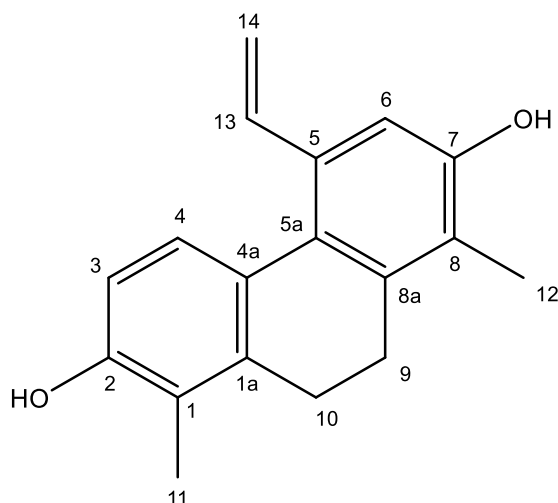
Spectre HSCQ-DEPT du composé 8 dans le MeOD (sonde TXI)



Spectre HMBC du composé 8 dans le MeOD (sonde TXI)



Composé 9 = 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol



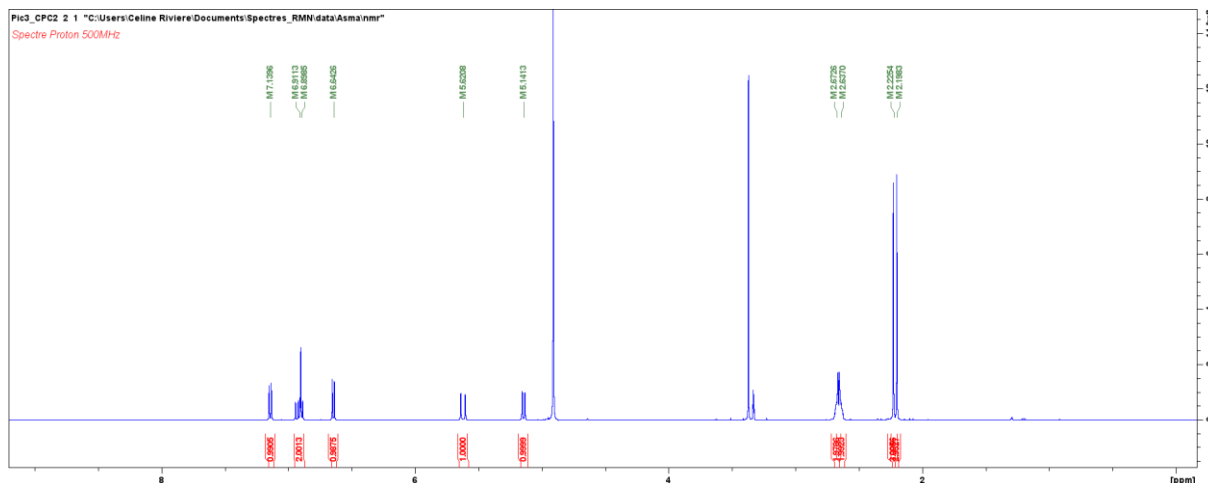
Masse molaire : 266,33 g.mol⁻¹

Formule brute = C₁₈H₁₈O₂

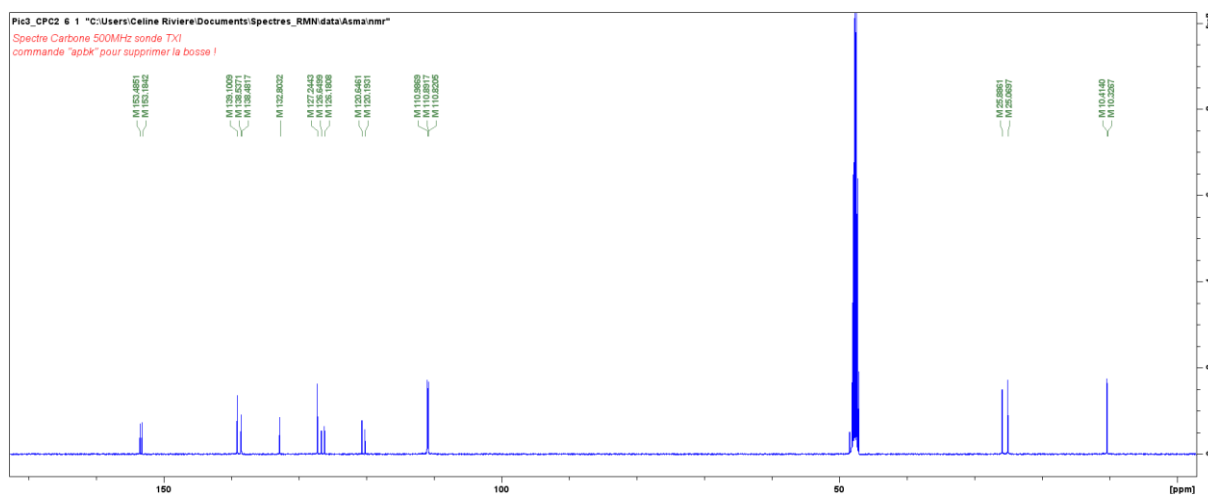
Poudre amorphe ; ESI-MS (mode d'ionisation négatif) m/z 265 [M-H]⁻ ; HR-ESI-Orbitrap-MS (mode d'ionisation négatif) 265,1232 (calcd. 265,3197 pour C₁₈H₁₇O₂ [M-H]⁻) ; spectre RMN ¹H (MeOD, 500 MHz) : δ 7,14 (CH, d, J = 8,5 Hz, H-4), 6,91 (CH, dd, J = 17,5, 10,8 Hz ; H-13), 6,90 (CH, s, H-5), 6,64 (CH, d, J = 8,5 Hz, H-3), 5,62 (CH, dd, J = 17,5, 1,6 Hz, H-14a), 5,14 (CH, dd, J = 10,8, 1,6 Hz, H-14b), 2,67 (CH₂, m, H-10), 2,64 (CH₂, m, H-9), 2,22 (CH₃, s, H-11), 2,20 (CH₃, s, H-12), et spectre RMN ¹³C (MeOD, 125 MHz) : 153,5 (C-2), 153,2 (C-7), 139,1 (C-13), 138,54 (C-8a), 138,48 (C-1a), 132,8 (C-5), 127,2 (C-4), 126,65 (C-5a), 126,2 (C-4a), 120,6 (C-8), 120,2 (C-1), 110,99 (C-6), 110,9 (C-3), 110,8 (C-14), 25,9 (C-9), 25,1 (C-10), 10,4 (C-11), 10,3 (C-12)

Chapitre 3 : Matériels & Méthodes : Phytochimie : RMN des composés phénanthréniques isolés à partir de *Juncus inflexus*

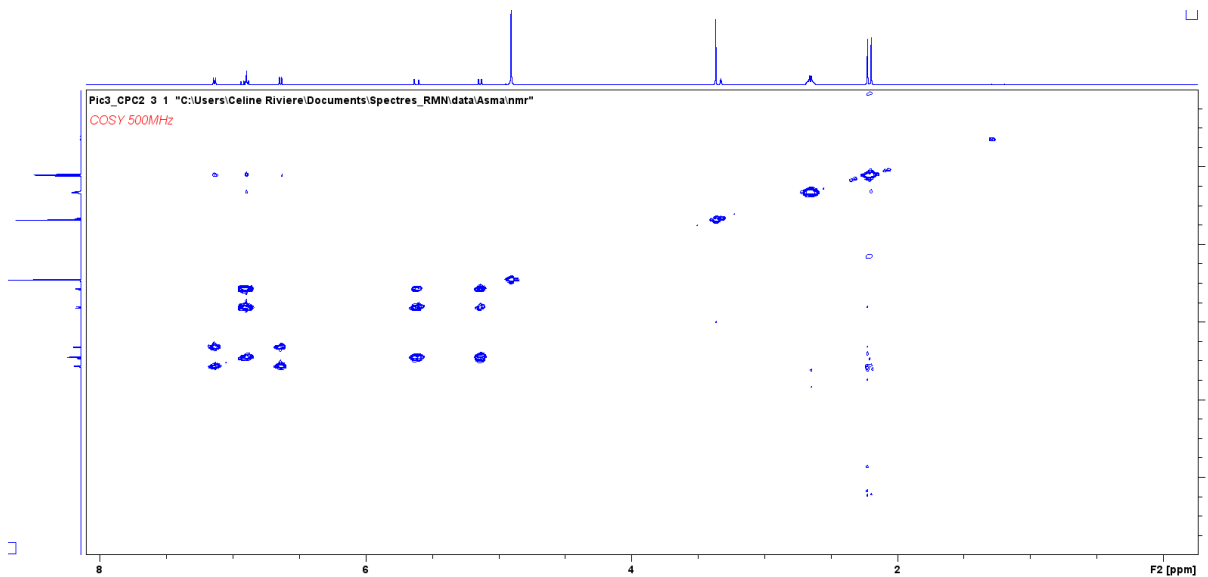
Spectre RMN ^1H du composé 9 dans le MeOD (sonde TXI)



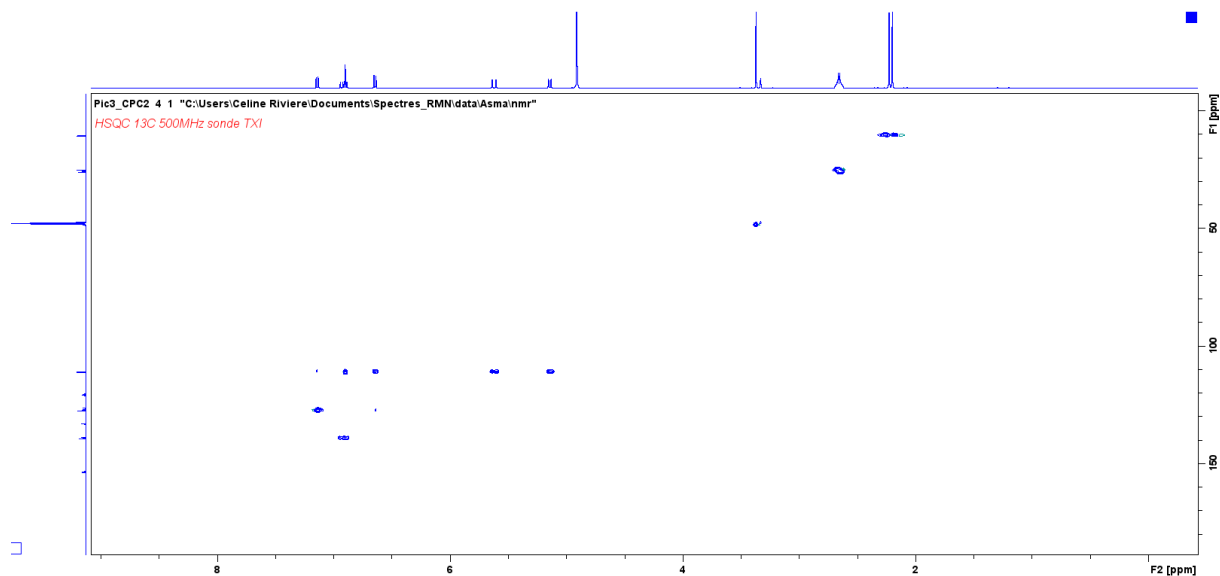
Spectre RMN ^{13}C du composé 9 dans le MeOD (sonde TXI)



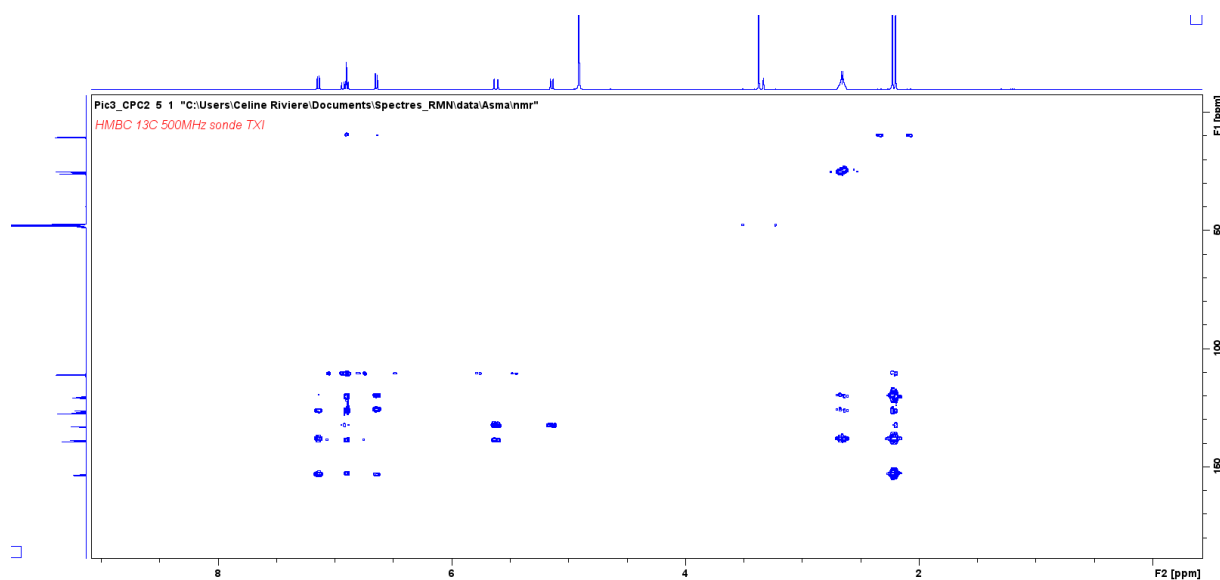
Spectre COSY du composé 9 dans le MeOD (sonde TXI)



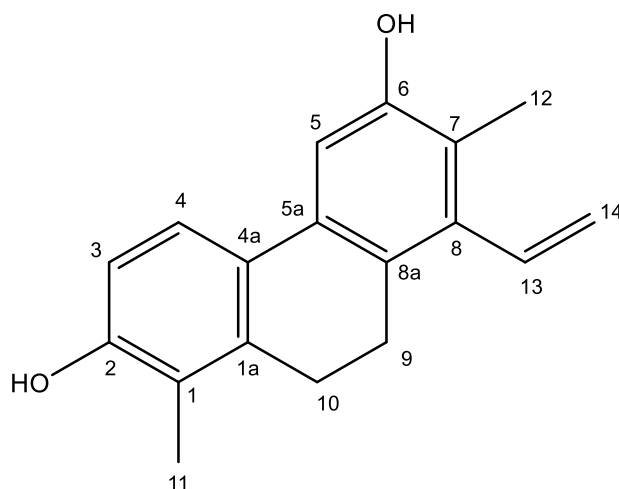
Spectre HSCQ du composé 9 dans le MeOD (sonde TXI)



Spectre HMBC du composé 9 dans le MeOD (sonde TXI)



Composé 11 = Juncuénine B (= 8-éthényl-1,7-diméthyl-9,10-dihydropheénanthrène-2,6-diol)



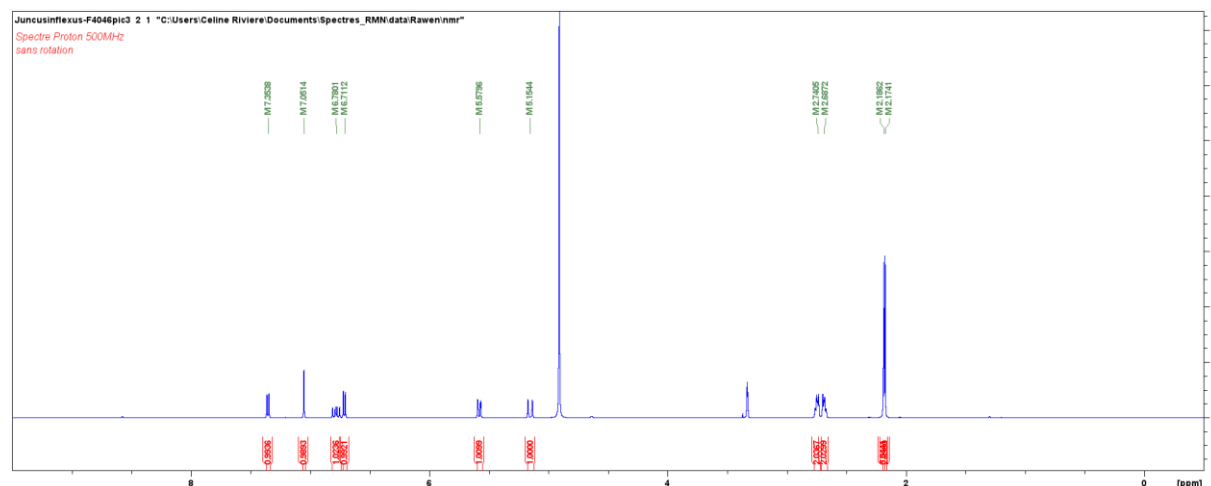
Masse molaire : 266,33 g.mol⁻¹

Formule brute = C₁₈H₁₈O₂

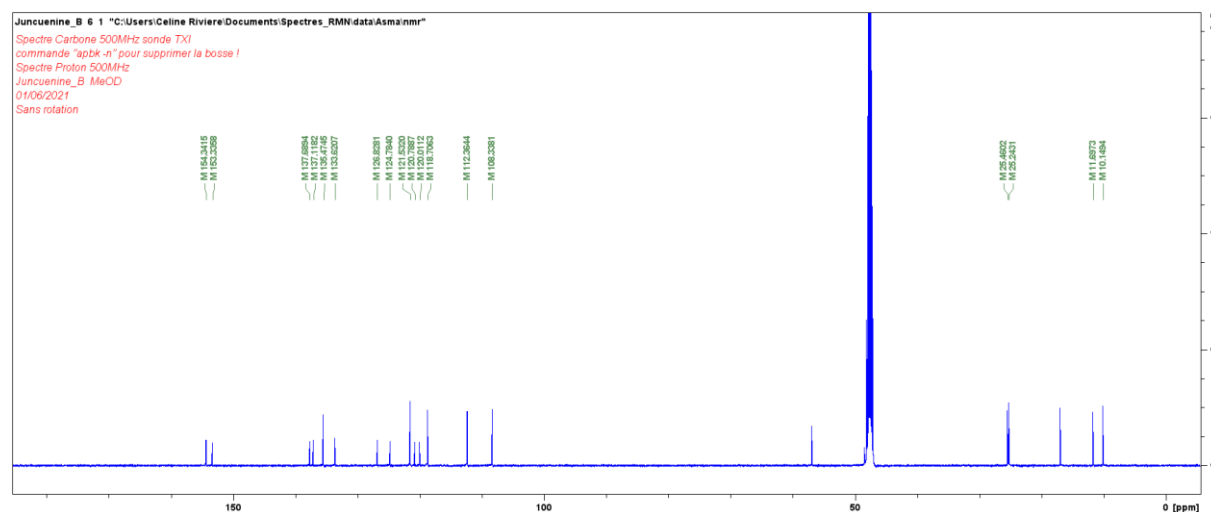
Poudre amorphe blanche ; ESI-MS (ionisation en mode négatif) m/z 265 [M-H]⁻ ; HR-ESI-Orbitrap-MS (ionisation en mode négatif) 265,1233 (calcd. 265,3197 for C₁₈H₁₇O₂ [M-H]⁻) ; spectre RMN ¹H (MeOD, 500 MHz): δ 7,35 (CH, d, J = 8,5 Hz, H-4), 7,05 (CH, s, H-5), 6,78 (CH, dd, J = 18, 11,4 Hz ; H-13), 6,71 (CH, d, J = 8,5 Hz, H-3), 5,58 (CH, dd, J = 11,4, 2,2 Hz, H-14a), 5,15 (CH, dd, J = 18, 2,2 Hz, H-14b), 2,75 (CH₂, m, H-9), 2,69 (CH₂, m, H-10), 2,19 (CH₃, s, H-11), 2,17 (CH₃, s, H-12), et spectre RMN ¹³C (MeOD, 125 MHz): 154,34 (C-2), 153,33 (C-6), 137,69 (C-8), 137,12 (C-1a), 135,47 (C-13), 133,62 (C-5a), 126,83 (C-4a), 124,78 (C-8a), 121,53 (C-4), 120,79 (C-1), 120,01 (C-7), 118,71 (C-14), 112,36 (C-3), 108,34 (C-5), 25,46 (C-9), 25,24 (C-10), 11,70 (C-11), 10,15 (C-12)

Chapitre 3 : Matériels & Méthodes : Phytochimie : RMN des composés phénanthréaniques isolés à partir de *Juncus inflexus*

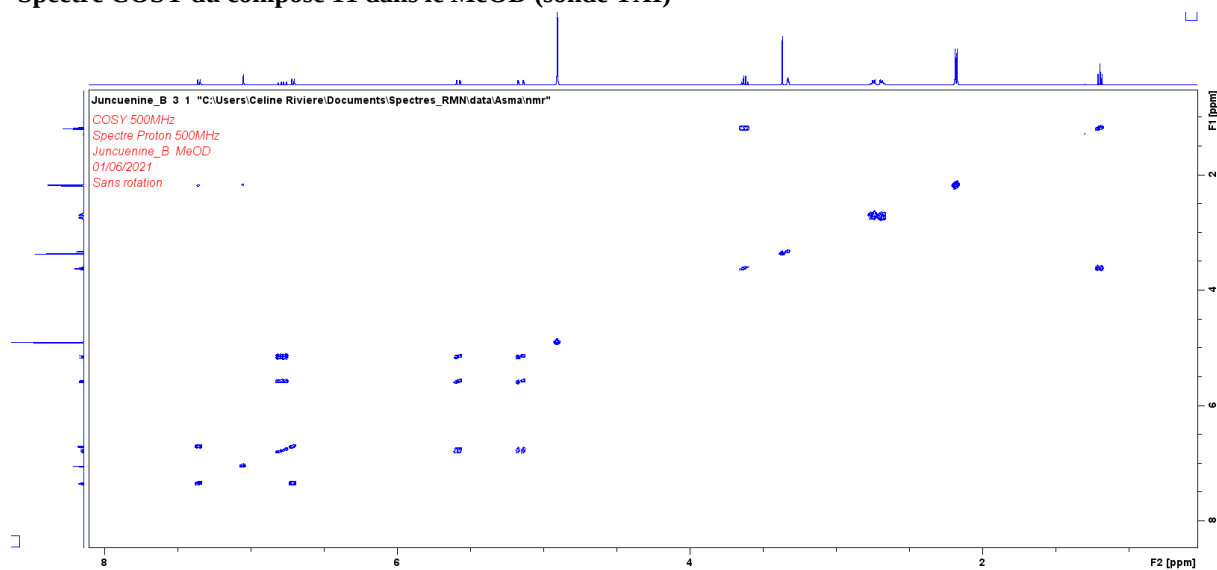
Spectre RMN ^1H du composé 11 dans le MeOD (sonde TXI)



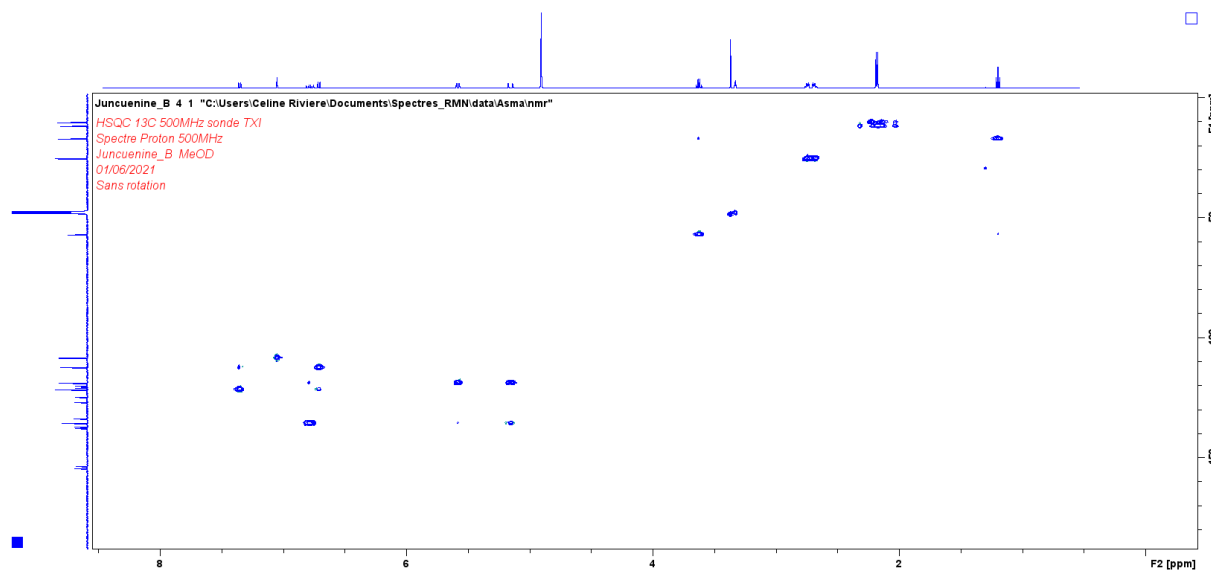
Spectre RMN ^{13}C du composé 11 dans le MeOD (sonde TXI)



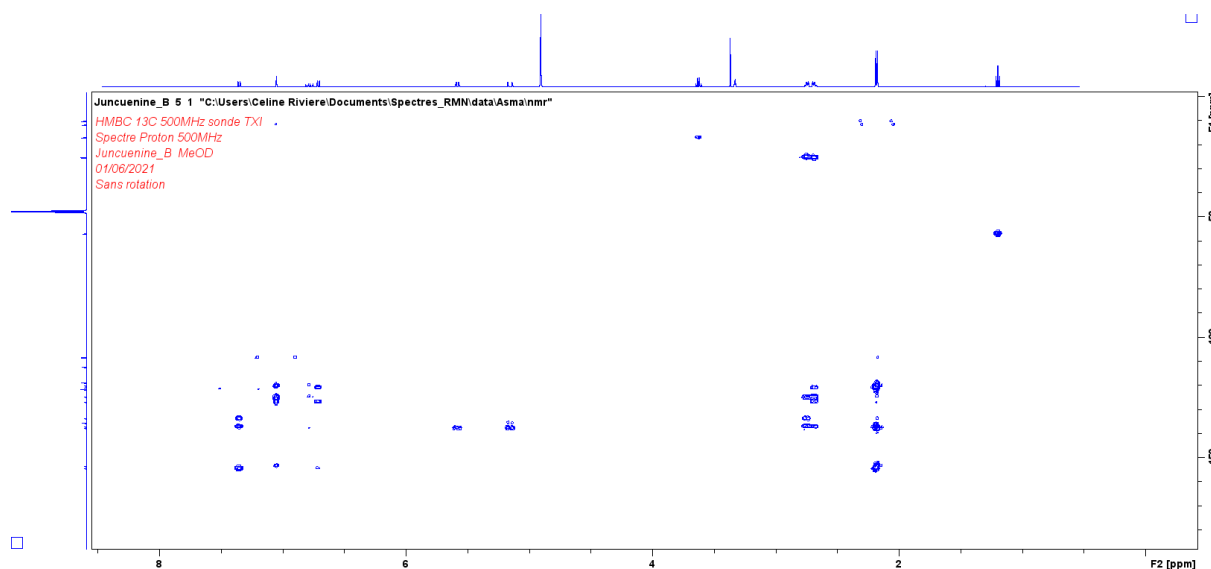
Spectre COSY du composé 11 dans le MeOD (sonde TXI)



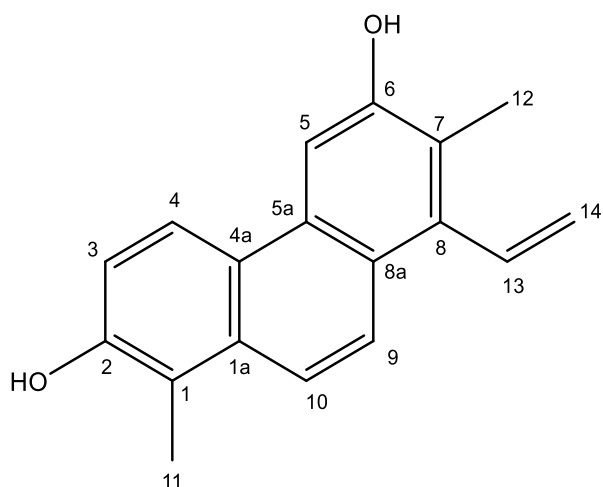
Spectre HSCQ du composé 11 dans le MeOD (sonde TXI)



Spectre HMBC du composé 11 dans le MeOD (sonde TXI)



Composé 12 = dehydrojuncuénine B (= 8-éthényl-1,7-diméthylphénanthrène-2,6-diol)



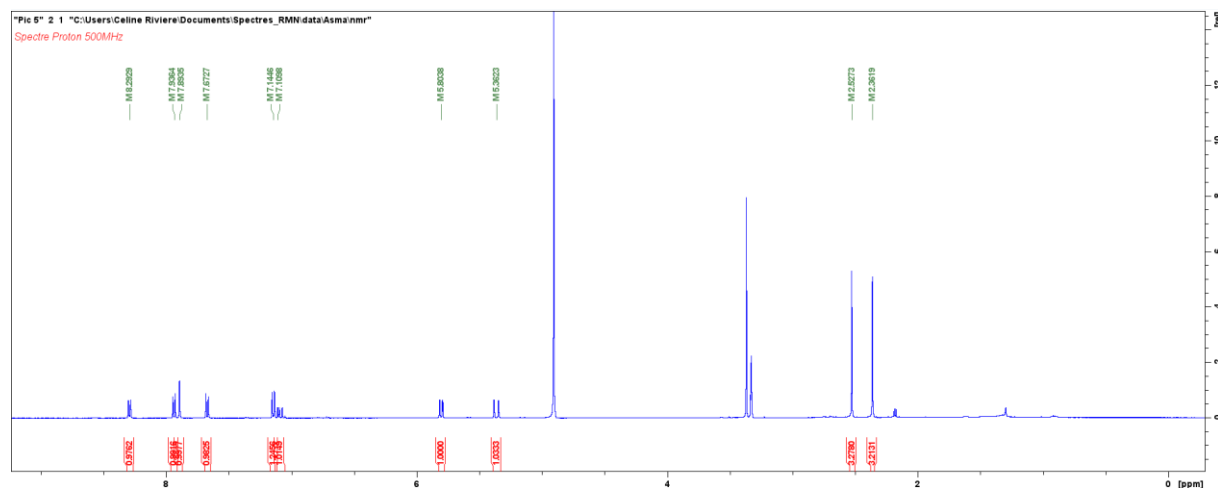
Masse molaire : 264,31 g.mol⁻¹

Formule brute = C₁₈H₁₆O₂

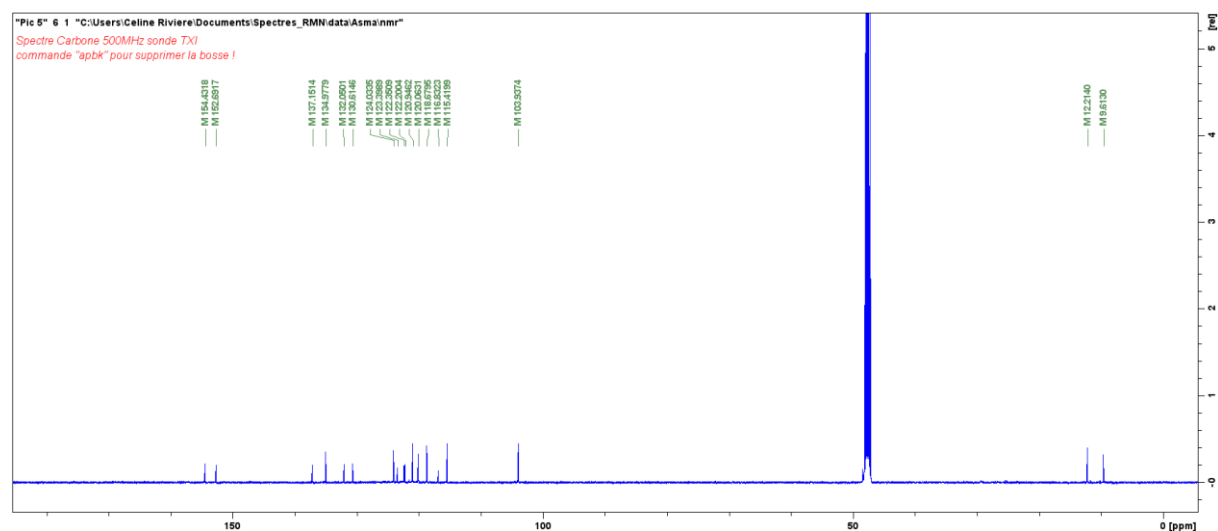
Poudre amorphe blanche ; ESI-MS (ionisation en mode négatif) m/z 263 [M-H]⁻ ; HR-ESI-Orbitrap-MS (ionisation en mode négatif) 263,1076 (calcd. 263,3051 for C₁₈H₁₅O₂ [M-H]⁻) ; spectre RMN ¹H (MeOD, 500 MHz) : δ 8,29 (CH, d, J = 8,9 Hz, H-4), 7,94 (CH, d, J = 9,4 Hz, H-9), 7,89 (CH, s, H-5), 7,67 (CH, d, J = 9,4 Hz, H-10), 7,14 (CH, d, J = 8,9 Hz, H-3), 7,11 (CH, dd, J = 18, 11,5 Hz, H-13), 5,8 (CH, dd, J = 10,5, 2,2 Hz, H-14b), 5,36 (CH, dd, J = 18, 2,2 Hz, H-14a), 2,53 (CH₃, s, H-11), 2,36 (CH₃, s, H-12), et spectre RMN ¹³C (MeOD, 125 MHz) : 154,43 (C-6), 152,69 (C-2), 137,15 (C-8), 134,98 (C-13), 132,05 (C-1a), 130,61 (C-5a), 124,03 (C-9), 123,4 (C-4a), 122,35 (C-8a), 122,2 (C-7), 120,95 (C-4), 120,06 (C-14), 118,68 (C-10), 116,83 (C-1), 115,42 (C-3), 103,94 (C-5), 12,21 (C-12), 9,61 (C-11)

Chapitre 3 : Matériels & Méthodes : Phytochimie : RMN des composés phénanthréniques isolés à partir de *Juncus inflexus*

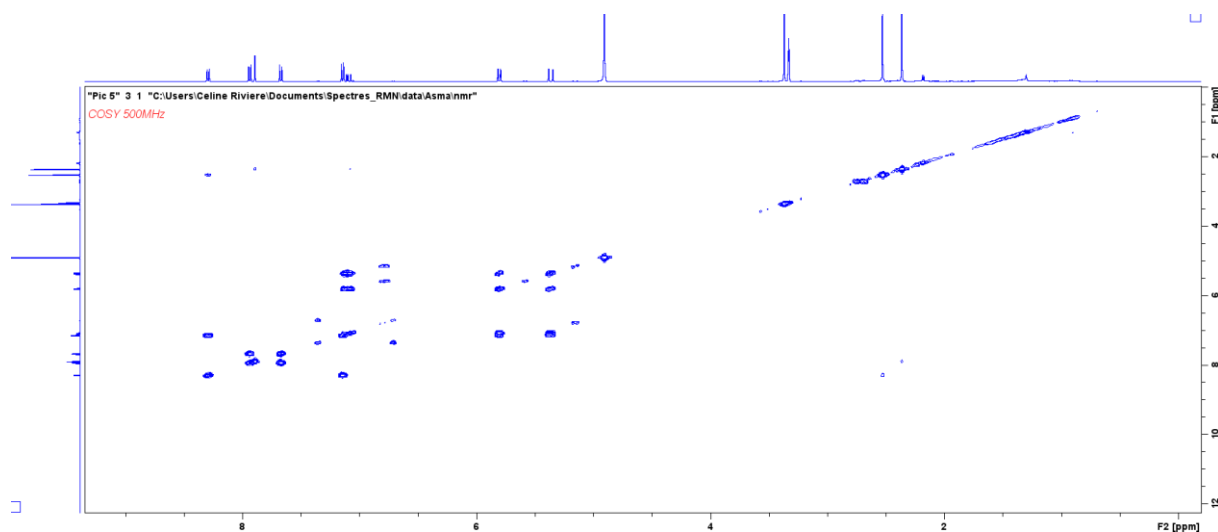
Spectre RMN ^1H du composé 12 dans le MeOD (sonde TXI)



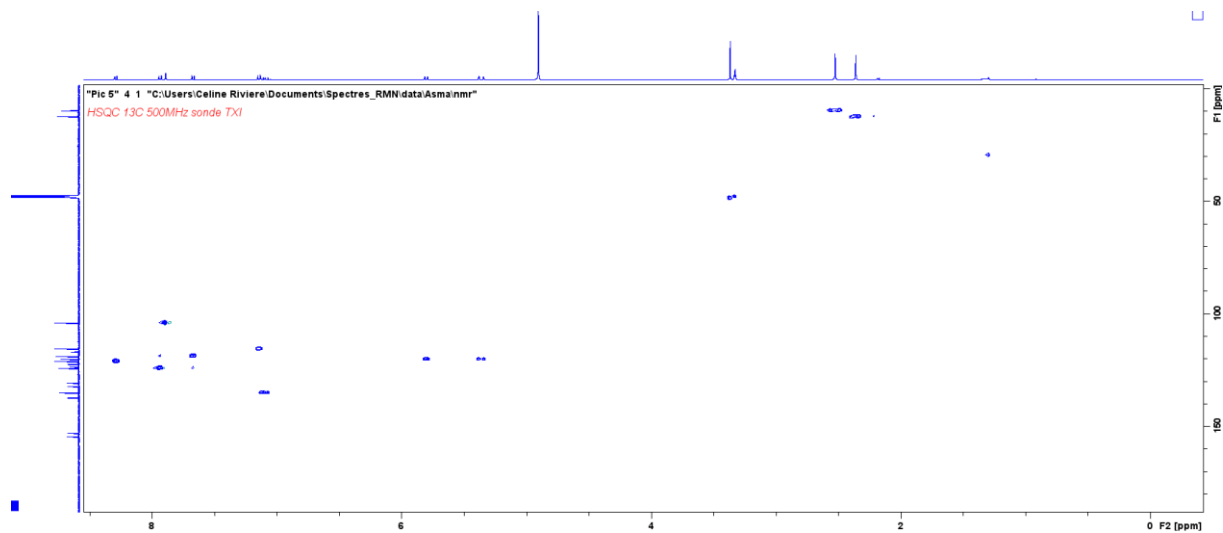
Spectre RMN ^{13}C du composé 12 dans le MeOD (sonde TXI)



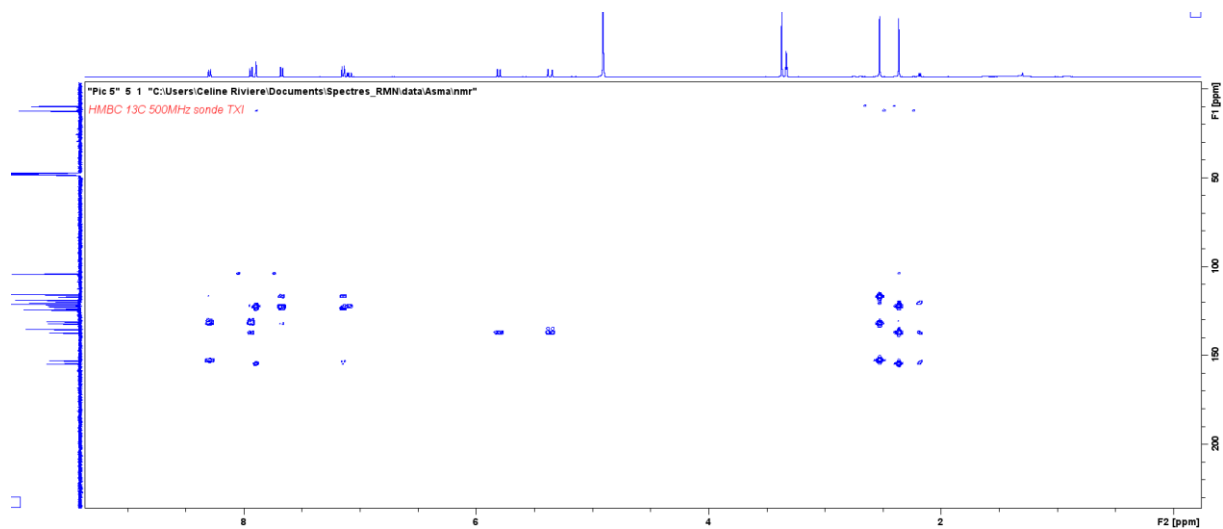
Spectre COSY du composé 12 dans le MeOD (sonde TXI)



Spectre HSCQ du composé 12 dans le MeOD (sonde TXI)



Spectre HMBC du composé 12 dans le MeOD (sonde TXI)



3. Méthodologie employée pour étudier l'activité antivirale contre le coronavirus HCoV-229E et les betacoronavirus

3.1. Cellules et conditions de cultures

La lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain Huh-7 et les lignées cellulaires de rein de singe africain Vero-81 ont été cultivées dans du milieu de culture DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) supplémenté en glutaMAX-I et avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF). Elles ont ensuite été incubées à 37 °C et 5% de CO₂. La lignée cellulaire pulmonaire humaine Calu-3 (ATCC, numéro HTB-55) a été maintenue dans du milieu minimum essentiel (MEM) supplémenté avec 10 % de SVF et de glutaMAX-I.

3.2. Virus

Les souches virales suivantes ont été utilisées : HCoV-229E-Luc recombinant (gracieusement offert par le Pr. Volker Thiel) (van den Worm et al., 2012) ; l'isolat clinique humain SARS-CoV-2 (isolat SARS-CoV-2/human/FRA/Lille_Vero-81-TMPRSS2/2020, NCBI MW575140) et MERS-CoV (MERS-CoV-EMC12, gracieusement offert par le Pr Luis Enjuanes).

3.3. Essai de toxicité cellulaire

Les cellules Huh-7 ont étéensemencées à une densité de 6×10^4 dans des plaques 96 puits puis incubées pendant 16 heures à 37 °C et avec 5 % de CO₂. Les cellules ont été ensuite traitées avec des concentrations croissantes des produits à tester : extraits, sous-extraits, fractions prépurifiées ou composés purs à partir des espèces de *Juncus* et incubées à 37 °C avec 5 % de CO₂ pendant 23 h. Le test de viabilité cellulaire a été effectué selon les recommandations du fabricant en utilisant le kit CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Progema). Son principe est basé sur la réduction d'un sel de tétrazolium MTS [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium] par les cellules viables pour générer un produit de formazan coloré. La mesure de l'absorbance du formazan a été réalisée à $\lambda = 490$ nm à l'aide d'un lecteur de plaque (ELX 808 Bio-Tek Instruments Inc., Charlotte, VT, USA). La lecture des absorbances a été réalisée en triplicata et les expériences ont été répétées au moins 3 fois.

3.4. Évaluation de l'activité antivirale contre le HCoV-229E

La lignée cellulaire d'hépatocarcinome Huh-7, ainsi que les cellules Huh-7 transfectées à l'aide d'un lentivirus codant pour la protéase TMPRSS2 (protéase cellulaire qui permet la fusion du virus à la surface de la cellule hôte), ont été employées pour les tests d'infection par HCoV-229E. Dans un premier temps, les extraits bruts méthanoliques des différentes parties botaniques des espèces de *Juncus* collectées ont été criblés pour leur activité antivirale contre HCoV-229E-Luc exprimant la luciférase (HCoV-229E-Luc ; un HCoV-229E recombinant avec le gène rapporteur de la luciférase). Puis, la même expérience a été réalisée sur l'ensemble des extraits et fractions issus des tiges de *Juncus acutus*. Les cellules Huh-7, déjàensemencées dans des plaques 96 puits, ont été inoculées avec HCoV-229E-Luc en présence de l'échantillon à tester (extrait, sous-extrait, fraction prépurifiée ou composé purifié à partir de tiges de *Juncus acutus*) pendant 1 h. L'inoculum a été ensuite retiré et remplacé par un milieu de culture contenant les échantillons pour une durée de contact égale à 6 h. Enfin, les cellules ont été lysées en ajoutant 20 µL de tampon de lyse Renilla (Promega) et l'activité luciférase a été déterminée à l'aide du kit de dosage de la luciférase Renilla (Promega). Les mesures de cette activité ont été effectuées à l'aide d'un luminomètre Tristar LB941 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Allemagne).

3.5. Test d'infection par le SARS-CoV-2

La lignée cellulaire F1G-red, une lignée cellulaire rapporteuse pour l'infection par SARS-CoV-2, obtenue à partir des cellules Vero-81, a été utilisée pour l'expérimentation. Les cellules F1G-red ont été ensemencées dans des plaques 384 puits à une concentration égale à 4 000 cellules par puits. Le lendemain, ces cellules ont été inoculées avec le SARS-CoV-2 (MOI 0,2) (*Multiplicity Of Infection*) en présence de 50 nM de tariquidar (inhibiteur de P-glycoprotéine) et de doses croissantes en lutéoline (0 ; 1,56 ; 3,13 ; 6,25 ; 12,5 ou 25 µM) ou en GC376, antiviral à large spectre (0 ; 0,125 ; 0,250 ; 0,5 ; 1 ou 2 µM). 16 h après l'inoculation à 37 °C et avec 5% de CO₂, l'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'un microscope confocal automatisé InCell-6500 (Cytiva) et les pourcentages d'infection et le nombre total de cellules ont été évalués comme décrit dans la publication de Desmarets et al., (2022).

3.6. Test d'infection par le MERS-CoV

Les cellules Calu-3, précédemment ensemencées sur des lamelles (24 h avant l'inoculation), ont été inoculées avec le MERS-CoV à une MOI égale à 0,2 en présence de doses croissantes de lutéoline (0 ; 1,56 ; 3,13 ; 6,25 ; 12,5 ou 25 μM) ou de remdesivir (0 ou 5 μM). 16 heures après l'inoculation, les cellules ont été fixées avec 4% de paraformaldéhyde (PFA). Après perméabilisation avec 0,1% de Triton-X100 dans du tampon phosphate salin (PBS) pendant 5 minutes à température ambiante, les cellules ont été incubées avec 10% de sérum normal de chèvre pendant 20 minutes toujours à température ambiante. L'ARN double brin (ARNdb) viral a été visualisé en l'incubant d'abord avec des anticorps monoclonaux de souris anti-ARNdb (clone J2, Scicons) dans du sérum normal de chèvre à 10%, puis avec des anticorps secondaires conjugués IgG anti-souris de chèvre Alexa Fluor® 488. Les noyaux ont été visualisés avec 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI). Pour préserver et stocker les échantillons marqués pendant la manipulation, les lamelles ont été adhérees sur les lames en utilisant le milieu de montage Mowiol®. Les images microscopiques ont été acquises grâce au système d'imagerie EVOS M5000. Le pourcentage de cellules infectées et le nombre total de cellules ont été déterminés avec le logiciel Image J version 1.5i.

4. Méthodologie employée pour étudier l'activité antibactérienne

4.1. Souches bactériennes et levures

Le criblage préliminaire de l'activité antimicrobienne des espèces de *Juncus* a été réalisé sur un panel de 36 souches présélectionnées (2 levures, 18 bactéries à Gram positif et 16 souches bactériennes à Gram négatif) par notre collaboratrice regrettée le Dr Christel Neut (voir la liste présentée dans le **Tableau 24**). La plupart de ces souches pathogènes proviennent d'isolats cliniques.

D'autres souches à Gram positif provenant également d'isolats cliniques ont été ajoutées au cours de l'étude, notamment 6 souches d'*Enterococcus* sp. (*faecalis* et *faecium*), 5 souches de *Streptococcus pyogenes* et 1 souche de *S. aureus* (**Tableau 24**).

Selon leurs besoins en éléments nutritifs, les souches bactériennes ont été maintenues dans des tubes de culture contenant les milieux suivants : MH (*Muller Hinton*) ou BHI (*Brain Heart Infusion*) et WW (*Wilkins-West broth*, nommé désormais *Wilkins-Chalgren broth*) pour les souches *Streptococcus pyogenes*. Les souches utilisées en routine ont été repiquées chaque mois.

Tableau 23. Liste des souches employées durant l'étude

N°		CMI's des antibiotiques et des antifongiques ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				Caractéristique de la souche
Levures						
		AMB	FLC	VRC	SER	
1	<i>Candida albicans</i> 10286	4	32	ND	> 64	
2	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0,5	8	S	64	
Bactéries à Gram positif						
		GEN	VAN	AMX	OXA	
3	<i>Enterococcus faecalis</i> C159-6	4	0,5	64		
4	<i>Enterococcus</i> sp. 8153	2	4	2		Resistance MLSB (résistance à érythromycine et clindamycine et sensibilité à la pristinamycine)
5	<i>Mycobacterium</i> 5003	0,03	0,5	2		

6	<i>Staphylococcus aureus</i> 8146	0,5	2	4		Résistance à la méticilline et kanamycine
7	<i>Staphylococcus aureus</i> 8241	0,5	2	16	S	Résistance à la méticilline, kanamycine, tobramycine et fluoroquinolones
8	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0,25	2	0,125	S	
9	<i>Staphylococcus aureus</i> T28.1	0,5	2	16	R	
10	<i>Staphylococcus aureus</i> T17-4	0,5	2	1		
11	<i>Staphylococcus epidermis</i> T46A1	0,06	2	0,5		
12	<i>Staphylococcus epidermis</i> T19A1	32	2	8		
13	<i>Staphylococcus epidermis</i> T21A5	0,06	2	16		
14	<i>Staphylococcus warneri</i> T12A12	0,06	2	1		
15	<i>Staphylococcus warneri</i> T26A1	0,06	2	0,25		
16	<i>Streptococcus pettenkoferi</i> T47.A6	0,06	2	0,25		
17	<i>Streptococcus agalactiae</i> T38.2	2	0,5	0,06		
18	<i>Streptococcus agalactiae</i> T53C9	1	0,5	0,03		
19	<i>Streptococcus pyogenes</i> 16138	0,125	0,25	0,03		
20	<i>Streptococcus pyogenes</i> 16135	0,125	0,25	0,03		
21	<i>Corynebacterium striatum</i> T40A3	0,03	1	0,25		
Bactéries à Gram négatif						
22	<i>Citrobacter freundii</i> 11041	0,25	> 64	2		Sauvage
23	<i>Citrobacter freundii</i> 10268	NA	NA	NA		KPC-2
24	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,5	> 64	16		
25	<i>Escherichia coli</i> T20A1	0,25	> 64	> 64		

26	<i>Escherichia coli</i> 8138	0,5	> 64	> 64		Production d'une pénicillinase
27	<i>Escherichia coli</i> 8157	0,5	> 64	> 64		Production d'une pénicillinase et résistance aux fluoroquinolones
28	<i>Enterobacter aerogenes</i> 9004	0,5	> 64	> 64		TEM-24
29	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 10270	8	> 64	> 64		VIM
30	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 11016	0,25	> 64	> 64		Sauvage
31	<i>Proteus mirabilis</i> 11060	0,5	> 64	2		Sauvage
32	<i>Proteus mirabilis</i> T28-3	0,5	> 64	1		
33	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 8131	1	> 64	> 64		Sauvage
34	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27583	2	> 64	> 64		
35	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 8129	0,03	> 64	> 64		Résistance de haut niveau aux Céphalosporinases
36	<i>Salmonella sp.</i> 11033	0,25	> 64	2		Sauvage

		GEN	VAN	AMX	OXA	
Souches bactériennes à Gram positif ajoutées au cours de l'étude	<i>Enterococcus faecalis</i> T26B15					
	<i>Enterococcus faecalis</i> T34.2	> 2		1,5		
	<i>Enterococcus faecalis</i> T39C11	S	S	S		
	<i>Enterococcus faecalis</i> T34A4					
	<i>Enterococcus faecium</i> 09001	R	R	R		Multirésistance
	<i>Enterococcus faecium</i> 09002	R	R	R		Multirésistance
	<i>Streptococcus pyogenes</i> 16102			R		
	<i>Streptococcus pyogenes</i> 16114			R		
	<i>Streptococcus pyogenes</i> 16137			R		

	<i>Streptococcus pyogenes</i> 16139			R		
	<i>Streptococcus pyogenes</i> 16140			R		
	<i>Staphylococcus aureus</i> T25.10	S	S	R	R	

Amphotéricine B (AMB) : $S \leq 1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $R > 1 \mu\text{g.mL}^{-1}$; Amoxicilline (AMX) : $S \leq 4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $R > 16 \mu\text{g.mL}^{-1}$; Fluconazole (FLC) : $S \leq 2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $I = 4$ et $R > 4 \mu\text{g.mL}^{-1}$; Gentamicine (GEN) : $S \leq 4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $R > 8 \mu\text{g.mL}^{-1}$; Sertaconazole (SER) : points critiques cliniques (*clinical breakpoints*) non déterminés ; Vancomycine (VAN) : $S \leq 4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $R > 16 \mu\text{g.mL}^{-1}$; Voriconazole (VRC) : $S \leq 0,06$ et $I \in [0,125-0,25]$ et $R > 0,25$ (EUCAST, 2023) et Oxacilline (OXA) : $S \leq 2$ et $R > 2$ (Cavallo et al., 2005 ; EUCAST, 2019 ; EUCAST 2023)

NA : non actif ; ND : non déterminé ; S : sensible ; I : intermédiaire ; R : résistant

KPC-2 (*Klebsiella pneumoniae* carbapénémase-2) : est une carbapénémase de classe A, TEM-24 (Temoneira-24) : est une variante des enzymes TEM qui appartiennent à la classe A des β -lactamases, VIM (Verona integron-encoded metallo- β -lactamases) : ce sont des β -lactamases de classe B, Céphalosporinases de haut niveau (= céphalosporinases de type AmpC de haut niveau) : sont des β -lactamases de classe C

4.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

4.2.1. Détermination des CMI des extraits bruts méthanoliques et des sous-extraits de *J. acutus* et *J. inflexus* par la méthode de dilution en milieu solide sur agar (méthode de Steers)

La veille de l'expérience, les 36 souches bactériennes sélectionnées ont été repiquées dans les milieux de culture adéquat (MH, BHI, MHA en pente et WW) puis incubées à 37 °C. Les extraits bruts méthanoliques et les sous-extraits (CH_2Cl_2 , AcOEt, Aq) de *J. inflexus* et *acutus* ont été solubilisés dans du méthanol de qualité analytique pour obtenir une gamme de concentrations allant de 1250 à 78,125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (dilution au demi en série). Ensuite, 1 mL de chacune de ces concentrations a été mélangée à 20 mL de milieu MHA liquéfié dans un tube Falcon de 25 mL puis, le tout a été versé dans une boîte de Pétri. Les concentrations finales testées sont : 0,625 ; 0,313 ; 0,156 ; 0,078 et 0,04 mg.mL^{-1} . Pour cette expérience, 2 témoins ont été préparés : un témoin de stérilité contenant uniquement du milieu MHA, et un témoin négatif contenant 1 mL de MeOH, solvant utilisé pour les dilutions des extraits et sous-extraits, et 20 mL du milieu MHA. Ce dernier témoin permet de s'assurer que le solvant utilisé à une proportion égale à 5% n'engendre pas d'effets sur la croissance bactérienne. Les 36 souches bactériennes sont préalablement diluées dans une solution de Ringer cystéiné (RC) (Merck®, France) à une concentration d'environ 10^5 UFC.mL^{-1} . Puis, une fois que le milieu d'agar contenant les solutions d'extraits/sous-extraits est complètement solidifié, les souches sont déposées à l'aide

d'un inoculateur à têtes multiples appelé aussi appareil de Steers (Mast Laboratory™, UK). Après 24 h d'incubation à 37 °C, les valeurs de CMI ont été déterminées visuellement en observant la présence ou l'absence de colonies bactériennes à la surface de la gélose dans les différentes boîtes de Pétri. La CMI correspond ainsi à la plus faible concentration d'extraits ou de sous-extraits inhibant la croissance bactérienne.

4.2.2 Détermination des CMIs du sous-extrait CH₂Cl₂, des fractions prépurifiées et des composés phénanthréniques isolés à partir des rhizomes de *J. inflexus*, par la méthode de microdilution en milieu liquide

La méthode de microdilution en milieu liquide, réalisée en microplaque 96 puits (Nest, Grosseron™, France), a été utilisée pour déterminer les valeurs de la CMI du sous-extrait CH₂Cl₂ des rhizomes de *J. inflexus*, des différentes fractions prépurifiées par CPC, et des composés purifiés par HPLC préparative ayant des pourcentages de pureté $\geq 95\%$.

Dans un premier temps, des dilutions successives au demi ont été préparées dans du MeOH de qualité analytique pour chaque échantillon à tester afin d'obtenir des concentrations finales variant de 1250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ à 0,61 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Ensuite, 180 μL de milieu de culture MH ou WW (selon la souche bactérienne testée) ont été déposés dans chaque puit de la microplaque 96 puits. 10 μL de chaque dilution du sous-extrait CH₂Cl₂/fraction/composé phénanthrénique purifié ont été ajoutés dans les puits correspondants, suivis de 10 μL de suspensions bactériennes ajustées à $10^5 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$, afin d'obtenir un volume final de 200 μL dans chaque puits de la microplaque. Pour chaque expérience, 3 témoins ont été systématiquement inclus : le premier est un témoin de croissance (190 μL de milieu de culture + 10 μL de la suspension bactérienne testée), le second est un témoin de stérilité (200 μL de milieu de culture) et le dernier est un témoin de solvant (180 μL de milieu de culture + 10 μL du solvant utilisé pour la réalisation des dilutions des différents échantillons (MeOH dans notre cas) + 10 μL de la suspension bactérienne).

Après 24 h d'incubation à 37 °C, les valeurs de CMIs ont été déterminées visuellement à l'œil nu puis confirmées par l'addition de 30 μL /puits de solution de *p*-iodonitrotetrazolium Violet (INT), préparée à 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans de l'H₂O distillée, (E. Merck, Darmstadt, Allemagne). L'INT est un révélateur d'activité enzymatique ; en cas de croissance bactérienne, la couleur initialement jaune de l'INT vire vers le violet après chauffage à 55 °C pendant 15 min. La concentration inhibant complètement la croissance bactérienne (le premier puits clair) a été considérée comme la valeur de la CMI.

4.3. Détermination des concentrations minimales bactéricides (CMBs)

La détermination de la CMB est un test complémentaire, généralement effectué après les expériences de détermination des valeurs de la CMI par la méthode de microdilution en milieu liquide et avant l'ajout de l'INT dans les différents puits. La CMB correspond à la concentration la plus faible qui inhibe complètement la croissance bactérienne. En pratique, 100 μ L ont été prélevés depuis les puits clairs, c'est-à-dire depuis le puit correspondant à la CMI (déterminée visuellement), ainsi que depuis les puits au-dessus de la valeur de la CMI. Ces 100 μ L sont ensuite déposés sur des boîtes de Pétri contenant du milieu MHA ou Columbia selon la souche bactérienne testée. Après 24 h d'incubation à 37 °C, les valeurs de la CMB sont déterminées ; elles correspondent aux boîtes de Pétri où il n'y a pas de croissance bactérienne.

Une fois les valeurs des CMIs et des CMBs obtenues, les rapports CMB/CMI peuvent être calculés. Lorsque $\text{CMB/CMI} \leq 4$, l'effet antimicrobien est qualifié de bactéricide alors que lorsque $\text{CMB/CMI} > 4$, l'effet antimicrobien est considéré bactériostatique (Davis, 2018 ; Levison, 2004).

4.4. Kill-time assay ou courbes de croissance

Le *kill-time assay* permet de suivre dans le temps la croissance d'une population bactérienne donnée en présence de différentes concentrations d'un composé antibactérien. De plus, à travers cette expérience, des informations quant à l'effet de l'antibactérien étudié sont fournies : effet bactéricide ou bactériostatique. Dans notre étude, seul l'effet antibactérien du juncusol et de la juncuénine B a été testé.

Des solutions-mères 20 fois plus concentrées que la concentration finale souhaitée (CMI/4, CMI/2, CMI, CMI $\times$ 2, CMI $\times$ 4, et dans le cas de la juncuénine B CMI $\times$ 8) ont été préparées dans du MeOH de qualité analytique pour chaque composé à tester. Ainsi, un tube de culture a été attribué à chacune de ces concentrations. Dans un premier temps, 8,5 mL de milieu BHI ou WW ont été déposés dans les différents tubes de culture. Puis, 1 mL de suspension bactérienne, préalablement ajustée à 10^6 UFC.mL⁻¹ dans du CR, a été ajouté, suivi de 0,5 mL de chaque solution-mère. Un tube de culture correspondant au témoin de solvant (témoin négatif) a été également inclus dans l'expérience. Dans ce dernier, 0,5 mL du solvant utilisé (MeOH) a remplacé les 0,5 mL de la solution-mère du composé étudié. Enfin, les tubes de culture ont été

incubés à 37 °C pendant 48 h et les bactéries ont été dénombrées toutes les 2 h jusqu'à 8 h, puis à 24 h et à 48 h.

Tout d'abord, afin de quantifier l'inoculum de départ (UFC.mL⁻¹) un dénombrement T₀ h a été réalisé. Pour ce faire, 200 µL de la suspension bactérienne à 10⁶ UFC.mL⁻¹ (celle utilisée pour les différents tubes de culture) ont été prélevés. 100 µL de ces 200 µL ont été placés dans une boîte de Pétri contenant déjà du milieu de culture (MHA ou Columbia) et les 100 µL restants ont été soumis à des dilutions successives au 10^{ème} dans du RC. De chacune de ces dilutions, 100 µL ont été prélevés et étalés dans des boîtes de Pétri.

Les dilutions au 10^{ème} ont été effectuées de la manière suivante :

- 1^{ère} dilution : 100 µL du tube de culture dans 900 µL de RC
- 2^{ème} dilution : 500 µL de la 1^{ère} dilution dans 4,5 mL de RC
- 3^{ème} dilution : 100 µL de la 2^{ème} dilution dans 9 mL de RC
- et ainsi de suite...

Le nombre de dilutions à effectuer a été décidé au fur et à mesure de l'expérience car en cas de turbidité importante dans les tubes de culture, des dilutions supplémentaires seront nécessaires. Après 24 h d'incubation à 37 °C, les colonies bactériennes ont été comptées depuis les boîtes de Petri où le nombre de colonies semble être compris entre 15 et 150. Puis, à partir de ces données et en tenant compte de la dilution effectuée, les concentrations bactériennes ont été déterminées en convertissant les différentes valeurs déjà obtenus en log₁₀ (UFC.mL⁻¹). La même procédure a été appliquée pour les comptages à 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 24 h et 48 h. Enfin, les résultats du *kill-time assay* ont été présentés sous forme de courbes de croissance sur un graphique où log₁₀(UFC.mL⁻¹) = f (temps (h)). Le seuil de détection a été fixé à 1 log₁₀ (UFC.mL⁻¹).

4.5 Évaluation de synergies d'association des composés phénanthréniques purifiés par la méthode de l'échiquier (*checkerboard method*)

La méthode de l'échiquier, méthode de référence, a été utilisée pour évaluer toutes les combinaisons possibles entre 2 composés testés à différentes concentrations et déterminer l'association la plus efficace. Dans notre étude, des associations dérivé phénanthrénique – dérivé phénanthrénique ainsi que dérivé phénanthrénique – antibiotique ont été évaluées contre l'isolat clinique *S. aureus* T28.1. La ciprofloxacine (CIP) (pureté = 99,9%, PanReac AppliChem®, Allemagne), la gentamicine (GEN) (Gibco™, Royaume-Uni), l'oxacilline (OXA) (pureté = 95%, Acros Organics®, Belgique) et la rifampicine (RIF) (pureté = 99,2%, PanReac AppliChem®, Allemagne) ont été sélectionnées car elles appartiennent à différentes

classes d'antibiotiques (différents mécanismes d'action) et elles sont actuellement utilisées pour traiter les infections à *S. aureus* et les infections osseuses.

Les expériences ont été réalisées dans des microplaques 96 puits selon la configuration 8×8 . Des dilutions successives au demi ont été préparées à l'avance dans du MeOH de qualité analytique pour chaque composé phénanthrénique afin d'obtenir des concentrations finales variant de CMI/16 à CMI $\times 8$ au sein des microplaques 96 puits : $[156,25 - 1,22] \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour le juncusol et $[78,13 - 0,61] \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour le 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol et la juncuénine B.

Les solutions-mères et les dilutions des différents antibiotiques ont été, à leur tour, préparées dans de l' H_2O distillée stérilisée avec parfois l'ajout de quelques μL d'acide chlorhydrique HCl, notamment dans le cas de la CIP et la RIF pour aider à leur solubilité. Les gammes de concentrations finales pour chaque antibiotique sont ainsi les suivantes : $[0,5 - 64] \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour la CIP, $[0,006 - 0,78] \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour la GEN, $[0,125 - 16] \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour l'OXA et $[0,0003 - 0,048] \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour la RIF.

100 μL du milieu nutritif BHI ont été déposés dans les puits. Puis, 10 μL de chacune des dilutions préparées pour le premier composé (composé A, **Figure 58**) ont été déposés dans les puits correspondants : la concentration la plus élevée du composé A a été placée sur la 1^{ère} ligne de la microplaque et la concentration la plus faible a été introduite sur la dernière ligne. De même, 10 μL de chacune des dilutions préparées pour le second composé (composé B, **Figure 58**) ont été déposés dans les puits correspondants : la concentration la plus élevée du composé B a été mise sur la 8^{ème} colonne de la microplaque et la concentration la plus faible a été mise sur la 1^{ère} colonne. Ensuite, 80 μL de la suspension bactérienne, préalablement ajustée à 10^5 UFC.mL^{-1} dans du RC, ont été ajoutés. Pour chaque expérience, 3 témoins ont été inclus de la même façon que pour l'expérience de détermination des CMI par la méthode de microdilution en milieu liquide. De plus, au sein du schéma de la microplaque dédiée à l'évaluation de synergies d'association (**Figure 58**), une vérification des valeurs de CMI des composés testés (dérivés du phénanthrène et antibiotiques) contre *S. aureus* T28.1 a été rajoutée au niveau des 2 dernières colonnes (11^{ème} et 12^{ème} colonnes). Après 24 h d'incubation à 37 °C et sous agitation (60 rpm), la croissance bactérienne a été déterminée comme expliqué précédemment, visuellement à l'œil nu et avec l'ajout de l'INT. L'association la plus active a finalement été déterminée en calculant l'indice de concentration fractionnaire (FIC : *Fractional Inhibitory Concentration Index*) selon l'équation définie par (Hsieh et al., 1993) :

$$FIC\ index = FIC_{composé\ A} + FIC_{composé\ B} = \frac{(A)}{CMI_A} + \frac{(B)}{CMI_B}$$

où (A) est la concentration du composé A dans un puit donné au niveau de l'interface croissance-non croissance, CMI_A est la valeur de la CMI du composé A seul contre le microorganisme testé. (B) et CMI_B est défini de la même manière pour le composé B.

Les valeurs de FIC index sont interprétées de la manière suivante : l'effet est synergique quand $FIC < 0.5$, additif quand $0.5 \leq FIC \leq 1$, indifférent quand $1 < FIC \leq 4$, ou antagoniste quand $FIC > 4$ (Bonapace et al., 2002).

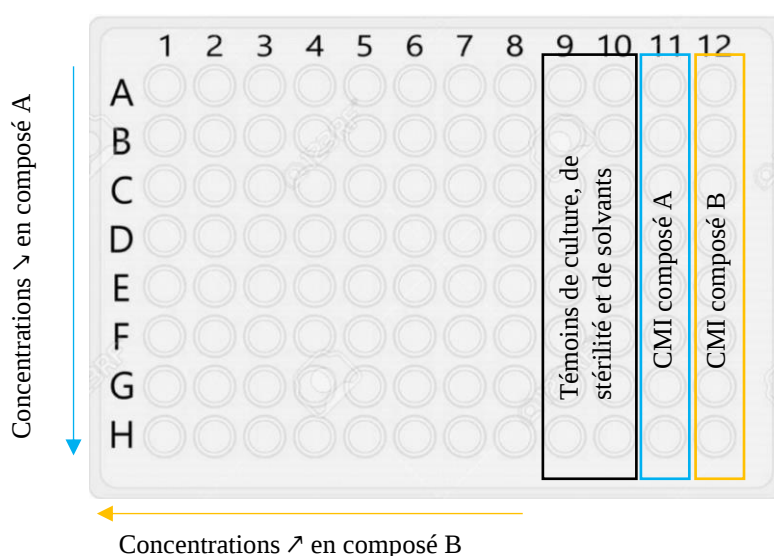


Figure 58. Schéma de la microplaque de test de synergies d'association avec la méthode de l'échiquier (*checkerboard method*), encadré noir : colonnes dédiées aux différents témoins, encadré bleu : colonnes dédiées à la détermination de la CMI du composé A, flèche bleue : concentrations décroissantes des composés A, encadré orange : colonnes dédiées à la détermination de la CMI du composé B, flèche orange : concentrations croissantes du composé B

4.6. Détermination de l'effet post-antibiotique (EPA)

L'évaluation de l'effet post-antibiotique est un test qui permet de quantifier la reprise de croissance différée d'une population bactérienne après une exposition transitoire à un antimicrobien (MacKenzie et Gould, 1993). Les tubes de culture pour chaque concentration du composé à tester (juncusol [$CMI/4 - CMI \times 4$] et juncuénine B [$CMI/4 - CMI \times 8$]) ont été préparés de façon assez similaire à l'expérience de *kill-time assay* (**Chapitre 3 partie 4.4**). La seule différence réside dans le fait que la suspension bactérienne de *S. aureus* T28.1 utilisée n'a

pas été diluée ; elle est utilisée à 10^8 UFC.mL⁻¹. Les différents tubes de culture ont été incubés pendant 2 h à 37 °C. Un premier dénombrement T_{-2h} (avant pré-traitement) a été réalisé dans le but de quantifier l'inoculum de départ (UFC.mL⁻¹) et ceci en prélevant 200 µL de la suspension bactérienne de l'isolat clinique *S. aureus* T28.1 à 10^5 UFC.mL⁻¹ (celle utilisée pour les différents tubes de culture). 100 µL de ces 200 µL ont été placés dans une boîte de Pétri contenant déjà du milieu de culture MHA et les 100 µL restants ont été soumis à des dilutions successives au 10^{ème} dans du RC. De chacune de ces dilutions, 100 µL ont été prélevés et étalés dans des boîtes de Pétri. Après 2 h d'incubation, l'inactivation du composé testé dans les différents tubes de culture a été achevée en effectuant une dilution au 1000^{ème} dans des nouveaux tubes de culture contenant du milieu BHI : 10 µL dans 9,990 mL. Un tube de culture correspondant au témoin de solvant (témoin négatif) a été également inclus dans l'expérience. Ce dernier a été également dilué de la même manière à titre comparatif. Juste après l'étape d'inactivation, un dénombrement T_{0h} a été réalisé pour chaque nouveau tube de culture. Ensuite, les nouveaux tubes de culture ont été incubés à l'étuve à 37 °C. Des dénombrements ont été effectués à 30 min, puis toutes les heures jusqu'à 7h et enfin à 24 h. Les résultats de l'effet post-antibiotique ont été traités de la même façon que pour le *kill-time assay*. Après traçage des différentes courbes, l'effet post-antibiotique de chaque condition testée a été estimé, graphiquement (à partir des phases de croissance exponentielle), par comparaison avec le tube de culture témoin (témoin de solvant) en utilisant la formule suivante :

$$\text{Effet post-antibiotique (EPA)} = T - C$$

où T est le temps nécessaire pour que la population bactérienne augmente d'1 log₁₀ (UFC.mL⁻¹) à une concentration donnée et C est le temps nécessaire pour que la population bactérienne croît d'1 log₁₀ (UFC.mL⁻¹) dans le tube témoin.

4.7. Évaluation de l'activité anti-biofilm des composés phénanthréniques

L'évaluation de l'activité anti-biofilm des dérivés phénanthréniques, purifiés (juncusol, 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol, et juncuénine B) à partir des rhizomes de *J. inflexus*, a été réalisée sur l'isolat clinique *S. aureus* T28.1. Des travaux antérieurs, menés dans le laboratoire de notre regrettée collaboratrice Dr. Christel Neut, sur cette souche bactérienne ont montré qu'elle était productrice de biofilm. Elle exprime en effet les gènes codant pour les enzymes nécessaires à la synthèse de la capsule polysaccharidique

(capH5, capJ5, capK5) ainsi que les protéines d'adhésion (icaA, icaC, icaD) nécessaires à l'adhérence des bactéries entre elles.

Le pouvoir anti-biofilm des composés phénanthréniques a été à la fois évalué sur l'inhibition de formation du biofilm ainsi que sur la destruction du biofilm de *S. aureus* T28.1 déjà formé. Ces tests ont été évalués de deux manières : sur surface inerte et sur un support traité à l'hydroxyapatite (= substitut osseux synthétique) pour s'approcher des conditions réelles car la souche *S. aureus* T28.1 étudiée provient d'une ostéite de pied diabétique.

4.7.1. En microplaques de polystyrène 96 puits (surface inerte)

4.7.1.1. Inhibition de la formation du biofilm

Des solutions-mères 20 fois plus concentrées que la concentration finale souhaitée (CMI/4, CMI/2, CMI, $\text{CMI} \times 2$, $\text{CMI} \times 4$ et dans le cas du 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol et de la juncuénine B jusqu'à $\text{CMI} \times 8$) ont été préparées dans du MeOH de qualité analytique pour chaque composé à tester. 180 μL de milieu nutritif BHI enrichi en glucose (10 mg.mL^{-1}) ont été d'abord déposés. Ensuite, 10 μL de chaque solution-mère des dérivés phénanthréniques à tester (juncusol, 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol et juncuénine B) ont été ajoutés dans les puits correspondants. Enfin, 10 μL de suspension bactérienne de *S. aureus* T28.1, préalablement ajustée à 10^5 UFC.mL^{-1} , ont été déposés. 3 témoins ont été systématiquement inclus au cours de ces expériences : le premier est un témoin de formation du biofilm (190 μL de milieu de culture + 10 μL de la suspension bactérienne), le second est un témoin de stérilité (200 μL du milieu de culture) et le dernier est un témoin de solvant (180 μL de milieu de culture + 10 μL du solvant utilisé pour la réalisation des dilutions des différents échantillons (MeOH dans notre cas) et 10 μL de la suspension bactérienne (**Figure 59**).

Après 24 h d'incubation à 37 °C, les puits ont été méticuleusement vidés à l'aide d'une micropipette multicanaux de façon à ne pas percer les biofilms déjà formés au fond des puits. Ces puits ont été ensuite lavés 3 fois avec 200 μL d'une solution de PBS (pH = 7,4) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) afin d'enlever les bactéries n'ayant pas adhérentes. Les puits ont été séchés afin de fixer les bactéries de *S. aureus* T 28.1 adhérentes et ceci en mettant la microplaque sur une plaque chauffante pendant 30 min sans le couvercle. 150 μL d'une solution de cristal violet (= violet de gentiane), préparée dans du MeOH à 20 mg.mL^{-1} , ont été ajoutés dans les puits utilisés puis retirés au bout de 15 min. La microplaque a été rincée à l' H_2O

plusieurs fois pour enlever l'excédent du cristal violet puis séchée. Enfin, 150 μL d'EtOH/puit ont été ajoutés pour solubiliser le cristal violet qui restait fixé aux peptidoglycanes des bactéries adhérentes au fond des puits. Finalement, les valeurs de densité optique (DO) pour chaque puit ont été mesurées à $\lambda = 570 \text{ nm}$ à l'aide d'un spectrophotomètre.

Remarque : Si la DO dépasse la valeur de 1, une dilution au 100^{ème} a été réalisée dans une nouvelle microplaque, et ceci en prélevant 20 μL de chacun des puits de l'ancienne microplaque et en complétant avec 180 μL d'EtOH. Une nouvelle lecture a été ainsi réalisée au spectrophotomètre.

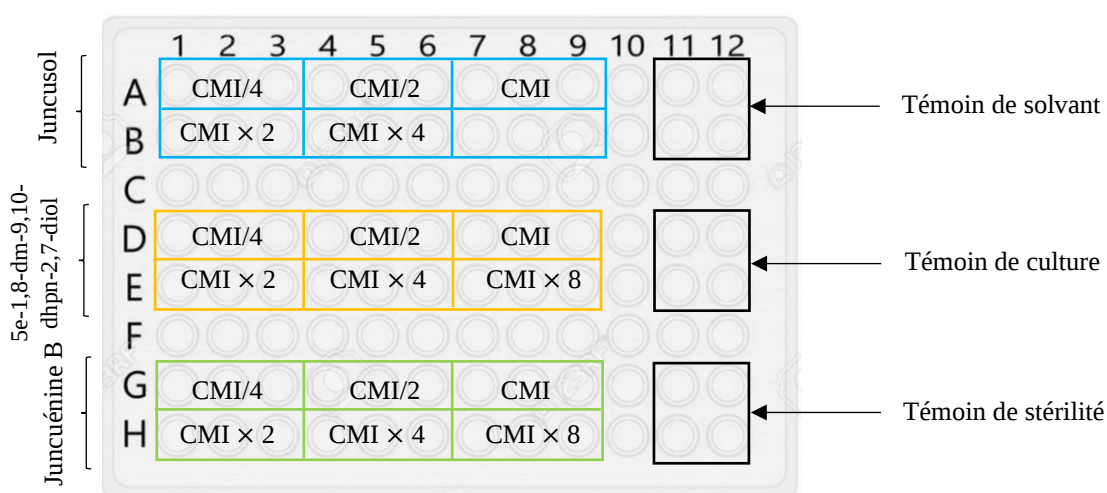


Figure 59. Schéma de la microplaque pour l'évaluation de l'activité anti-biofilm des composés phénanthréniques isolés à partir des rhizomes de *J. inflexus*

4.7.1.2. Destruction du biofilm

Afin de pouvoir évaluer le potentiel des dérivés phénanthréniques à détruire le biofilm de *S. aureus* T28.1, une mise en culture du biofilm a été effectuée en déposant 190 μL du milieu BHI enrichi en glucose (10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) dans les puits correspondants de la microplaque avec 10 μL de suspension bactérienne de *S. aureus* T 28.1, préalablement ajustée à $10^5 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$. Après 24 h d'incubation à 37 °C, les puits ont été délicatement vidés et lavés au PBS (200 μL , 3 fois) à l'aide d'une micropipette multicanaux, tout en faisant attention au tapis bactérien formé. Ensuite, le biofilm a été mis en contact avec les composés phénanthréniques, préparés à différentes concentrations comme précédemment décrit : 10 μL de chaque concentration/puit + 190 μL de milieu BHI enrichi en glucose. La microplaque a été, de nouveau, incubée à 37 °C

pendant 24 h. Les étapes de révélation et de lecture ont été réalisées exactement de la même manière que pour l'évaluation de l'inhibition de la formation du biofilm.

4.7.2. En inoculateur de biofilms recouvert d'hydroxyapatite

Les mêmes expériences que celles réalisées pour évaluer l'activité anti-biofilm des composés phénanthréniques isolés à partir des rhizomes de *J. inflexus* ont été reproduites sur un substitut osseux synthétique. Pour ces expériences, des microplaques 96 puits spécifiques, fournies avec un couvercle sur lequel des picots recouverts d'hydroxyapatite sont greffés, ont été employées : MBEC Assay® Biofilm Inoculator (Edmonton, Alberta, Canada). Ce couvercle sert de support pour la fixation du biofilm formé.

4.7.2.1. Inhibition de la formation du biofilm

Les mêmes étapes décrites dans le **Chapitre 3 partie 4.7.1.1** ont été reproduites au sein de l'inoculateur de biofilm. La seule différence est que l'incubation a été réalisée à 37 °C sous agitation (60 rpm).

4.7.2.2. Destruction de biofilm

Tout d'abord, une suspension bactérienne de *S. aureus* T28.1 a été ajustée à 10^5 UFC.mL⁻¹ dans du milieu BHI enrichi en glucose. Ensuite, 150 µL (volume déjà calibré par le fournisseur) de cette suspension ont été déposés dans les puits de la microplaque (Biofilm Inoculator). La microplaque a été ensuite incubée à l'étuve à 37 °C pendant 48 h et sous agitation (60 rpm). Le jour de l'évaluation du potentiel des composés phénanthréniques à détruire le biofilm de *S. aureus* T28.1 déjà formé, une nouvelle microplaque 96 puits a été préparée selon le schéma décrit précédemment (**Figure 59**) (190 µL de milieu BHI enrichi en glucose + 10 µL de chaque concentration), puis mise de côté. Une 2^{ème} nouvelle microplaque, servant pour le rinçage des picots du couvercle du Biofilm Inoculator, a été préparée en mettant 200 µL de PBS dans chaque puit. Les picots du couvercle ont été rincés délicatement en plongeant le couvercle pendant 10 secondes dans la microplaque de rinçage afin d'éliminer les bactéries n'ayant pas adhérees au biofilm. Cette opération a été réalisée deux fois. Ensuite, le couvercle a été placé sur la microplaque contenant les différentes concentrations des composés phénanthréniques et l'ensemble a été incubé à 37 °C pendant 24 h et sous agitation (60 rpm). Après 24 de contact avec les composés phénanthréniques, le couvercle a été placé sur une nouvelle microplaque

contenant du PBS (200 μ L/puit) et l'ensemble a été mis dans un bain à ultrasons pendant 5 min pour pouvoir récupérer le biofilm de *S. aureus* T28.1 restant après traitement. La turbidité a été ainsi déterminée dans chaque puit en mesurant la DO à $\lambda = 570$ nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

4.7.3. Analyse statistique des données de l'activité anti-biofilm

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SPSS version 13.0 moyennant les tests d'ANOVA puis de Duncan pour la détermination des différences significatives entre les moyennes des groupes et ceci en se basant sur l'analyse de la variance. Le risque p a été fixé à 0,05.

5. Formulation topique : hydrogel de chitosane/cyclodextrine/juncusol

5.1. Matériels

Le chitosane (CHT) (batch STBJ0437, Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) a une masse moléculaire égale à 256 kD déterminée par chromatographie d'exclusion stérique et par calcul du degré d'acétylation ($DD = 76\%$) déterminé par 1H RMN (Bruker, MA, USA). La β -CD provient de chez Roquette (Kleptose®, Lestrem, France). Les dérivés de la β -CD utilisés pour cette étude à savoir : le Poly- β -CD, l'HP- β -CD (*Hydroxypropyl- β -CD*) et le Poly-CTR-HP- β -CD (*Citric acid crosslinked hydroxypropyl- β -CD*) ont été fournis par l'équipe du Pr Bernard Martel (UMR 8207 – UMET – Unité Matériaux et Transformations).

Le poly-CTR-HP- β -CD a été préparé selon le procédé développé et breveté par l'équipe de Martel et al., (Martel et al., 2005 ; Weltrowski et al., 2003) qui consiste, dans un premier temps, à la réalisation d'une réaction de polyestérification entre l'HP- β -CD et l'acide citrique (CTR, Sanit-Quentin-Fallavier, France) (= agent de réticulation) en présence de l'hypophosphite de sodium (NaH_2PO_4 ; = catalyseur). Une fois un mélange homogène est obtenu, l'eau a été éliminée à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi, Flawil, Suisse), jusqu'à l'obtention d'une pellicule translucide qui adhère au fond du ballon. Cette dernière a été ensuite traitée thermiquement à 140 °C sous vide pendant 90 min. Le solide ainsi obtenu a été dispersé dans l'eau : la séparation des phases solubles et insolubles a été réalisée par filtration sur verre fritté. La fraction insoluble (Poly-HP- β -CD_i) a été obtenue après séchage à l'étuve à 90 °C pendant une nuit. La fraction soluble (Poly-HP- β -CD_s), quant à elle, a été concentrée, purifiée par dialyse sur membrane (Spectra/Por®, MWCO 20 kDa, Sigma Aldrich, Lesquin, France) et lyophilisée à l'aide d'un lyophilisateur (Alpha 1-2 LDplus, Christ, Allemagne) à 0,06 mbar et – 53 °C.

Les macromolécules à caractère anionique ainsi obtenues (Poly-HP- β -CD_i et Poly-HP- β -CD_s) seront utilisées pour former un hydrogel physique avec le chitosane cationique. Dans cette étude, seule la fraction soluble du polymère de cyclodextrine a été utilisée.

5.2. Test de solubilité

Pour ce test de solubilité, une seule concentration de β -CD et de 3 de ses dérivés : Poly- β -CD, HP- β -CD et Poly-CTR-HP- β -CD a été testée : 20 mg.mL⁻¹. Les différentes solutions ont été

préparées dans de l'H₂O ultrapure (PURELAB® flex1, ELGA VEOLIA, High Wycombe, UK) et leurs pH ont été ajustés à 5,5 pour éviter l'influence du pH sur la solubilité. Ensuite, dans une microplaque, le juncusol purifié à partir des rhizomes de *Juncus inflexus* localité 3 a été mis en excès : 3 mg.mL⁻¹/puit. 1 mL des différentes solutions préparées de β -CD ou de ses dérivés a été ajouté dans les puits correspondants. Afin d'éviter d'éventuels effets de dégradation, d'oxydation ou de transformation du PA en contact avec la lumière, la plaque a été couverte par du papier aluminium puis mise sous agitation (240 rpm) pendant 24 h et à température ambiante. Les différents échantillons ont été ensuite filtrés sur des filtres membrane polyethersulfone (PES) 0,45 μ m et analysés par UHPLC-UV-MS pour déterminer les teneurs en juncusol. Une méthode de quantification a été développée dans ce but (**Chapitre 3, partie 2.3**).

5.3. Préparation des poudres de chitosane (CHT) et de Poly-CTR-HP- β -cyclodextrine (Poly-CTR-HP- β -CD)

Pour la préparation des hydrogels de CHT/Poly-CTR-HP- β -CD, il a été essentiel d'avoir des poudres ayant la même granulométrie (< 125 μ m). Le chitosane a été broyé à l'aide d'un broyeur rapide à rotor (Pulvérisette 14 Fritsch, Allemagne) à raison d'un cycle de 2 min à 8000 rpm puis tamisé à l'aide d'un tamis de 125 μ m. La poudre de Poly-CTR-HP- β -CD a été broyée à l'aide d'un mortier.

Les hydrogels peuvent être formés de 2 façons, soit par des interactions physiques ou des interactions chimiques. Même s'il présente de faibles propriétés mécaniques, le 2^{ème} type d'hydrogel est caractérisé par une biocompatibilité élevée (Zarrintaj et al., 2021). Afin de pouvoir obtenir un hydrogel physique, les poudres de CHT et de Poly-CTR-HP- β -CD ont été co-broyées à sec à l'aide d'un Vibro-broyeur Mill MM 400 (Restch®, Steinbach, Germany) à une fréquence de 10 Hz pendant 3 min à température ambiante (Blanchemain et al., 2017). Pour chacune des formulations souhaitées (différents ratios de CHT et de Poly-CTR-HP- β -CD), un co-broyage a été effectué. Ces formulations ont été mises dans des tubes eppendorfs et conservées à 25 °C pour éviter qu'elles perdent leurs caractéristiques physico-chimiques.

5.4. Préparation des hydrogels de CHT/Poly-CTR-HP- β -CD/Juncusol

Les différentes formulations (**Tableau 25**) ont été préparées comme décrit dans l'article de Chijcheapaza-Flores et al., (2023). Pour évaluer l'impact de chaque composé sur la formation de l'hydrogel et ses propriétés viscoélastiques, chaque formulation a été comparée aux témoins contenant du CHT ou du CHT + juncusol (3:0:0 et 3:0:1). Les hydrogels (de volume final de 1,5 mL) ont été préparés de la manière suivante : les poudres de CHT/Poly-CTR-HP- β -CD (avec ou sans juncusol) ont été placées dans une 1^{ère} seringue, et un volume d'H₂O ultrapure (PURELAB® flex1, ELGA VEOLIA, High Wycombe, UK) (calculé pour chacune des formulations) a été introduit dans une 2^{ème} seringue. Les 2 seringues ont été ensuite reliées grâce à un connecteur female-female Luer lock connector (Vygon®, Ecoen, France). En appuyant alternativement sur les pistons, le contenu des 2 seringues a été soigneusement mixé pendant 1 min (entre 80 – 90 répétitions). Puis, de l'acide lactique pur a été introduit (son volume est ajusté pour une concentration finale de 1% p/p). Après avoir mélangé à nouveau, un hydrogel viscoélastique injectable a été ainsi formé.

Tableau 24. Concentration (% p/p) de CHT, Poly-CTR-HP- β -CD, H₂O et d'acide lactique pour la préparation des différentes formulations de l'hydrogel CHT/Poly-CTR-HP- β -CD/Juncusol

Formulation CHT/Poly-CTR-HP- β - CD/Juncusol		CHT	Poly- CTR-HP- β -CD	Juncusol	H ₂ O ultrapure	Acide lactique
Témoins	3:0:0	3	0	0	96	1
	3:0:1	3	0	1	95	1
Échantillons	3:3:0	3	3	0	93	1
	3:2:0	3	2	0	96	1
	3:2:1	3	2	1	93	1

5.5. Granulation par voie humide des poudres de Poly-CTR-HP- β -CD et de juncusol

La formulation retenue pour cette étude est la 3:2:1, c'est-à-dire 3% de CHT + 2% de Poly-CTR-HP- β -CD + 0,2% de juncusol + 15 μ L d'acide lactique + 1407 μ L d'H₂O.

Afin de pouvoir améliorer la complexation du juncusol avec le Poly-CTR-HP- β -CD, une granulation humide a été effectuée. Pour 18 mg de poudre de juncusol et 180 mg de poudre de Poly-CTR-HP- β -CD, 120 μ L d'H₂O ultrapure ont été ajoutés progressivement. Cette granulation a été réalisée dans un petit mortier. Le mélange de poudres a été ensuite séché à l'étuve à 60 °C pendant 2 h environ. Une fois refroidi, ce mélange a été enfin tamisé pour obtenir

des particules de taille $< 125 \mu\text{m}$ et conservé dans un tube eppendorf à 25°C pour éviter tout changement de ses caractéristiques physico-chimiques.

5.6. Caractérisation des hydrogels

5.6.1 Caractérisation par le test du flacon retourné

Afin d'évaluer la gélification des hydrogels, 1 mL de chaque hydrogel préparé a été injecté dans un flacon en verre vide (diamètre $\times$ hauteur = $2 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$). Les différents flacons ont été ensuite retournés et incubés à 37°C et un suivi visuel et photographique a été réalisé à $T_{0\text{h}}$ et $T_{24\text{h}}$ pour voir si les hydrogels vont s'écouler sous leur propre poids. Ce test est basé sur la propriété de résistance à l'écoulement des hydrogels ; il est admis qu'un échantillon ayant une limite d'élasticité (gel) ne s'écoulera pas, tandis qu'un échantillon visqueux mais inélastique (sol colloïde) s'écoule rapidement (Raghavan and Cipriano, 2005).

5.6.2. Caractérisation de l'intégrité structurelle

Afin d'évaluer la morphologie des hydrogels et leur stabilité structurelle au pH physiologique, 0,2 mL de chaque hydrogel ont été injectés dans un pot contenant du PBS filtré ($\text{pH} = 7,4$; Sigma Aldrich, Lesquin, France). Les différents pots ont été ensuite incubés à 37°C et un suivi visuel et photographique a été également réalisé en 3 temps : 0 h, 1 h et 24 h.

5.7. Cinétique de libération du juncusol

5.7.1. En condition statique

Une quantité d'environ 0,2 g de l'hydrogel, avec pour formulation retenue 3:2:1 CHT/Poly-CTR-HP- β -CD/Juncusol, a été injectée dans du PBS ($\text{pH} = 7,4$; Sigma Aldrich, Lesquin, France) filtré (30 mL) en triplicata. Les pots ont été ensuite incubés sous agitation (80 rpm) à 37°C . Des prélèvements de 1 mL ont été effectués à différents temps. À chaque prélèvement, l'échantillon prélevé a été remplacé par un volume frais équivalent de PBS. Les prélèvements recueillis ont été analysés par UHPLC-UV-MS selon la méthode décrite dans le **Chapitre 3**,

partie 2.2, et le juncusol a été quantifié selon la méthode décrite dans le **Chapitre 3, partie 2.3**. Une seule expérience a été réalisée en duplicata et nécessite d'être reproduite.

5.7.2. En condition dynamique

Pour s'approcher des conditions physiologiques, la libération du juncusol a été effectuée par la méthode de dissolution en flux continu (en mode dynamique) à l'aide d'un SOTAX® CE7 Smart-USP IV (SOTAX®, Aesch, Suisse). Une quantité de 0,5 mg d'hydrogel a été placée dans les cellules de libération dédiées. 2 témoins ont été inclus dans l'expérience en triplicata : le 1^{er} témoin correspond à une cellule sans hydrogel et le 2^{ème} témoin correspond à un hydrogel à base de 3% de CHT + Juncusol (formulation 3:0:1). Du PBS (pH = 7,4 ; Sigma Aldrich, Lesquin, France) filtré (500 mL/hydrogel) a été utilisé comme milieu de dissolution (0,1 M, pH = 7,4 à 37 °C). Son débit a été fixé à 5 mL.min⁻¹. Différents prélèvements de 1 mL ont été réalisés grâce à un collecteur automatique Sotax® C615 (SOTAX®, Aesch, Suisse) (**Figure 60**). Les différents échantillons prélevés ont été analysés par UHPLC-UV-MS (**Chapitre 3, partie 2.2**) et le juncusol libéré a été quantifié comme décrit dans la partie **Chapitre 3, partie 2.3**.



Figure 60. (A) Appareil de dissolution en flux continu SOTAX® CE7 Smart-USP IV (SOTAX®, Aesch, Suisse) disponible au laboratoire de l'équipe INSERM U1008 "Advanced Drug Delivery Systems", Université de Lille (B) Plan d'expérience de mise des hydrogels dans les cellules de libération

5.8. Évaluation de l'activité antibactérienne de l'hydrogel CHT/Poly-CTR-HP- β -CD/Juncusol sur l'isolat clinique *S. aureus* T28.1 par la méthode du *kill-time assay*

L'expérience a été réalisée de la même manière que dans le **Chapitre 3, partie 4.4**. Brièvement, 2 hydrogels ont été préparés :

- Hydrogel témoin = CHT/Poly-CTR-HP- β -CD/Juncusol (3:2:0)
- Hydrogel témoin + PA = CHT/Poly-CTR-HP- β -CD/Juncusol (3:2:1)

Environ 0,6 mL de chacun de ces hydrogels ont été placés dans les tubes de culture correspondants contenant déjà 10 mL de solution stérilisée de PBS et 1 mL de suspension bactérienne de *S. aureus* T28.1, préalablement ajustée à 10^6 UFC.mL⁻¹ dans du CR (pour une concentration finale de 10^5 UFC.mL⁻¹ dans les tubes de culture). Les 2 tubes de culture ont été incubés à 37 °C pendant 48 h et les bactéries ont été dénombrées toutes les 2 h jusqu'à 8 h, puis à 24 h. Un dénombrement à T₀ h a été réalisé pour quantifier l'inoculum de départ. L'essai a été réalisé une fois en duplicata mais nécessitera des expériences indépendantes complémentaires.

6. Biodisponibilité des composés phénanthréniques issus des espèces de *Juncus*

6.1. Digestion gastro-intestinale statique *in vitro* de l'extrait brut méthanolique des rhizomes de *J. inflexus* (JI3)

La digestion gastro-intestinale simulée a été adaptée à partir du protocole consensuel harmonisé de digestion INFOGEST (Brodkorb et al., 2019) qui permet de mimer au mieux les trois compartiments du tractus gastro-intestinal humain (bouche, estomac, intestin) et leurs conditions physiologiques. L'expérience a été réalisée dans un réacteur de 200 mL à 37 °C (la double paroi du réacteur est alimentée constamment par de l'eau du bain-marie) et sous agitation (**Figure 61**). Habituellement, l'expérience de digestion se fait sur une quantité initiale de 2 g. Ne possédant pas une telle quantité en extrait brut de *J. inflexus*, les quantités d'échantillon et de réactifs à ajouter ont été adaptées.



Figure 61. Montage utilisé pour la réalisation de la digestion gastro-intestinale *in vitro* de l'extrait brut méthanolique des rhizomes de *J. inflexus* localité 3 (Boutahiri, 2022)

Pour un échantillon de 700 mg d'extrait brut méthanolique des rhizomes de JI3, 560 μL de fluide salivaire (SFF : *simulated salivary fluid*) dont la composition est présentée dans le **Tableau 26**, ont été ajoutés au réacteur avec 3,5 μL de CaCl_2 et 67 μL d'eau distillée. La digestion a été initiée par l'ajout de 70 μL d'amylase à 125 mg.mL^{-1} (75 UI.mL^{-1} du volume final) (A3176, Merck, Darmstadt, Germany) dans le milieu réactionnel. Cette phase qui mime la digestion au niveau de la bouche dure 2 minutes.

Dans un second temps, 1,12 mL de fluide gastrique (SGF : *simulated gastric fluid*) ainsi que 0,7 µL de CaCl₂ et 139 µL d'eau distillée ont été ajoutés à la phase salivaire. Le pH a été ajusté à 3. L'ajout de 70 µL de pepsine porcine à 22,7 mg.mL⁻¹ (2000 U.mL⁻¹ du volume final) (P6887, Merck, Darmstadt, Germany), et de 70 µL de lipase gastrique porcine à 24 mg.mL⁻¹ (concentration finale = 60 U.mL⁻¹) a marqué le début de la phase gastrique qui a duré 2 heures. Durant cette phase, le pH a été régulièrement contrôlé pour qu'il soit maintenu à 3 (pH acide au niveau de l'estomac).

La phase intestinale a ensuite démarré par l'ajout de 1,19 mL de fluide intestinal (SIF : *simulated intestinal fluid*) ainsi que 5,6 µL de CaCl₂ et 554 µL d'eau distillée à la phase gastrique. Le pH de la solution a été ajusté à 7 pour inactiver la pepsine et la lipase gastrique. Cette phase a duré 2 heures. Elle a débuté quand 142 mg de pancréatine porcine (100 U de trypsine par mL du volume final du SIF) (P1750, Merck, Darmstadt, Germany) ont été ajoutés. Le pH a été également vérifié régulièrement pendant cette phase et ajusté à 7 si nécessaire durant les 2 heures.

À la fin de la digestion, l'extrait brut méthanolique des rhizomes de JI3 digéré (hydrolysats) a été recueilli et mis à chauffer à 95 °C pendant 10 min pour dénaturer la pancréatine et arrêter ainsi la digestion de la phase intestinale. Ce dernier a ensuite été congelé à - 20 °C en attendant qu'il soit analysé.

Parallèlement, une digestion blanche été également effectuée uniquement avec les fluides salivaire, gastrique et intestinal ainsi que les différentes enzymes digestives (α-amylase, pepsine, lipase et pancréatique). Cette digestion sans l'extrait brut méthanolique sert de témoin.

Préparation des échantillons pour l'analyse par UHPLC-UV-MS

Comme les hydrolysats issus de l'expérience de digestion gastro-intestinale statique *in vitro* contiennent les enzymes digestives dénaturées, nous avons, dans un premier temps, traité ces dernières par ajout d'ACN afin de les précipiter. À cet effet, un volume égal d'ACN a été ajouté à chaque échantillon et l'ensemble a été placé à - 20 °C pendant 1 h. Les échantillons ont été ensuite centrifugés pour sédimenter les protéines digestives précipitées. Les surnageants ont été enfin récupérés, filtrés sur filtre PTFE 0,45 µm et injectés en UHPLC-UV-MS selon la méthode décrite dans le **Chapitre 3, partie 2.2.**

Tableau 25. Composition des différents fluides de la digestion gastro-intestinale statique *in vitro*

Composé \ Concentration	Phase salivaire		Phase gastrique		Phase intestinale	
	g.L ⁻¹	mM	g.L ⁻¹	mM	g.L ⁻¹	mM
KCl	1,130	15,100	0,510	6,900	0,510	6,800
KH ₂ PO ₄	0,510	3,700	0,125	0,900	0,110	0,800
NaHCO ₃	1,140	6,800	2,100	25,000	7,100	85,000
NaCl			2,760	47,000	2,240	38,400
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,014	0,500	0,400	0,100	0,030	0,330
(NH ₄) ₂ CO ₃	0,005	0,060	0,380	0,500		

Points techniques & remarques concernant l'expérience réalisée :

- En raison d'une quantité limitée en JI3 EBMR, 700 mg ont été employés au lieu de 2 g. Les volumes d'enzymes et de réactifs ont été alors adaptés.
- Des problèmes de solubilité ont été observés dès la mise de l'extrait brut en bioréacteurs avec le fluide de la phase salivaire. Ce manque de solubilité peut s'expliquer par de faibles volumes employés et le caractère hydrophobe de cet extrait brut.
- À la fin de l'expérience, 2 parties du JI3 EBMR ont été récupérées : une partie soluble qualifiée « digérée » et une partie non soluble qualifiée de « non digérée »
- Lors de l'ajustement du pH tout au long de l'expérience, l'ajout du NaOH a provoqué le changement de la coloration initiale du JI3 EBMR (du jaune vers le rouge). Une hypothèse pourrait être une interaction des fonctions phénols des composés phénanthréniques présents dans le JI3 EBMR avec la base, et une possible déprotonation.

6.2. Evaluation de la cytotoxicité des composés phénanthréniques purifiés sur le modèle cellulaire Caco2/HT29-MTX : kit CCK-8

Le test de cytotoxicité a été réalisé sur une coculture de cellules Caco2/HT29-MTX (cellules épithéliales/cellules caliciformes à mucus ; ratio 9:1), un modèle de monocouche standard utilisé pour imiter la perméabilité de la barrière intestinale humaine.

La coculture cellulaire a étéensemencée dans des plaques 96 puits à une densité de 8000 cellules/puit dans un volume de 150 µL de milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) supplémenté en pénicilline/streptomycine (100 U.mL⁻¹) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, États-

Unis), en L-glutamine (2 mM) et en sérum de veau fœtal (10%) inactivé à la chaleur (FBS, Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Germany). Les microplaques ont été incubées à 37 °C et à 5% de CO₂ jusqu'à ce que la coculture cellulaire atteigne 80% de confluence. Le milieu de culture a été changé deux fois par semaine jusqu'au jour de l'expérimentation (21 jours environ).

Des solutions-mères pour chaque composé phénanthrénique à tester, purifié à partir du sous-extrait CH₂Cl₂ des rhizomes de *J. inflexus*, ont été préalablement préparées dans du DMSO car ces derniers sont insolubles dans le milieu de culture aqueux. Toutefois, un pourcentage de DMSO $\leq 1\%$ a dû être respecté, au sein de la microplaque, car au-delà de cette valeur, le DMSO devient toxique pour les cellules et entraîne leur mort. Ainsi, les différentes solutions-mères ont été diluées dans du milieu de culture (solutions intermédiaires) pour aboutir aux concentrations finales suivantes en microplaque : 100 ; 75 ; 50 ; 25 ; 12,5 ; 6,25 ; 3,123 et 1,563 μM . La cytotoxicité des composés a été évaluée à 2 temps : 2 h et 24 h.

Le jour du contact, l'ancien milieu de culture DMEM Gibco™ a été retiré de tous les puits de la plaque puis remplacé par 150 μL du même milieu fraîchement filtré. 50 μL des différentes solutions intermédiaires ont été directement ajoutés dans les puits ($V_{\text{final/puit}} = 200 \mu\text{L}$). Les puits témoins négatif et de solvant contiennent respectivement 200 μL de milieu DMEM et du DMSO dilué dans du DMEM pour un pourcentage final en DMSO égal à celui appliqué pour les échantillons à tester (% final en DMSO dans le puit $< 1\%$). Après incubation des microplaques à 37 °C et à 5% de CO₂, les surnageants ont été retirés et remplacés par 200 μL du milieu DMEM contenant 5% de WST-8 (Dojindo Molecular Technologies, Japan). Les plaques ont été de nouveau incubées pour 2 h. Le WST-8 est réduit en formazan au niveau intracellulaire par des déshydrogénases présentes dans les cellules viables ; sa quantité réduite est proportionnelle au nombre de cellules viables.

Enfin, à l'aide d'un spectrofluorimètre (gamme Xenius XC, Safas, Monaco), l'absorbance a été lue à une longueur d'onde égale à $\lambda = 450 \text{ nm}$ et ainsi la viabilité cellulaire a été calculée par rapport à la moyenne des absorbances des puits témoins (correspondant à 100% de cellules viables) selon la formule suivante :

Pourcentage de viabilité cellulaire (%)

$$= \frac{\text{Moyenne des absorbances des cellules traitées}}{\text{Moyenne des absorbances des cellules du témoin de solvant}} \times 100$$

6.3. Passage de barrière intestinale *in vitro* du juncusol sur le modèle de coculture cellulaire CaCo2/HT29-MTX

L'étude de passage de barrière intestinale *in vitro* du juncusol a été réalisée sur le modèle de coculture de cellules Caco2/HT29-MTX (ratio 9:1). Pour ces expériences, la coculture cellulaire a étéensemencée dans des inserts à membrane PET microporeuse (taille des pores = 3 μm , Corning- Falcon®, Glendale, États-Unis) en plaques 12 puits à une densité de 84 000 cellules/insert dans 2 mL de milieu DMEM supplémenté en pénicilline/streptomycine (100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$), en L-glutamine (2 mM) et en sérum de veau fœtal (10%) inactivé à la chaleur. 2,5 mL de ce même milieu DMEM supplémenté ont été également placés dans les compartiments basolatéraux des différents puits. Les plaques ont été incubées à 37 °C et à 5% de CO_2 pendant 21 jours pour permettre la croissance et la différenciation de la coculture cellulaire. Le milieu de culture cellulaire des compartiments apicaux et basolatéraux a été changé tous les 2 jours jusqu'au jour de l'expérimentation. Cette étude a nécessité différentes étapes comme décrites dans la **Figure 62**.

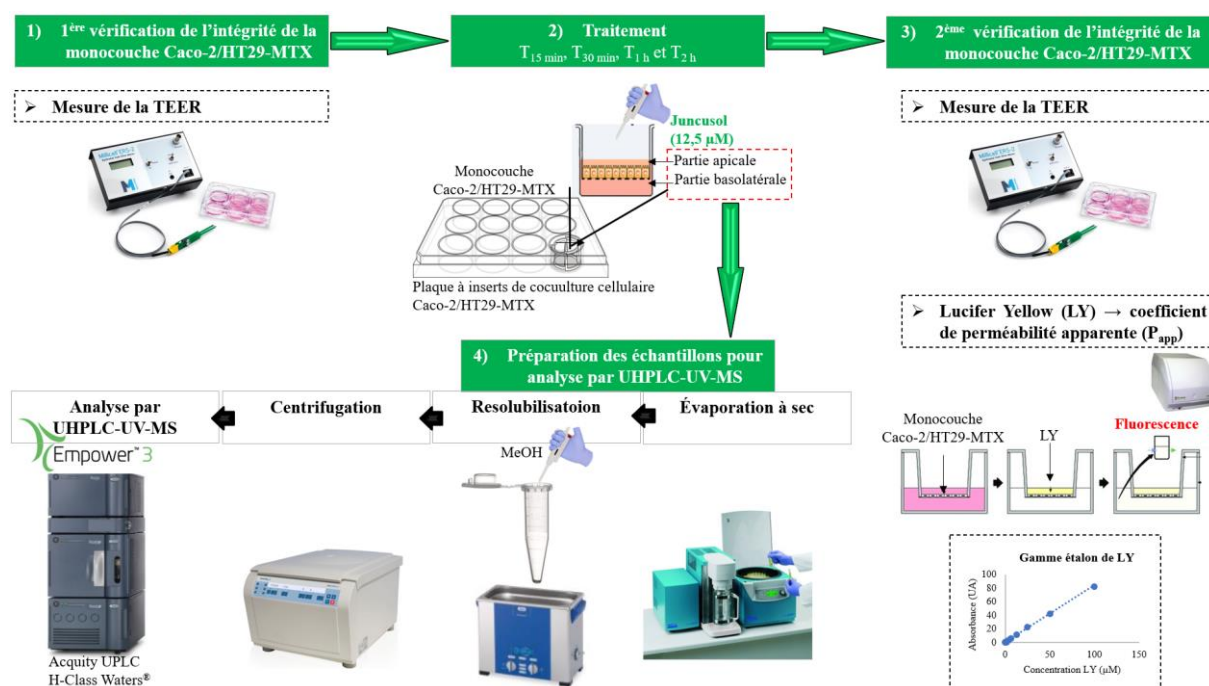


Figure 62. Représentation schématique des différentes étapes réalisées lors des expériences de passage de barrière intestinale *in vitro* du juncusol sur le modèle de coculture cellulaire CaCo2/HT29-MTX

Le jour de l'expérience de passage de barrière intestinale, l'intégrité de la monocouche de coculture cellulaire Caco2/HT29-MTX, et plus précisément celle des jonctions serrées (*tight*

junctions : TJs), a d'abord été vérifiée, en mesurant la résistance électrique transépithéliale (TEER) grâce à un appareil de voltmètre-ohmmètre (MilliCell® ERS-2). En effet, les TJs constituent une véritable frontière entre le domaine apical et le domaine basolatéral de la membrane plasmique. Elles sont essentielles dans le fonctionnement physique de la barrière intestinale et elles régulent le mouvement paracellulaire de diverses substances (ions, solutés et eau) à travers l'épithélium intestinal (Lee et al., 2018).

Puis, le milieu de culture a été retiré et les cellules ont été rincées avec du milieu de transport HBSS-Hepes (*HEPES-buffered Hank's Balanced Salt Solution* ; pH = 7,2 – 7,4) préalablement chauffé au bain-marie à 37 °C et filtré (sur filtre PVDF 0,22 µm). 1 mL dans le compartiment apical et 2,5 mL dans le compartiment basolatéral de milieu HBSS-Hepes ont ainsi été employés. Ensuite, dans une nouvelle plaque 12 puits, 1,5 mL de ce même milieu de transport ont été ajoutés dans le compartiment basolatéral dans les puits désignés pour le traitement à 2 h. 2 inserts de coculture cellulaire Caco2/HT29-MTX ont été soigneusement déplacés de la plaque de culture vers les puits correspondant au « traitement 2 h » de la nouvelle plaque. 500 µL de juncusol) ont été ensuite déposés dans le compartiment apical des puits, au-dessus des inserts. Une solution-mère de juncusol a été préalablement préparée dans du DMSO à une concentration égale à 2,66 mg.mL⁻¹, puis une dilution a été réalisée pour obtenir une solution intermédiaire dans le milieu de transport permettant d'obtenir une concentration finale en juncusol (C_f (mise en apical)) de 12,5 µM dans le puit. La plaque a été incubée à 37 °C et 5% CO₂. Les traitements (1 h, 30 min et 15 min) ont été réalisés de la même manière dans la même plaque, également en duplicata. Un témoin a été inclus dans la microplaque au début ($T_{15 \text{ min}}$) et à la fin de l'expérience ($T_{2 \text{ h}}$). Ce témoin consiste à mettre 500 µL de DMSO, préalablement dilué dans du milieu de transport pour obtenir un pourcentage final en DMSO égal à celui appliqué pour l'échantillon à tester ($\leq 1\%$) dans le compartiment apical des inserts dédiés.

Les mêmes étapes ont été entreprises pour un essai de passage de barrière intestinale *in vitro* à 4 °C.

Après écoulement du temps des différents traitements, la résistance électrique transépithéliale (TEER) a été de nouveau mesurée pour s'assurer de l'intégrité de la monocouche cellulaire Caco2/HT29-MTX après mise en contact avec le juncusol.

Enfin, les échantillons se trouvant dans les différents compartiments apicaux et basolatéraux ont été récupérés et conservés à – 20 °C pour être analysés par la suite par UHPLC-UV-MS.

L'intégrité de la monocouche de coculture cellulaire Caco2/HT29-MTX a été vérifiée une dernière fois en déterminant la perméabilité cellulaire par spectrométrie de fluorescence. Cette mesure a été réalisée grâce au marqueur de transport para-cellulaire, le *Lucifer Yellow* (LY), préparé préalablement pour obtenir une concentration finale dans le milieu de transport HBSS-Hepes (C_f (dans HBSS-Hepes) de 100 μM). Pour ce faire, 1,5 mL du milieu de transport HBSS-Hepes ont été tout d'abord ajoutés dans tous les puits d'une nouvelle plaque 12 puits. Les inserts vidés utilisés pour l'expérience de passage ont été placés dans cette nouvelle plaque en vérifiant précautionneusement la correspondance insert – traitement. Ensuite, 1 mL de la solution LY a été déposé en apical de tous les puits et la plaque a été incubée à 37 °C et 5% de CO_2 pendant 90 min. Des prélèvements de 100 μL ont été effectués à partir des compartiments apicaux et basolatéraux à $T_{15 \text{ min}}$, $T_{30 \text{ min}}$, $T_{45 \text{ min}}$, $T_{60 \text{ min}}$ et $T_{90 \text{ min}}$ dans des tubes eppendorfs et conservés dans de la glace et à l'abri de la lumière.

Quantification du LY

Dans une microplaque 96 puits, une gamme de concentrations de LY (dilutions successives au demi) a été déposée en duplicata. Ensuite, 80 μL de chaque prélèvement basolatéral, préalablement effectué à $T_{15 \text{ min}}$, $T_{30 \text{ min}}$, $T_{45 \text{ min}}$, $T_{60 \text{ min}}$ et $T_{90 \text{ min}}$, ont été déposés par la suite dans les puits dédiés (**Figure 63**). Ce travail a été effectué à l'abri de la lumière car le LY est sensible à la lumière.

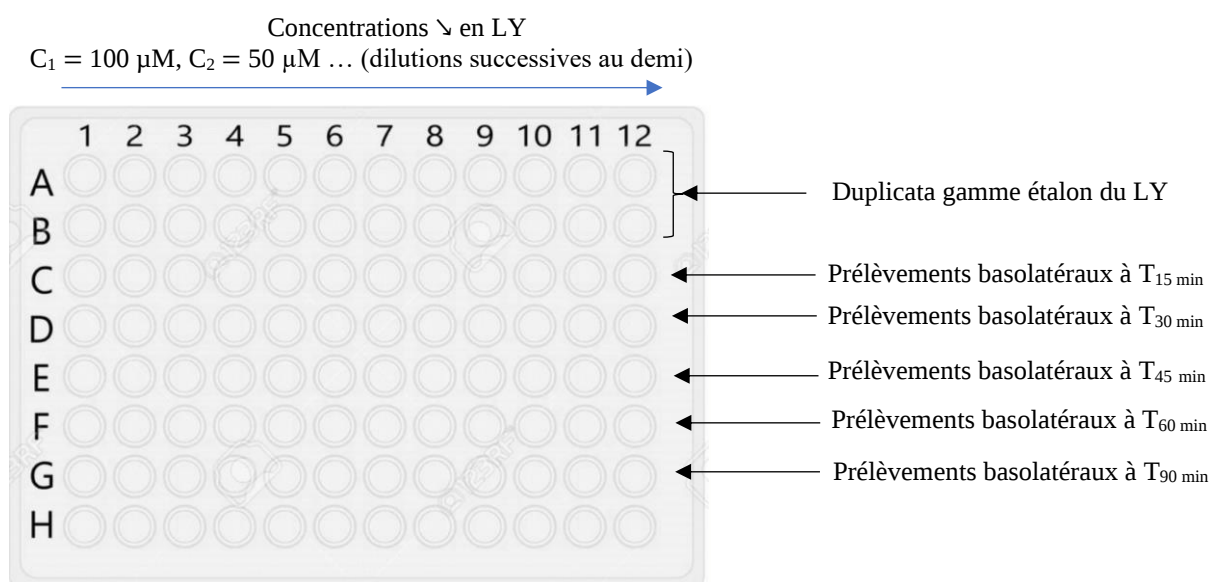


Figure 63. Plan de la microplaque 96 puits pour le calcul des coefficients de perméabilité apparente (P_{app})

Le taux de transport de LY a été déterminé par lecture de fluorescence (Excitation : Ex 485 nm ; Emission : Em 530 nm) de la microplaque par un spectrofluorimètre Safas Xenius XC (Safas Monaco, Monaco, France). Ainsi, un coefficient de perméabilité apparente (P_{app}) peut être

calculé suivant cette équation : $P_{app} \text{ (cm. s}^{-1}\text{)} = \frac{\Delta Q}{\Delta t} \times \frac{V_b}{A \times C_0}$ où

ΔQ : variation de la concentration en LY dans la chambre basale (μM)

Δt : durée de transport (s)

V_b : volume dans la chambre basale (mL)

A : surface de l'insert (cm^2)

C_0 : concentration initiale de LY appliquée au niveau chambre apicale (μM)

La monocouche de barrière intestinale Caco2/HT29-MTX est considérée intègre quand $P_{app} < 1 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$

Préparation des échantillons pour l'analyse en UHPLC-UV-MS

Les différents échantillons récupérés des compartiments apicaux et basolatéraux ont été concentrés à l'aide d'un concentrateur sous vide centrifuge réfrigéré (Genevac™, Fisher-Scientific, Illkirch, France) puis repris dans 200 μL de MeOH qualité analytique. Leur solubilisation a été améliorée par la mise des différents tubes dans un bain à ultrasons. Après centrifugation (15 min, 4000 rpm), les surnageants des différents échantillons ont été enfin analysés par UHPLC-UV-MS selon la méthode décrite dans le **Chapitre 3, partie 2.2.3**.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Conclusions générales & Perspectives

Ce projet de thèse avait pour objectif de proposer des solutions thérapeutiques à deux problématiques en lien avec l'émergence des maladies infectieuses : l'apparition de pandémies mondiales, en l'occurrence la pandémie de la COVID-19, et la résistance aux antibiotiques. Pour répondre à cet enjeu, une approche mettant en œuvre des critères écologiques et chimiotaxonomiques a été adoptée pour la sélection de plantes halophytes dotées d'une grande diversité phytochimique et d'un éventail d'activités biologiques prometteuses. Ces travaux ont été réalisés dans la continuité d'une collaboration mise en place au sein des deux laboratoires d'accueil en France et en Tunisie et se sont appuyés sur un financement PHC Utique 2020-2022. Le criblage de plantes halophytes prélevées en 2020 en Tunisie n'ayant pas apporté de résultats satisfaisants, ce travail de thèse a été rapidement orienté vers l'exploration de l'activité antivirale contre les coronavirus et de l'activité antibactérienne contre des bactéries à Gram positif, dont certaines multirésistantes, d'espèces de *Juncus* collectées dans 3 localités en France en 2018 : deux en région Bretagne (*J. acutus* et *J. maritimus* localité 1 et *J. acutus* localité 2) et une en région Nouvelle-Aquitaine (*J. inflexus* localité 3) en adoptant la méthodologie du fractionnement bioguidé et pour lesquelles des résultats préliminaires avaient été obtenus.

- Étude phytochimique de *J. acutus* (localité 2) et évaluation de son activité antivirale (Chapitre 2, partie 1) :

Un premier criblage permettant d'évaluer l'activité antivirale contre le coronavirus HCoV-229E des extraits bruts méthanoliques des différentes parties végétales des espèces de *Juncus* collectées a permis d'orienter le travail sur les tiges de *J. acutus* (localité 2). L'évaluation de l'activité antivirale de ses différents sous-extraits a montré que le sous extrait AcOEt, et à un moindre degré le sous-extrait Aq, étaient très actifs contre l'alphacoronavirus HCoV-229E. Grâce au fractionnement bioguidé réalisé au moyen de l'HPLC semi-préparative et de la CPC, la lutéoline, flavone très commune dans le règne végétal, a été identifiée comme étant la molécule responsable de l'activité anti-HCoV-229E préalablement identifiée. Elle agit comme un inhibiteur spécifique de l'étape de réplication du coronavirus HCoV-229E. Par contre, la lutéoline n'a pas montré d'efficacité contre les betacoronavirus SARS-CoV-2 et MERS-CoV.

- Étude phytochimique de *J. inflexus* (localité 3) et évaluation de son activité antibactérienne (Chapitre 2, partie 2) :

Le screening préliminaire mené afin d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits bruts méthanoliques et des sous-extraits (CH_2Cl_2 , AcOEt et Aq) des 3 espèces de *Juncus* contre 34 souches bactériennes et 2 levures (méthode de Steers) nous a conduit à retenir le sous-extrait CH_2Cl_2 des rhizomes de *J. inflexus* (localité 3). Ce dernier a en effet été particulièrement actif contre des souches bactériennes à Gram positif, notamment des *Enterococcus sp.*, des *Streptococcus sp.* et des *Staphylococcus aureus* avec des CMI's égales à $39,06 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Sur le plan phytochimique, ce sous-extrait s'est montré particulièrement riche en composés phénanthréniques, métabolites spécialisés caractéristiques du genre *Juncus*. Il a ainsi été fractionné par CPC. 5 composés phénanthréniques ont alors été purifiés par HPLC préparative à partir de la fraction F'4 présentant une forte activité antibactérienne. Les composés ont été identifiés par HRMS et RMN comme étant l'effusol, le juncusol, le 5-éthényl-1,8-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2,7-diol, la juncuénine B et la dehydrojuncuénine B, précédemment décrits dans la littérature. 4 autres composés phénanthréniques plus apolaires ont été isolés et identifiés à partir de la fraction F'2 du même sous-extrait mais moins active. 3 composés sont déjà connus : le 5-éthényl-1,7-diméthyl-9,10-dihydrophénanthrène-2-ol, la juncuénine A et la dehydrojuncuénine A. Le quatrième composé semble être un nouveau et une hypothèse de structure a été émise mais doit être confortée par des expériences complémentaires.

Même si le potentiel antibactérien de ces composés a été un peu documenté dans la littérature via la détermination de CMI's contre certaines souches bactériennes, ce projet de thèse avait comme objectif d'approfondir la compréhension de l'effet antibactérien de certains des composés phénanthréniques isolés en quantités suffisantes, le juncusol et la juncuénine B. Nous avons notamment étudié leur effet contre une souche bactérienne de *S. aureus* résistante à la méticilline issu d'une ostéite d'un pied diabétique (*S. aureus* T28.1). L'étude de l'activité antibactérienne en présence des composés testés à différentes concentrations au cours du temps (test du *kill-time assay*) ont conforté les résultats issus de la détermination du rapport CMB/CMI. L'effet antibactérien du juncusol et de la juncuénine B testés à la CMI, mis en évidence par les courbes de croissance obtenues, a été respectivement qualifié de bactéricide et de bactériostatique. Un effet post-antibiotique a été par ailleurs mis en exergue pour ces deux composés car ils sont capables d'induire une latence de croissance bactérienne quand ils sont appliqués en prétraitement. Afin d'optimiser l'activité des composés phénanthréniques étudiés,

c'est-à-dire diminuer leur dose et augmenter leur efficacité, des synergies d'association composé phénanthrénique – composé phénanthrénique et composé phénanthrénique antibiotique ont été évaluées via la méthode de l'échiquier (*checkerboard method*). Des associations conduisant à un effet synergique à additif et synergique à indifférent ont été mises en évidence respectivement pour les associations juncusol – gentamicine et juncuénine B – gentamicine. Un tel résultat permet d'ouvrir des perspectives de combinaison de substances actives pour le traitement d'infections compliquées. Enfin, un potentiel anti-biofilm marqué a été observé pour les composés phénanthréniques testés sur la formation du biofilm de la souche SARM T28.1 (inhibition supérieure à 80%) et modéré pour sa destruction (jusqu'à 47% d'inhibition).

- Mise en place d'une formulation topique (Chapitre 2, partie 3) :

Dans l'optique d'une potentielle application clinique de ces composés phénanthréniques antibactériens, la mise en place d'une formulation topique à base de juncusol a été envisagée comme une option thérapeutique pouvant aider à la cicatrisation des infections des ulcères diabétiques impliquant des souches SARM. Un hydrogel de CHT/Poly-CRT-H- β -CD chargé de juncusol a été développé. Le profil de libération du juncusol a été nettement amélioré, particulièrement en condition statique, grâce à la réalisation d'une granulation humide entre les poudres de Poly-CRT-H- β -CD et de juncusol en amont de l'étape de co-broyage. Le pourcentage estimé de juncusol libéré passe de 4,8% à presque 50%. L'évaluation de l'activité antibactérienne de cet hydrogel a démontré un effet antibactérien bactéricide durant les premières 24 h de libération. Les résultats de cette étude préliminaire sont très encourageants pour optimiser les paramètres de libération du PA.

- Étude préliminaire de la biodisponibilité des composés phénanthréniques (Chapitre 2, partie 4) :

L'étude de la biodisponibilité des composés phénanthréniques est un autre paramètre important à considérer dans le cas d'une potentielle prise par voie orale. Or, peu d'études existent sur ce type de composés. Des expériences de digestion gastro-intestinale statique *in vitro* grâce au protocole harmonisé INFOGEST et de passage de barrière intestinale *in vitro* sur le modèle cellulaire CaCo2/HT29-MTX ont ainsi été envisagées. Notre étude a montré que les composés phénanthréniques ne semblent pas être affectés par les peptidases enzymatiques car ils sont

retrouvés intacts après la digestion *in vitro*. Par ailleurs, les expériences de passage *in vitro* de la monocouche de coculture cellulaire Caco2/HT29-MTX réalisées avec le juncusol montrent que ce composé est capable de traverser « en partie » la barrière intestinale. 10% du juncusol ont été quantifiés dans le compartiment basolatéral. La cinétique de son passage semble être légèrement influencée par la température. Au cours de ce passage, le juncusol a été métabolisé en partie par la monocouche Caco2/HT29-MTX sous sa forme glucuronidée (m/z +176) et sulfatée (m/z +80). Ces métabolites ont en effet été identifiés dans les compartiments apicaux et basolatéraux, grâce à des analyses en LC-HRMS (ESI-Q-TOF).

Diverses perspectives sont envisagées pour la suite de ce projet :

- Concernant l'activité antibactérienne des composés phénanthréniques, celle du juncusol notamment, mise en exergue contre l'isolat clinique SARM T28.1, il serait intéressant, sur le plan fondamental, de déterminer précisément leur mécanisme d'action. Il serait pertinent de tester ces mêmes composés sur d'autres souches de SARM. La recherche des mutations responsables de la résistance de ces souches sur laquelle les composés phénanthréniques ont une activité antibactérienne pourrait être envisagée.
- Pour l'aspect applicatif, il serait nécessaire de confirmer l'innocuité *in vivo* de la formulation topique de l'hydrogel CHT/Poly-CRT-HP- β -CD chargé de juncusol. Pour la formulation sélectionnée (3:2:1), des expériences d'optimisation de libération du PA et une étude rhéologique seraient au préalable nécessaires.
- Concernant les études de biodisponibilité, il serait intéressant de quantifier les métabolites du juncusol (juncusol glucuronidé et juncusol sulfaté) dans les compartiments apicaux et basolatéraux de la monocouche de coculture cellulaire Caco2/HT29-MTX pour avoir une idée de la forme prédominante dans chacun de ces compartiments. La détermination du mode de transport du juncusol à travers la barrière intestinale *in vitro* amènerait par ailleurs des éléments supplémentaires pour notre étude de biodisponibilité.
- Pour la phytochimie des espèces de *Juncus* étudiées, l'élucidation structurale du composé 1, issu de la fraction F'2 du sous-extrait CH₂Cl₂ des rhizomes de *J. inflexus*, mériterait d'être confirmée par des analyses RMN complémentaires.
- Dans une optique de chimie verte, il serait intéressant de remplacer les techniques extractives conventionnelles des produits d'origine naturelle par des procédés d'éco-

extraction utilisant des technologies innovantes telles que l'extraction assistée par micro-ondes ou l'extraction par fluide supercritique.

À l'issue de ces travaux de thèse, un article portant sur l'activité antivirale de *J. acutus* (tiges, localité 2) et de l'un de ses constituants, la lutéoline, contre le coronavirus HCoV-229E a déjà été publié dans le journal *Molecules* en 2023. 3 autres publications sont planifiées :

- une publication pour valoriser les résultats issus de l'étude approfondie de l'activité antibactérienne de *J. inflexus* (rhizomes, localité 3) et de sa phytochimie ;
- une seconde publication pour mettre en valeur les résultats acquis dans le cadre du développement d'une formulation topique à base de juncusol ;
- une troisième publication qui permettra de valoriser l'étude de biodisponibilité des composés phénanthréniques issues de *Juncus inflexus* et en particulier du juncusol.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abd El-Sayed, E., 2004. Evaluation of Samaar morr (*Juncus acutus*) plant as raw material for paper making. *J. Sci. Ind. Res.* 63, 163–171. https://www.researchgate.net/publication/288307626_Evaluation_of_Samaar_morr_Juncus_acutus_plant_as_raw_material_for_paper_making
- Abdel-Mogib, M., 2001. New 9, 10-dihydrophenanthrene derivative from two *Juncus* species. *Alex. J. Pharm. Sci.* 15, 13–14. https://www.researchgate.net/publication/280718815_New_910-Dihydrophenanthrene_derivative_from_two_Juncus_species
- Abdel-Razik, A., Elshamy, A., Nassar, M., El-Kousyb, S., 2009. Chemical constituents and hepatoprotective activity of *Juncus subulatus*. *Rev Latinoam Qum* 37. https://www.researchgate.net/publication/242364606_Chemical_constituents_and_hepatoprotective_activity_of_Juncus_subulatus
- Acar, J., Röstel, B., 2001. Antimicrobial resistance: an overview. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* 20, 797–810. <https://doi.org/10.20506/rst.20.3.1309>
- Agramont, J., Gutiérrez-Cortez, S., Joffré, E., Sjöling, Å., Calderon Toledo, C., 2020. Fecal Pollution Drives Antibiotic Resistance and Class 1 Integron Abundance in Aquatic Environments of the Bolivian Andes Impacted by Mining and Wastewater. *Microorganisms* 8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081122>
- Ahmed, S., Annu, Ali, A., Sheikh, J., 2018. A review on chitosan centred scaffolds and their applications in tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* 116, 849–862. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.176>
- Al Jitan, S., Alkhoori, S.A., Yousef, L.F., 2018. Chapter 13 - Phenolic Acids From Plants: Extraction and Application to Human Health, in: *Atta-ur-Rahman (Ed.), Studies in Natural Products Chemistry. Elsevier*, pp. 389–417. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64056-7.00013-1>
- Aldea, M., Michot, J.-M., Danlos, F.-X., Ribas, A., Soria, J.-C., 2021. Repurposing of Anticancer Drugs Expands Possibilities for Antiviral and Anti-Inflammatory Discovery in COVID-19. *Cancer Discov.* 11, 1336–1344. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-0144>
- Almeida, C.M.R., Mucha, A.P., Vasconcelos, M.T.S.D., 2006. Variability of metal contents in the sea rush *Juncus maritimus*–estuarine sediment system through one year of plant's life. *Mar. Environ. Res.* 61, 424–438. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2005.12.002>
- Almeida, C.M.R., Mucha, A.P., Vasconcelos, M.T.S.D., 2004. Influence of the Sea Rush *Juncus maritimus* on Metal Concentration and Speciation in Estuarine Sediment Colonized by the Plant. *Environ. Sci. Technol.* 38, 3112–3118. <https://doi.org/10.1021/es049932j>
- Andreano, E., Piccini, G., Licastro, D., Casalino, L., Johnson, N.V., Paciello, I., Dal Monego, S., Pantano, E., Manganaro, N., Manenti, A., Manna, R., Casa, E., Hyseni, I., Benincasa, L., Montomoli, E., Amaro, R.E., McLellan, J.S., Rappuoli, R., 2020. SARS-CoV-2 escape *in vitro*

from a highly neutralizing COVID-19 convalescent plasma. *BioRxiv Prepr. Serv. Biol.* <https://doi.org/10.1101/2020.12.28.424451>

ANSES. « One Health : une seule santé pour les êtres vivants et les écosystèmes » [en ligne]. Disponible sur : <https://www.anses.fr/fr/content/one-health-une-seule-sant%C3%A9-pour-les-%C3%AAtres-vivants-et-les-%C3%A9cosyst%C3%A8mes>.(consulté le 01 Août 2023).

Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet Lond. Engl.* 399, 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

Arêde, P., Milheirico, C., de Lencastre, H., Oliveira, D.C., 2012. The Anti-Repressor MecR2 Promotes the Proteolysis of the mecA Repressor and Enables Optimal Expression of β -lactam Resistance in MRSA. *PLOS Pathog.* 8, e1002816. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002816>

Aussel, A., Thébaud, N.B., Bérard, X., Brizzi, V., Delmond, S., Bareille, R., Siadous, R., James, C., Ripoche, J., Durand, M., Montembault, A., Burdin, B., Letourneur, D., L'Heureux, N., David, L., Bordenave, L., 2017. Chitosan-based hydrogels for developing a small-diameter vascular graft: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Biomed. Mater. Bristol Engl.* 12, 065003. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aa78d0>

Awaad, A.S., 2006. Phenolic glycosides of *Juncus acutus* and its anti-eczematic activity. *Chem. Nat. Compd.* 42, 152–155. <https://doi.org/10.1007/s10600-006-0065-y>

Bai, X., Gao, M., Syed, S., Zhuang, J., Xu, X., Zhang, X.-Q., 2018. Bioactive hydrogels for bone regeneration. *Bioact. Mater.* 3, 401–417. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2018.05.006>

Balaure, P.C., Grumezescu, A.M., 2020. Recent Advances in Surface Nanoengineering for Biofilm Prevention and Control. Part I: Molecular Basis of Biofilm Recalcitrance. Passive Anti-Biofouling Nanocoatings. *Nanomaterials* 10. <https://doi.org/10.3390/nano10061230>

Balouiri, M., Sadiki, M., Ibensouda, S.K., 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* 6, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

Bao, L., Deng, W., Huang, B., Gao, H., Liu, J., Ren, L., Wei, Q., Yu, P., Xu, Y., Qi, F., Qu, Y., Li, F., Lv, Q., Wang, W., Xue, J., Gong, S., Liu, M., Wang, G., Wang, S., Song, Z., Zhao, Linna, Liu, P., Zhao, Li, Ye, F., Wang, H., Zhou, W., Zhu, N., Zhen, W., Yu, H., Zhang, X., Guo, L., Chen, L., Wang, C., Wang, Y., Wang, X., Xiao, Y., Sun, Q., Liu, H., Zhu, F., Ma, C., Yan, L., Yang, M., Han, J., Xu, W., Tan, W., Peng, X., Jin, Q., Wu, G., Qin, C., 2020. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. *Nature* 583, 830–833. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2312-y>

Barrington, R., Williamson, G., Bennett, R.N., Davis, B.D., Brodbelt, J.S., Kroon, P.A., 2009. Absorption, Conjugation and Efflux of the Flavonoids, Kaempferol and Galangin, Using the Intestinal CACO-2/TC7 Cell Model. *J. Funct. Foods* 1, 74–87. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2008.09.011>

Béduneau, A., Tempesta, C., Fimbel, S., Pellequer, Y., Jannin, V., Demarne, F., Lamprecht, A., 2014. A tunable Caco-2/HT29-MTX co-culture model mimicking variable permeabilities of the

human intestine obtained by an original seeding procedure. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 87, 290–298. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.03.017>

Behery, F.A.A., Naeem, Z.-E.M., Maatooq, G.T., Amer, M.M.A., Ahmed, A.F., 2013. A novel antioxidant phenanthrenoid dimer from *Juncus acutus* L. *Nat. Prod. Res.* 27, 155–163. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.662759>

Behery, F.A.A., Naeem, Z.E.M., Maatooq, G.T., Amer, M.M.A., Wen, Z.-H., Sheu, J.-H., Ahmed, A.F., 2007. Phenanthrenoids from *Juncus acutus* L., new natural lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase inhibitors. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 55, 1264–1266. <https://doi.org/10.1248/cpb.55.1264>

Bellakhdar, J., 1997. Contribution à l'étude de la pharmacopée traditionnelle au Maroc : la situation actuelle, les produits, les sources du savoir (enquête ethnopharmacologique de terrain réalisé de 1969 à 1992). Université Paul Verlaine- Metz. <https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752084v1>

Bellakhdar, J., 1978. Medecine traditionnelle et toxicologie Ouestaharienne contribution à l'étude de la pharmacopée marocaine, *Editions Techniques Nord-Africaines. ed. Rabat.*

Bellio, P., Fagnani, L., Nazzicone, L., Celenza, G., 2021. New and simplified method for drug combination studies by checkerboard assay. *MethodsX* 8, 101543. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101543>

Belouzard, S., Millet, J.K., Licitra, B.N., Whittaker, G.R., 2012. Mechanisms of Coronavirus Cell Entry Mediated by the Viral Spike Protein. *Viruses* 4, 1011–1033. <https://doi.org/10.3390/v4061011>

Berenbaum, M.C., 1978. A method for testing for synergy with any number of agents. *J. Infect. Dis.* 137, 122–130. <https://doi.org/10.1093/infdis/137.2.122>

Bertram, S., Dijkman, R., Habjan, M., Heurich, A., Gierer, S., Glowacka, I., Welsch, K., Winkler, M., Schneider, H., Hofmann-Winkler, H., Thiel, V., Pöhlmann, S., 2013. TMPRSS2 activates the human coronavirus 229E for cathepsin-independent host cell entry and is expressed in viral target cells in the respiratory epithelium. *J. Virol.* 87, 6150–6160. <https://doi.org/10.1128/JVI.03372-12>

Beucher, G., Blondot, M.-L., Celle, A., Pied, N., Recordon-Pinson, P., Esteves, P., Faure, M., Métifiot, M., Lacomme, S., Dacheux, D., Robinson, D.R., Längst, G., Beaufils, F., Lafon, M.-E., Berger, P., Landry, M., Malvy, D., Triantafyllidis, T., Andreola, M.-L., Wodrich, H., 2022. Bronchial epithelia from adults and children: SARS-CoV-2 spread via syncytia formation and type III interferon infectivity restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 119, e2202370119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2202370119>

Bezerra, F.M., Lis, M.J., Firmino, H.B., Dias da Silva, J.G., Curto Valle, R. de C.S., Borges Valle, J.A., Scacchetti, F.A.P., Tessaro, A.L., 2020. The Role of β -Cyclodextrin in the Textile Industry-Review. *Mol. Basel Switz.* 25. <https://doi.org/10.3390/molecules25163624>

Références bibliographiques

- Bhattacharya, R., Rolta, R., Dev, K., Sourirajan, A., 2021. Synergistic potential of essential oils with antibiotics to combat fungal pathogens: Present status and future perspectives. *Phytother. Res.* PTR 35, 6089–6100. <https://doi.org/10.1002/ptr.7218>
- Bhattarai, N., Gunn, J., Zhang, M., 2010. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. Chitosan-Based Formul. *Drugs Imaging Agents Biotherapeutics* 62, 83–99. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.019>
- Blanchemain, N., Martel, B., Flores, C., Cazaux, F., Chai, F., Tabary, N., Lopez Heredia, M., 2017. Procédé de fabrication d'hydrogel à base de chitosan et de polyélectrolytes chargés négativement et matériau poreux alvéolaire issu dudit hydrogel. WO2017001808A1. <https://patents.google.com/patent/WO2017001808A1/fr>
- Bocquet, L., 2018. Les composés phénoliques du houblon, *Humulus lupulus* L. : Lutte contre la résistance microbienne et perspectives industrielles. Université de Lille. <http://www.theses.fr/2018LILUR027>
- Bocquet, L., Sahpaz, S., Bonneau, N., Beaufay, C., Mahieux, S., Samaillie, J., Roumy, V., Jacquin, J., Bordage, S., Hennebelle, T., Chai, F., Quetin-Leclercq, J., Neut, C., Rivière, C., 2019. Phenolic Compounds from *Humulus lupulus* as Natural Antimicrobial Products: New Weapons in the Fight against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma brucei* Strains. *Mol. Basel Switz.* 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24061024>
- Bodmin, K., Champion, P., James, T., Burton, T., 2015. New Zealand Rushes: *Juncus* factsheets. <https://niwa.co.nz/gallery/new-zealand-rushes-juncus-field-identification-guide/juncus-factsheets-and-key>
- Boger, D.L., Mitscher, L.A., Mullican, M.D., Drake, S.D., Kitos, P., 1985. Antimicrobial and cytotoxic properties of 9,10-dihydrophenanthrenes: structure-activity studies on juncusol. *J. Med. Chem.* 28, 1543–1547. <https://doi.org/10.1021/jm00148a031>
- Böhling, N., 2004. Southern Aegean indicator values - Derivation, application and perspectives. https://www.researchgate.net/publication/237326630_Southern_Aegean_indicator_values_-_Derivation_application_and_perspectives
- Boira, H., 1988. La végétation del Marjal de TorreblancaRibera de Cabanes, in: *Actes Del Simposi Internacional de Botànica Pius Font i Quer*. pp. 233–239.
- Bolós, O. de, 1967. Comunidades Vegetales de Las Comarcas Próximas Al Litoral Situadas Entre Los Ríos Llobregat Y Segura., *Ariel. ed*, [Memorias de la Real Academia de Ciencias y Artes de Barcelona. Tercera época. no. 724.].
- Bonapace, C.R., Bosso, J.A., Friedrich, L.V., White, R.L., 2002. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 44, 363–366. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(02\)00473-X](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(02)00473-X)
- Bonnin, A., 2018. Caractérisation de la protéine S du coronavirus humain 229E. Université de Lille. <https://theses.hal.science/tel-02275786v1/document>

Références bibliographiques

- Bonny, V., Maillard, A., Mousseaux, C., Plaçais, L., Richier, Q., 2020. COVID-19: Pathogenesis of a multi-faceted disease. *Rev. Med. Interne* 41, 375–389. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2020.05.003>
- Borges, A., Saavedra, M.J., Simões, M., 2015. Insights on antimicrobial resistance, biofilms and the use of phytochemicals as new antimicrobial agents. *Curr. Med. Chem.* 22, 2590–2614. <https://doi.org/10.2174/0929867322666150530210522>
- Boscaiu, M., Ballesteros, G., Naranjo, M.A., Vicente, O., Boira, H., 2011. Responses to salt stress in *Juncus acutus* and *J. maritimus* during seed germination and vegetative plant growth. *Plant Biosyst. - Int. J. Deal. Asp. Plant Biol.* 145, 770–777. <https://doi.org/10.1080/11263504.2011.628446>
- Boukef, M.K., 1986. Les plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne. Agence de coopération culturelle et technique.
- Boutahiri, S., 2022. Développement de compléments alimentaires antidiabétiques et antibactériens à base de lavandes du Maroc. Université de Lille & Université Moulay Ismaïl. <https://pepite-depot.univ-lille.fr/ToutIDP/EDSMRE/2022/2022ULILR007.pdf>
- Boyko, H., 1966. Basic Ecological Principles of Plant Growing by Irrigation with Highly Saline or Sea-Water, in: Boyko, H. (Ed.), *Salinity and Aridity: New Approaches to Old Problems*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 131–200. https://doi.org/10.1007/978-94-017-6014-0_4
- Brennan-Krohn, T., Kirby, J.E., 2019. Antimicrobial Synergy Testing by the Inkjet Printer-assisted Automated Checkerboard Array and the Manual Time-kill Method. *J. Vis. Exp. JoVE*. <https://doi.org/10.3791/58636>
- Brink, M., Achigan-Dako, E.G., 2012. Plantes à fibres, Ressources végétales de l’Afrique Tropicale. Wageningen : PROTA, Wageningen, Pays-Bas.
- Brodkorb, A., Egger, L., Alming, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A.R., Martins, C., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Minekus, M., Portmann, R., Santos, C.N., Souchon, I., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W., Recio, I., 2019. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat. Protoc.* 14, 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Bruneton, J., 2016. Pharmaognosie - Phytochimie, plantes médicinales. 2016. 5ème édition. ed. Lavoisier TEC &DOC, Lavoisier, Paris. 1504 p.
- Bús, C., Kúsz, N., Jakab, G., Senobar Tahaei, S.A., Zupkó, I., Endrész, V., Bogdanov, A., Burián, K., Csupor-Löffler, B., Hohmann, J., Vasas, A., 2018a. Phenanthrenes from *Juncus Compressus* Jacq. with Promising Antiproliferative and Anti-HSV-2 Activities. *Mol. Basel Switz.* 23. <https://doi.org/10.3390/molecules23082085>
- Bús, C., Tóth, B., Stefkó, D., Hohmann, J., Vasas, A., 2018b. Family Juncaceae: promising source of biologically active natural phenanthrenes. *Phytochem. Rev.* 17, 833–851. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9561-5>

Butler, C.C., Hobbs, F.D.R., Gbinigie, O.A., Rahman, N.M., Hayward, G., Richards, D.B., Dorward, J., Lowe, D.M., Standing, J.F., Breuer, J., Khoo, S., Petrou, S., Hood, K., Nguyen-Van-Tam, J.S., Patel, M.G., Saville, B.R., Marion, J., Ogburn, E., Allen, J., Rutter, H., Francis, N., Thomas, N.P.B., Evans, P., Dobson, M., Madden, T.-A., Holmes, J., Harris, V., Png, M.E., Lown, M., van Hecke, O., Detry, M.A., Saunders, C.T., Fitzgerald, M., Berry, N.S., Mwandigha, L., Galal, U., Mort, S., Jani, B.D., Hart, N.D., Ahmed, H., Butler, D., McKenna, M., Chalk, J., Lavalley, L., Hadley, E., Cureton, L., Benysek, M., Andersson, M., Coates, M., Barrett, S., Bateman, C., Davies, J.C., Raymundo-Wood, I., Ustianowski, A., Carson-Stevens, A., Yu, L.-M., Little, P., Agyeman, A.A., Ahmed, T., Allcock, D., Beltran-Martinez, A., Benedict, O.E., Bird, N., Brennan, L., Brown, J., Burns, G., Butler, M., Cheng, Z., Danson, R., de Kare-Silver, N., Dhasmana, D., Dickson, J., Engamba, S., Fisher, S., Fox, R., Frost, E., Gaunt, R., Ghosh, S., Gilkar, I., Goodman, A., Granier, S., Howell, A., Hussain, I., Hutchinson, S., Imlach, M., Irving, G., Jacobsen, N., Kennard, J., Khan, U., Knox, K., Krasucki, C., Law, T., Lee, R., Lester, N., Lewis, D., Lunn, J., Mackintosh, C.I., Mathukia, M., Moore, P., Morton, S., Murphy, D., Nally, R., Ndukauba, C., Ogundapo, O., Okeke, H., Patel, A., Patel, K., Penfold, R., Poonian, S., Popoola, O., Pora, A., Prasad, V., Prasad, R., Razzaq, O., Richardson, S., Royal, S., Safa, A., Sehdev, S., Sevenoaks, T., Shah, D., Sheikh, A., Short, V., Sidhu, B.S., Singh, I., Soni, Y., Thalasselis, C., Wilson, P., Wingfield, D., Wong, M., Woodall, M.N.J., Wooding, N., Woods, S., Yong, J., Yongblah, F., Zafar, A., 2023. Molnupiravir plus usual care versus usual care alone as early treatment for adults with COVID-19 at increased risk of adverse outcomes (PANORAMIC): an open-label, platform-adaptive randomised controlled trial. *The Lancet* 401, 281–293. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)02597-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)02597-1)

Butler, M.S., Cooper, M.A., 2011. Antibiotics in the clinical pipeline in 2011. *J. Antibiot.* (Tokyo) 64, 413–425. <https://doi.org/10.1038/ja.2011.44>

Caamal-Fuentes, E., Torres-Tapia, L.W., Simá-Polanco, P., Peraza-Sánchez, S.R., Moo-Puc, R., 2011. Screening of plants used in Mayan traditional medicine to treat cancer-like symptoms. *J. Ethnopharmacol.* 135, 719–724. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.004>

Čáková, V., 2013. Contribution à l'étude phytochimique d'orchidées tropicales : identification des constituants d'*Aerides rosea* et d'*Acampe rigida* : techniques analytiques et préparatives appliquées à *Vanda coerulea* et *Vanda teres*. Université de Strasbourg. <https://theses.hal.science/tel-00997451v1/document>

Caraco, Y., Crofoot, G.E., Moncada, P.A., Galustyan, A.N., Musungaie, D.B., Payne, B., Kovalchuk, E., Gonzalez, A., Brown, M.L., Williams-Diaz, A., 2022. Phase 2/3 trial of molnupiravir for treatment of Covid-19 in nonhospitalized adults. *NEJM Evid.* 1, EVIDoa2100043. <https://doi.org/10.1056/EVIDoa2100043>

Carbone, A., Parrino, B., Cusimano, M.G., Spanò, V., Montalbano, A., Barraja, P., Schillaci, D., Cirrincione, G., Diana, P., Cascioferro, S., 2018. New Thiazole Nortopsentin Analogues Inhibit Bacterial Biofilm Formation. *Mar. Drugs* 16. <https://doi.org/10.3390/md16080274>

Cascioferro, S., Carbone, D., Parrino, B., Pecoraro, C., Giovannetti, E., Cirrincione, G., Diana, P., 2021. Therapeutic Strategies To Counteract Antibiotic Resistance in MRSA Biofilm-Associated Infections. *ChemMedChem* 16, 65–80. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000677>

Références bibliographiques

Cascioferro, S., Parrino, B., Carbone, D., Schillaci, D., Giovannetti, E., Cirrincione, G., Diana, P., 2020. Thiazoles, Their Benzofused Systems, and Thiazolidinone Derivatives: Versatile and Promising Tools to Combat Antibiotic Resistance. *J. Med. Chem.* 63, 7923–7956. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01245>

Cascioferro, S., Parrino, B., Petri, G.L., Cusimano, M.G., Schillaci, D., Di Sarno, V., Musella, S., Giovannetti, E., Cirrincione, G., Diana, P., 2019. 2,6-Disubstituted imidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazole derivatives as potent staphylococcal biofilm inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 167, 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.02.007>

Cassini, A., Högberg, L.D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G.S., Colomb-Cotinat, M., Kretzschmar, M.E., Devleeschauwer, B., Cecchini, M., Ouakrim, D.A., Oliveira, T.C., Struelens, M.J., Suetens, C., Monnet, D.L., Strauss, R., Mertens, K., Struyf, T., Catry, B., Latour, K., Ivanov, I.N., Dobрева, E.G., Tambic Andrašević, A., Soprek, S., Budimir, A., Paphitou, N., Žemlicková, H., Schytte Olsen, S., Wolff Sönksen, U., Märtin, P., Ivanova, M., Lyytikäinen, O., Jalava, J., Coignard, B., Eckmanns, T., Abu Sin, M., Haller, S., Daikos, G.L., Gikas, A., Tsiodras, S., Kontopidou, F., Tóth, Á., Hajdu, Á., Guólaugsson, Ó., Kristinsson, K.G., Murchan, S., Burns, K., Pezzotti, P., Gagliotti, C., Dumpis, U., Liuimiene, A., Perrin, M., Borg, M.A., de Greeff, S.C., Monen, J.C., Koek, M.B., Elstrøm, P., Zabicka, D., Deptula, A., Hryniewicz, W., Caniça, M., Nogueira, P.J., Fernandes, P.A., Manageiro, V., Popescu, G.A., Serban, R.I., Schréterová, E., Litvová, S., Štefkovicová, M., Kolman, J., Klavs, I., Korošec, A., Aracil, B., Asensio, A., Pérez-Vázquez, M., Billström, H., Larsson, S., Reilly, J.S., Johnson, A., Hopkins, S., 2019. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect. Dis.* 19, 56–66. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30605-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30605-4)

Cavallo, J.D., Chardon, H., Chidiac, C., Choutet, P., Courvalin, P., Dabernat, H., Drugeon, H., Dubreuil, L., Goldstein, F., Jarlier, V., Leclercq, R., Nicolas-chanoine, M.H., Philippon, A., Quentin, C., Rouveix, B., Sirot, J., Soussy, C.-J., 2005. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie - Communiqué 2005 (Édition de Janvier 2005). https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2020/07/Casfm_2005.pdf

CDC, 2019. Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>

CDC. « Antimicrobial Resistance » [en ligne]. Disponible sur : <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>. (consulté le 06 Mai 2023).

CDC. « SARS-CoV Images » [en ligne]. Disponible sur : <https://www.cdc.gov/sars/lab/images/coronavirus.png>. (consulté le 06 Septembre 2023).

Cecchini, M., Langer, J., Slawomirski, L., 2015. Antimicrobial resistance in the G7 countries and beyond : Economic Issues, Policies and Options for Action. *Organisation for Economic Cooperation and Development.*, Paris, France. <https://www.oecd.org/els/health-systems/Antimicrobial-Resistance-in-G7-Countries-and-Beyond.pdf>

Çelik, T.A., 2018. Introductory Chapter: Cytotoxicity, in: *Tülay Aşkin Çelik (Ed.), Cytotoxicity. IntechOpen, Rijeka*, p. Ch. 1. <https://doi.org/10.5772/intechopen.77244>

- Chan, J.F.-W., Kok, K.-H., Zhu, Z., Chu, H., To, K.K.-W., Yuan, S., Yuen, K.-Y., 2020. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg. Microbes Infect.* 9, 221–236. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1719902>
- Chapatwala, K.D., de la Cruz, A.A., Miles, D.H., 1981. Antimicrobial activity of juncusol, a novel 9-10-dihydrophenanthrene from the marsh plant *Juncus roemerianus*. *Life Sci.* 29, 1997–2001. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(81\)90609-3](https://doi.org/10.1016/0024-3205(81)90609-3)
- Chapman, V.J., 1942. The New Perspective in the Halophytes. *Q. Rev. Biol.* 17, 291–311.
- Chassagne, F., Samarakoon, T., Porras, G., Lyles, J.T., Dettweiler, M., Marquez, L., Salam, A.M., Shabih, S., Farrokhi, D.R., Quave, C.L., 2021. A Systematic Review of Plants With Antibacterial Activities: A Taxonomic and Phylogenetic Perspective. *Front. Pharmacol.* 11.
- Cheeseman, J.M., 2015. The evolution of halophytes, glycophytes and crops, and its implications for food security under saline conditions. *New Phytol.* 206, 557–570. <https://doi.org/10.1111/nph.13217>
- Chen, L., Liu, W., Zhang, Q., Xu, K., Ye, G., Wu, W., Sun, Z., Liu, F., Wu, K., Zhong, B., Mei, Y., Zhang, W., Chen, Y., Li, Y., Shi, M., Lan, K., Liu, Y., 2020. RNA based mNGS approach identifies a novel human coronavirus from two individual pneumonia cases in 2019 Wuhan outbreak. *Emerg. Microbes Infect.* 9, 313–319. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1725399>
- Chijcheapaza-Flores, H., Tabary, N., Chai, F., Maton, M., Staelens, J.-N., Cazaux, F., Neut, C., Martel, B., Blanchemain, N., Garcia-Fernandez, M.J., 2023. Injectable Chitosan-Based Hydrogels for Trans-Cinnamaldehyde Delivery in the Treatment of Diabetic Foot Ulcer Infections. *Gels* 9. <https://doi.org/10.3390/gels9030262>
- Chinese Pharmacopoeia Commission, 2005. Pharmacopoeia of the Peoples Republic of China : 2005. People's Medical Publishing House, Beijing.
- Chong, J., Poutaraud, A., Hugueney, P., 2009. Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Sci.* 177, 143–155. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.05.012>
- Chung, Y.-C., Chen, C.-Y., 2008. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresour. Technol.* 99, 2806–2814. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.044>
- Coleman, A.W., Nicolis, I., Keller, N., Dalbiez, J.P., 1992. Aggregation of cyclodextrins: An explanation of the abnormal solubility of β -cyclodextrin. *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.* 13, 139–143. <https://doi.org/10.1007/BF01053637>
- Coleman, J., Hench, K., Garbutt, K., Sexstone, A., Bissonnette, G., Skousen, J., 2001. Treatment of Domestic Wastewater by Three Plant Species in Constructed Wetlands. *Water. Air. Soil Pollut.* 128, 283–295. <https://doi.org/10.1023/A:1010336703606>
- Coley, P.D., Heller, M.V., Aizprua, R., Araúz, B., Flores, N., Correa, M., Gupta, M., Solis, P.N., Ortega-Barría, E., Romero, L.I., Gómez, B., Ramos, M., Cubilla-Rios, L., Capson, T.L., Kursar, T.A., 2003. Using ecological criteria to design plant collection strategies for drug

Références bibliographiques

discovery. *Front. Ecol. Environ.* 1, 421–428. [https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2003\)001\[0421:UECTDP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2003)001[0421:UECTDP]2.0.CO;2)

Commission européenne. « Action de l'UE pour combattre la résistance aux antimicrobiens » [en ligne]. Disponible sur : https://health.ec.europa.eu/antimicrobial-resistance/eu-action-antimicrobial-resistance_fr. (consulté le 01 Août 2023).

Corman, V.M., Eckerle, I., Memish, Z.A., Liljander, A.M., Dijkman, R., Jonsdottir, H., Juma Ngeiywa, K.J.Z., Kamau, E., Younan, M., Al Masri, M., Assiri, A., Gluecks, I., Musa, B.E., Meyer, B., Müller, M.A., Hilali, M., Bornstein, S., Wernery, U., Thiel, V., Jores, J., Drexler, J.F., Drosten, C., 2016. Link of a ubiquitous human coronavirus to dromedary camels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 9864–9869. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604472113>

Corsaro, M.M., della Greca, M., Fiorentino, A., Monaco, P., Previtera, L., 1994. Cycloartane glucosides from *Juncus effusus*. *Int. J. Plant Biochem.* 37, 515–519. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)85090-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)85090-9)

Cosme, P., Rodríguez, A.B., Espino, J., Garrido, M., 2020. Plant Phenolics: Bioavailability as a Key Determinant of Their Potential Health-Promoting Applications. *Antioxid.* Basel Switz. 9. <https://doi.org/10.3390/antiox9121263>

Courtois, A., Jourdes, M., Dupin, A., Lapèze, C., Renouf, E., Biais, B., Teissedre, P.-L., Mérillon, J.-M., Richard, T., Krisa, S., 2017. *In Vitro* Glucuronidation and Sulfation of ϵ -Viniferin, a Resveratrol Dimer, in Humans and Rats. *Molecules* 22. <https://doi.org/10.3390/molecules22050733>

Coutard, B., Valle, C., de Lamballerie, X., Canard, B., Seidah, N.G., Decroly, E., 2020. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res.* 176, 104742. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104742>

Cox, R.M., Wolf, J.D., Plemper, R.K., 2021. Therapeutically administered ribonucleoside analogue MK-4482/EIDD-2801 blocks SARS-CoV-2 transmission in ferrets. *Nat. Microbiol.* 6, 11–18. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00835-2>

Craig, W.A., Vogelmann, B., 1987. The postantibiotic effect. *Ann. Intern. Med.* 106, 900–902. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-106-6-900>

Croes, S., Deurenberg, R.H., Boumans, M.-L.L., Beisser, P.S., Neef, C., Stobberingh, E.E., 2009. *Staphylococcus aureus* biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the *S. aureus* lineage. *BMC Microbiol.* 9, 229. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-229>

Croisier, F., Jérôme, C., 2013. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *Biobased Polym. Relat. Mater.* 49, 780–792. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009>

Cuénod, A., Pottier-Alapetite, G., Labbe, A., 1954. Flore analytique et synoptique de la Tunisie : Cryptogames vasculaires gymnospermes et monocotylédones. Office de l'expérimentation et de la vulgarisation agricoles de Tunisie.

Références bibliographiques

- Cuny, C., Friedrich, A., Kozytska, S., Layer, F., Nübel, U., Ohlsen, K., Strommenger, B., Walther, B., Wieler, L., Witte, W., 2010. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. *Pathophysiol. Staphylococci Post-Genomic Era* 300, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.11.002>
- Cycoń, M., Mroziński, A., Piotrowska-Seget, Z., 2019. Antibiotics in the Soil Environment-Degradation and Their Impact on Microbial Activity and Diversity. *Front. Microbiol.* 10, 338. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00338>
- Darby, E.M., Trampari, E., Siasat, P., Gaya, M.S., Alav, I., Webber, M.A., Blair, J.M.A., 2023. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nat. Rev. Microbiol.* 21, 280–295. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y>
- Dauros-Singorenko, P., Wiles, S., Swift, S., 2020. *Staphylococcus aureus* Biofilms and Their Response to a Relevant *in vivo* Iron Source. *Front. Microbiol.* 11, 509525. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.509525>
- Davis, J.L., 2018. Chapter 2 - Pharmacologic Principles, in: Reed, S.M., Bayly, W.M., Sellon, D.C. (Eds.), *Equine Internal Medicine (Fourth Edition)*. W.B. Saunders, pp. 79–137. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44329-6.00002-4>
- Davis, M.E., Brewster, M.E., 2004. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 1023–1035. <https://doi.org/10.1038/nrd1576>
- Deb, P., Molla, Md.M.A., Saif-Ur-Rahman, K.M., 2021. An update to monoclonal antibody as therapeutic option against COVID-19. *Biosaf. Health* 3, 87–91. <https://doi.org/10.1016/j.bshealth.2021.02.001>
- Debiopharm™, 2022. Afabicin - Staph-specific, microbiota sparing. https://www.debiopharm.com/wp-content/uploads/2022/06/Afabicin-Non-confidential_2022.pdf
- Della Greca, M., Fiorentino, A., Mangoni, L., Molinaro, A., Monaco, P., Previtera, L., 1993. Cytotoxic 9,10-Dihydrophenanthrenes from *Juncus effusus* L. *Tetrahedron* 49, 3425–3432. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)90169-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)90169-3)
- Della Greca, M., Fiorentino, A., Mangoni, L., Molinaro, A., Monaco, P., Previtera, L., 1992. 9,10-dihydrophenanthrene metabolites from *Juncus effusus* L. *Int. J. Rapid Publ. Prelim.* 33, 5257–5260. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)79148-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)79148-9)
- Della Greca, M., Fiorentino, A., Monaco, P., Previtera, L., Zarrelli, A., 1995. Effusides IV: 9, 10-dihydrophenanthrene glucosides from *Juncus effusus*. *Phytochemistry* 40, 533–535. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00287-H](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00287-H)
- Della Greca, M., Fiorentino, A., Isidori, M., Lavorgna, M., Monaco, P., Previtera, L., Zarrelli, A., 2002a. Phenanthrenoids from the wetland *Juncus acutus*. *Phytochemistry* 60, 633–638. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00152-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00152-8)

Références bibliographiques

- DellaGreca, M., Fiorentino, A., Isidori, M., Previtera, L., Temussi, F., Zarrelli, A., 2003a. Benzocoumarins from the rhizomes of *Juncus acutus*. *Tetrahedron* 59, 4821–4825. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(03\)00698-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(03)00698-7)
- DellaGreca, M., Fiorentino, A., Isidori, M., Zarrelli, A., 2001. Toxicity evaluation of natural and synthetic phenanthrenes in aquatic systems. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1824–1830. <https://doi-org.ressources-electroniques.univ-lille.fr/10.1002/etc.5620200828>
- DellaGreca, M., Fiorentino, A., Monaco, P., Previtera, L., Temussi, F., Zarrelli, A., 2003b. New dimeric phenanthrenoids from the rhizomes of *Juncus acutus*. Structure determination and antialgal activity. *Tetrahedron* 59, 2317–2324. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(03\)00237-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(03)00237-0)
- DellaGreca, M., Fiorentino, A., Monaco, P., Previtera, L., Zarrelli, A., 2002b. A new dimeric 9,10-dihydrophenanthrenoid from the rhizome of *Juncus acutus*. *Tetrahedron Lett.* 43, 2573–2575. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(02\)00308-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(02)00308-8)
- DellaGreca, M., Isidori, M., Lavorgna, M., Monaco, P., Previtera, L., Zarrelli, A., 2004. Bioactivity of phenanthrenes from *Juncus acutus* on *Selenastrum capricornutum*. *J. Chem. Ecol.* 30, 867–879. <https://doi.org/10.1023/b:joec.0000028437.96654.2c>
- Dellagrecia, M., Previtera, L., Zarrelli, A., 2005. Dimeric phenanthrenoids from *Juncus acutus*. *Nat. Prod. Res.* 19, 69–74. <https://doi.org/10.1080/1478641042000196115>
- Deluzarche, C., 2021. Coronavirus : l'efficacité des anticorps est réduite à zéro en moins de 80 jours. *Futura Santé*. <https://www.futura-sciences.com/sante/actualites/coronavirus-coronavirus-efficacite-anticorps-reduite-zero-moins-80-jours-85338/>
- Desmarests, L., Callens, N., Hoffmann, E., Danneels, A., Lavie, M., Couturier, C., Dubuisson, J., Belouzard, S., Rouillé, Y., 2022. A reporter cell line for the automated quantification of SARS-CoV-2 infection in living cells. *Front. Microbiol.* 13, 1031204. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1031204>
- Djekic, L., Martinović, M., Ćirić, A., Fraj, J., 2020. Composite chitosan hydrogels as advanced wound dressings with sustained ibuprofen release and suitable application characteristics. *Pharm. Dev. Technol.* 25, 332–339. <https://doi.org/10.1080/10837450.2019.1701495>
- Doern, C.D., 2014. When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. *J. Clin. Microbiol.* 52, 4124–4128. <https://doi.org/10.1128/JCM.01121-14>
- Duizer, E., Gilde, A.J., Versantvoort, C.H.M., Groten, J.P., 1999. Effects of Cadmium Chloride on the Paracellular Barrier Function of Intestinal Epithelial Cell Lines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 155, 117–126. <https://doi.org/10.1006/taap.1998.8589>
- Dunyach-Remy, C., Ngba Essebe, C., Sotto, A., Lavigne, J.-P., 2016. *Staphylococcus aureus* Toxins and Diabetic Foot Ulcers: Role in Pathogenesis and Interest in Diagnosis. *Toxins* 8. <https://doi.org/10.3390/toxins8070209>
- ECDC, 2018. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe – Annual report of the European antimicrobial resistance surveillance network (EARS-Net) 2017, ECDC:

Références bibliographiques

Surveillance Report. Stockholm, Sweden.
<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AMR-surveillance-EARS-Net-2017.pdf>

ECDC. « MERS-CoV worldwide overview » [en ligne]. Disponible sur : <https://www.ecdc.europa.eu/en/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-mers-cov-situation-update>. (consulté le 06 Septembre 2023).

Editorial Committee of Chinese Herbal Medicine, 1999. *Chinese herbal medicine*. Shanghai Science and Technology Press, Shanghai,.

Elshamy, A., Abdel-Razek, A., Nassar, M., 2012. Phytochemical review of *Juncus* L. genus (Fam. Juncaceae). *Arab. J. Chem.* 15. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.07.007>

EMA, 2011. Guideline on bioanalytical method validation. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf

EMA. « Lagevrio: Withdrawal of the marketing authorisation application » [en ligne]. Disponible sur : <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/withdrawn-applications/lagevrio>. (consulté le 13 Septembre 2023).

EUCAST, 2019. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie - Recommandations 2019 V.1.0 Janvier. https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2019/02/CASFM2019_V1.0.pdf

EUCAST, 2000. Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Infect.* 6, 503–508. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00149.x>

EUCAST. Overview of antifungal ECOFFs and clinical breakpoints for yeasts, moulds and dermatophytes using the EUCAST E.Def 7.4, E.Def 9.4 and E.Def 11.0 procedures. Version 4.0, 2023. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Clinical_breakpoints/EUCAST_BP_ECOFF_v_4.0.pdf.

EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.1, 2023. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_13.1/Breakpoint_Tables.pdf.

EUR-Lex. « 52001DC0333 Communication de la Commission sur une stratégie communautaire de lutte contre la résistance antimicrobienne /* COM/2001/0333 final Volume I */ » [en ligne]. Disponible sur : <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:52001DC0333&from=FR>. (consulté le 01 Août 2023).

EUR-Lex. « 52011DC0748 /* COM/2011/0748 final */ COMMUNICATION DE LA COMMISSION AU PARLEMENT EUROPÉEN ET AU CONSEIL Plan d'action pour combattre les menaces croissantes de la résistance aux antimicrobiens » [en ligne]. Disponible sur : <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/ALL/?uri=CELEX%3A52011DC0748>. (consulté le 01 Août 2023).

- Fang, L., Li, X., Li, L., Li, S., Liao, X., Sun, J., Liu, Y., 2016. Co-spread of metal and antibiotic resistance within ST3-IncHI2 plasmids from *E. coli* isolates of food-producing animals. *Sci. Rep.* 6, 25312. <https://doi.org/10.1038/srep25312>
- Fasiku, V.O., Omolo, C.A., Devnarain, N., Ibrahim, U.H., Rambharose, S., Faya, M., Mocktar, C., Singh, S.D., Govender, T., 2021. Chitosan-Based Hydrogel for the Dual Delivery of Antimicrobial Agents Against Bacterial Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilm-Infected Wounds. *ACS Omega* 6, 21994–22010. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c02547>
- Fehr, A.R., Perlman, S., 2015. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis, in: Maier, H.J., Bickerton, E., Britton, P. (Eds.), *Coronaviruses: Methods and Protocols*. Springer New York, New York, NY, pp. 1–23. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1
- Fernández, C., 1982. Revisión del genero *Juncus* L. en la Península Ibérica. II. Subgéneros *Juncus* y *Genuini* Buchenau.
- Fischer, W.A., Eron, J.J., Holman, W., Cohen, M.S., Fang, L., Szewczyk, L.J., Sheahan, T.P., Baric, R., Mollan, K.R., Wolfe, C.R., Duke, E.R., Azizad, M.M., Borroto-Esoda, K., Wohl, D.A., Coombs, R.W., James Loftis, A., Alabanza, P., Lipansky, F., Painter, W.P., 2022. A phase 2a clinical trial of molnupiravir in patients with COVID-19 shows accelerated SARS-CoV-2 RNA clearance and elimination of infectious virus. *Sci. Transl. Med.* 14, eabl7430. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abl7430>
- Flores, C., Lopez, M., Tabary, N., Neut, C., Chai, F., Betbeder, D., Herkt, C., Cazaux, F., Gaucher, V., Martel, B., Blanchemain, N., 2017. Preparation and characterization of novel chitosan and β -cyclodextrin polymer sponges for wound dressing applications. *Carbohydr. Polym.* 173, 535–546. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.026>
- Fowler, V.G.J., Boucher, H.W., Corey, G.R., Abrutyn, E., Karchmer, A.W., Rupp, M.E., Levine, D.P., Chambers, H.F., Tally, F.P., Vigliani, G.A., Cabell, C.H., Link, A.S., DeMeyer, I., Filler, S.G., Zervos, M., Cook, P., Parsonnet, J., Bernstein, J.M., Price, C.S., Forrest, G.N., Fätkenheuer, G., Gareca, M., Rehm, S.J., Brodt, H.R., Tice, A., Cosgrove, S.E., 2006. Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *N. Engl. J. Med.* 355, 653–665. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa053783>
- Fritzemeier, K.-H., Kindl, H., 1983. 9,10-Dihydrophenanthrenes as Phytoalexins of Orchidaceae. *Eur. J. Biochem.* 133, 545–550. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1983.tb07498.x>
- Gagnon, M., Zihler Berner, A., Chervet, N., Chassard, C., Lacroix, C., 2013. Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate *Salmonella* adhesion and invasion. *J. Microbiol. Methods* 94, 274–279. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.06.027>
- Gainche, M., Ripoché, I., Senejoux, F., Cholet, J., Ogeron, C., Decombat, C., Danton, O., Delort, L., Varelle-Delarbre, M., Berry, A., Vermerie, M., Fraisse, D., Felgines, C., Ranouille, E., Berthon, J.-Y., Priam, J., Saunier, E., Tourrette, A., Troin, Y., Caldefie-Chezet, F., Chalard,

Références bibliographiques

- P., 2020. Anti-Inflammatory and Cytotoxic Potential of New Phenanthrenoids from *Luzula sylvatica*. *Molecules* 25. <https://doi.org/10.3390/molecules25102372>
- Garcia Fernandez, M.-J., Maton, M., Benzine, Y., Tabary, N., Jean-Baptiste, E., Gargouri, M., Bria, M., Blanchemain, N., Karrou, Y., 2019. Ciprofloxacin loaded vascular prostheses functionalized with poly-methylbeta- cyclodextrin: The importance of *in vitro* release conditions. *J. DRUG Deliv. Sci. Technol., Journal of Drug Delivery Science and Technology*.
- Garcia, L.S., 2010. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. *Clin. Microbiol. Proced. Handb.* 1, 140–62.
- Gidwani, B., Vyas, A., 2014. Synthesis, characterization and application of Epichlorohydrin- β -cyclodextrin polymer. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 114, 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.09.035>
- Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R., Pavilonis, A., 2011. Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria. *Medicina (Mex.)* 47. <https://doi.org/10.3390/medicina47030019>
- Glowacka, I., Bertram, S., Müller, M.A., Allen, P., Soilleux, E., Pfefferle, S., Steffen, I., Tsegaye, T.S., He, Y., Gnirss, K., Niemeyer, D., Schneider, H., Drosten, C., Pöhlmann, S., 2011. Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response. *J. Virol.* 85, 4122–4134. <https://doi.org/10.1128/JVI.02232-10>
- Goy, R.C., Britto, D. de, Assis, O.B.G., 2009. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros* 19. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282009000300013>
- Gozlan, M., 2021a. Des coronavirus de chauves-souris très proches du SARS-CoV-2 identifiés au Laos. *Le Monde*. <https://www.lemonde.fr/blog/realitesbiomedicales/tag/banal-236/>
- Gozlan, M., 2021b. Covid-19 : le défi des nouveaux variants. *Le Monde*. <https://www.lemonde.fr/blog/realitesbiomedicales/2021/01/18/covid-19-le-defi-des-nouveaux-variants/>
- Graham, R.L., Donaldson, E.F., Baric, R.S., 2013. A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 836–848. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3143>
- Guibal, E., 2004. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review. *Sep. Purif. Technol.* 38, 43–74. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2003.10.004>
- Gunther, E., 1973. Ethnobotany of Western Washington: The Knowledge and Use of Indigenous Plants by Native Americans. *University of Washington Press*.
- Hakem, A., Desmarests, L., Sahli, R., Malek, R.B., Camuzet, C., François, N., Lefèvre, G., Samailie, J., Moureu, S., Sahpaz, S., Belouzard, S., Ksouri, R., Séron, K., Rivière, C., 2023. Luteolin Isolated from *Juncus acutus* L., a Potential Remedy for Human Coronavirus 229E. *Molecules* 28. <https://doi.org/10.3390/molecules28114263>

Références bibliographiques

HERA. « Health union: Identifying top 3 priority health threats » [en ligne]. Disponible sur : https://health.ec.europa.eu/system/files/2022-07/hera_factsheet_health-threat_mcm.pdf. (consulté le 01 Août 2023).

Hammond, C., 2020. https://www.chu-nantes.fr/medias/fichier/booklet-coronavirus-chap-1-v14_1617966879169-pdf?id_fiche=30513&inline=false

Hammond, J., Leister-Tebbe, H., Gardner, A., Abreu, P., Bao, W., Wisemandle, W., Baniecki, M., Hendrick, V.M., Damle, B., Simón-Campos, A., Pypstra, R., Rusnak, J.M., 2022. Oral Nirmatrelvir for High-Risk, Nonhospitalized Adults with Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 386, 1397–1408. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2118542>

Hamre, D., Procknow, J.J., 1966. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med.* N. Y. N 121, 190–193. <https://doi.org/10.3181/00379727-121-30734>

Hanawa, F., Okamoto, M., Towers, G.H.N., 2002. Antimicrobial DNA-binding photosensitizers from the common rush, *Juncus effusus*. *Photochem. Photobiol.* 76, 51–56. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)076<0051:adbpf>2.0.co;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)076<0051:adbpf>2.0.co;2)

HAS. « casirivimab / imdevimab RONAPREVE 120 mg/mL, solution à diluer pour perfusion intraveineuse ou solution pour injection sous-cutanée Première évaluation ». [en ligne]. Disponible sur : https://www.has-sante.fr/upload/docs/evamed/CT19465_RONAPREVE_PIC_INS_AvisDef_CT19465.pdf. (consulté le 13 Septembre 2023).

HAS. « LAGEVRIO (molnupiravir) - COVID-19 » [en ligne]. Disponible sur : https://www.has-sante.fr/jcms/p_3304143/fr/lagevrio-molnupiravir-covid-19. (consulté le 13 Septembre 2023).

Hernando-Amado, S., Coque, T.M., Baquero, F., Martínez, J.L., 2019. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nat. Microbiol.* 4, 1432–1442. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0503-9>

Hill, M.O., Mountford, J.O., Roy, D.B., Bunce, R.G.H., 1999. Ellenberg's indicator values for British plants. *ECOFAC Volume 2 Technical Annex*. Institute of Terrestrial Ecology.

Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M., Ito, T., 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 9, 486–493. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02175-8](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02175-8)

Hoffmann, P., Burmester, M., Langeheine, M., Brehm, R., Empl, M.T., Seeger, B., Breves, G., 2021. Caco-2/HT29-MTX co-cultured cells as a model for studying physiological properties and toxin-induced effects on intestinal cells. *PLOS ONE* 16, e0257824. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257824>

Hosseinnejad, M., Jafari, S.M., 2016. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* 85, 467–475. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.022>

Références bibliographiques

- Hsieh, M.H., Yu, C.M., Yu, V.L., Chow, J.W., 1993. Synergy assessed by checkerboard. A critical analysis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 16, 343–349. [https://doi.org/10.1016/0732-8893\(93\)90087-n](https://doi.org/10.1016/0732-8893(93)90087-n)
- Hu, Y., Li, W., Gao, T., Cui, Y., Jin, Y., Li, P., Ma, Q., Liu, X., Cao, C., 2017. The Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nucleocapsid Inhibits Type I Interferon Production by Interfering with TRIM25-Mediated RIG-I Ubiquitination. *J. Virol.* 91. <https://doi.org/10.1128/JVI.02143-16>
- Huang, Y., Yang, C., Xu, X., Xu, W., Liu, S., 2020. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacol. Sin.* 41, 1141–1149. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>
- Hui, D.S., I Azhar, E., Madani, T.A., Ntoumi, F., Kock, R., Dar, O., Ippolito, G., Mchugh, T.D., Memish, Z.A., Drosten, C., Zumla, A., Petersen, E., 2020. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health — The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *Int. J. Infect. Dis.* 91, 264–266. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.01.009>
- Hurlow, J.J., Humphreys, G.J., Bowling, F.L., McBain, A.J., 2018. Diabetic foot infection: A critical complication. *Int. Wound J.* 15, 814–821. <https://doi.org/10.1111/iwj.12932>
- Hutchings, M.I., Truman, A.W., Wilkinson, B., 2019. Antibiotics: past, present and future. *Antimicrobials* 51, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I., 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* 126, 1821–1835. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>
- Ishiuchi, K., Kosuge, Y., Hamagami, H., Ozaki, M., Ishige, K., Ito, Y., Kitanaka, S., 2015a. Chemical constituents isolated from *Juncus effusus* induce cytotoxicity in HT22 cells. *J. Nat. Med.* 69, 421–426. <https://doi.org/10.1007/s11418-015-0898-4>
- Ito, T., Katayama, Y., Asada, K., Mori, N., Tsutsumimoto, K., Tiensasitorn, C., Hiramatsu, K., 2001. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1323–1336. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.5.1323-1336.2001>
- Jackson, C.B., Farzan, M., Chen, B., Choe, H., 2022. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 23, 3–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>
- Jayk Bernal, A., Gomes da Silva, M.M., Musungaie, D.B., Kovalchuk, E., Gonzalez, A., Delos Reyes, V., Martín-Quirós, A., Caraco, Y., Williams-Diaz, A., Brown, M.L., Du, J., Pedley, A., Assaid, C., Strizki, J., Grobler, J.A., Shamsuddin, H.H., Tipping, R., Wan, H., Paschke, A., Butterson, J.R., Johnson, M.G., De Anda, C., 2022. Molnupiravir for Oral Treatment of Covid-19 in Nonhospitalized Patients. *N. Engl. J. Med.* 386, 509–520. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2116044>
- Jevons, M.P., 1961. “Celbenin” - resistant Staphylococci. *Br Med J* 1961 Jan 14;152:19124-5.

Références bibliographiques

- Jin Dong-Zhe, Min, Z.-D., Chiou, G.C.Y., Iinuma, M., Tanaka, T., 1996. Two p-coumaroyl glycerides from *Juncus effusus*. *Phytochemistry* 41, 545–547. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00648-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00648-6)
- Johani, K., Fritz, B.G., Bjarnsholt, T., Lipsky, B.A., Jensen, S.O., Yang, M., Dean, A., Hu, H., Vickery, K., Malone, M., 2019. Understanding the microbiome of diabetic foot osteomyelitis: insights from molecular and microscopic approaches. *Clin. Microbiol. Infect.* 25, 332–339. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.04.036>
- Johani, K., Malone, M., Jensen, S., Gosbell, I., Dickson, H., Hu, H., Vickery, K., 2017. Microscopy visualisation confirms multi-species biofilms are ubiquitous in diabetic foot ulcers. *Int. Wound J.* 14, 1160–1169. <https://doi.org/10.1111/iwj.12777>
- Johnson, A.T., Smith, H.A., 1972. *Plant Names Simplified: Their Pronunciation Derivation and Meaning*. Landsmans Bookshop, Buckenhill.
- Jonas, O.B., Irwin, A., Berthe, F.C.J., Le Gall, F.G., Marquez, P.V., 2017. Drug-resistant infections: a treat to our economic future. HNP/Agriculture Global Antimicrobial Resistance Initiative Washington, D.C.: World Bank Group. <https://documents1.worldbank.org/curated/en/323311493396993758/pdf/final-report.pdf>
- Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., Daszak, P., 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990–993. <https://doi.org/10.1038/nature06536>
- Jones, S.M., Morgan, M., Humphrey, T.J., Lappin-Scott, H., 2001. Effect of vancomycin and rifampicin on meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Lancet Lond. Engl.* 357, 40–41. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03572-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03572-8)
- Jones, V., Richards, P.W., 1954. *Juncus acutus* L. *J. Ecol.* 42, 639–650. <https://doi.org/10.2307/2256896>
- Junthip, J., Tabary, N., Leclercq, L., Martel, B., 2015. Cationic β -cyclodextrin polymer applied to a dual cyclodextrin polyelectrolyte multilayer system. *Carbohydr. Polym.* 126, 156–167. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.02.064>
- Jutkina, J., Marathe, N.P., Flach, C.-F., Larsson, D.G.J., 2018. Antibiotics and common antibacterial biocides stimulate horizontal transfer of resistance at low concentrations. *Sci. Total Environ.* 616–617, 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.312>
- Kang, L., He, G., Sharp, A.K., Wang, X., Brown, A.M., Michalak, P., Weger-Lucarelli, J., 2021. A selective sweep in the Spike gene has driven SARS-CoV-2 human adaptation. *Cell* 184, 4392–4400.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.07.007>
- Karkman, A., Pärnänen, K., Larsson, D.G.J., 2019. Fecal pollution can explain antibiotic resistance gene abundances in anthropogenically impacted environments. *Nat. Commun.* 10, 80. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07992-3>
- Katayama, Y., Ito, T., Hiramatsu, K., 2000. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*.

Antimicrob. Agents Chemother. 44, 1549–1555. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.6.1549-1555.2000>

Kawase, M., Shirato, K., Matsuyama, S., Taguchi, F., 2009. Protease-mediated entry via the endosome of human coronavirus 229E. *J. Virol.* 83, 712–721. <https://doi.org/10.1128/JVI.01933-08>

Kayumov, A.R., Khakimullina, E.N., Sharafutdinov, I.S., Trizna, E.Y., Latypova, L.Z., Thi Lien, H., Margulis, A.B., Bogachev, M.I., Kurbangalieva, A.R., 2015. Inhibition of biofilm formation in *Bacillus subtilis* by new halogenated furanones. *J. Antibiot. (Tokyo)* 68, 297–301. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.143>

Khan, S., Ahmad, I., Shah, M.T., Rehman, S., Khaliq, A., 2009. Use of constructed wetland for the removal of heavy metals from industrial wastewater. *J. Environ. Manage.* 90, 3451–3457. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2009.05.026>

Khoo, S.H., Fitzgerald, R., Fletcher, T., Ewings, S., Jaki, T., Lyon, R., Downs, N., Walker, L., Tansley-Hancock, O., Greenhalf, W., Woods, C., Reynolds, H., Marwood, E., Mozgunov, P., Adams, E., Bullock, K., Holman, W., Bula, M.D., Gibney, J.L., Saunders, G., Corkhill, A., Hale, C., Thorne, K., Chiong, J., Condie, S., Pertinez, H., Painter, W., Wrixon, E., Johnson, L., Yeats, S., Mallard, K., Radford, M., Fines, K., Shaw, V., Owen, A., Lalloo, D.G., Jacobs, M., Griffiths, G., 2021. Optimal dose and safety of molnupiravir in patients with early SARS-CoV-2: a Phase I, open-label, dose-escalating, randomized controlled study. *J. Antimicrob. Chemother.* 76, 3286–3295. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab318>

Koch, J., Uckele, Z.M., Doldan, P., Stanifer, M., Boulant, S., Lozach, P.-Y., 2021. TMPRSS2 expression dictates the entry route used by SARS-CoV-2 to infect host cells. *EMBO J.* 40, e107821. <https://doi.org/10.15252/embj.2021107821>

Koetting, M.C., Peters, J.T., Steichen, S.D., Peppas, N.A., 2015. Stimulus-responsive hydrogels: Theory, modern advances, and applications. *Mater. Sci. Eng. R Rep.* 93, 1–49. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2015.04.001>

Kono, H., Teshirogi, T., 2015. Cyclodextrin-grafted chitosan hydrogels for controlled drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* 72, 299–308. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.08.030>

Kovács, A., Vasas, A., Hohmann, J., 2008. Natural phenanthrenes and their biological activity. *Phytochemistry* 69, 1084–1110. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.12.005>

Kuhnlein, H., Turner, N., 1991. Traditional Plant Foods of Canadian Indigenous Peoples: Nutrition, Botany and Use. <https://doi.org/10.4324/9781003054689>

Kwiecinski, J.M., Jacobsson, G., Horswill, A.R., Josefsson, E., Jin, T., 2019. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* clinical isolates correlates with the infection type. *Infect. Dis.* 51, 446–451. <https://doi.org/10.1080/23744235.2019.1593499>

Kwon, A.S., Park, G.C., Ryu, S.Y., Lim, D.H., Lim, D.Y., Choi, C.H., Park, Y., Lim, Y., 2008. Higher biofilm formation in multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 32, 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.02.009>

Références bibliographiques

- Ladislav, S., Gérente, C., Chazarenc, F., Brisson, J., Andrès, Y., 2013. Performances of Two Macrophytes Species in Floating Treatment Wetlands for Cadmium, Nickel, and Zinc Removal from Urban Stormwater Runoff. *Water. Air. Soil Pollut.* 224, 1408. <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1408-x>
- Lahsissene, H., Kahouadjia, A., Tijane, M., Hseini, 2009. Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc occidental), *Lejeunia : revue de botanique. Les Éditions de Lejeunia*.
- Lakhdari, W., Dehliz, A., Mlik, R., Hammi, H., Doumandji-Mitiche, B., Gheriani, S., Berrekbia, M., Guermit, K., Chergui, S., 2016. Ethnobotanical study of some plants used in traditional medicine in the region of Oued Righ (Algerian Sahara). *Journal of Medicinal Plants Studies* 204, 204–211.
- Lambinon, J., Verloove, F., 2015. Nouvelle flore de la Belgique, du Grand-Duché de Luxembourg, du Nord de la France et des Régions voisines (Ptéridophytes et Spermatophytes), *Edition du Jardin Botanique Meise. ed.*
- Le Floc'h, E., Boulos, L., Vêla, E., 2010. Catalogue Synonymique Commenté De La Flore De Tunisie.
- Lebeaux, D., Chauhan, A., Rendueles, O., Beloin, C., 2013. From *in vitro* to *in vivo* Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathogens* 2, 288–356. <https://doi.org/10.3390/pathogens2020288>
- Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., 2012. Infections associées aux biofilms. *Med Sci Paris* 28, 727–739. <https://doi.org/10.1051/medsci/2012288015>
- Lee, B., Moon, K.M., Kim, C.Y., 2018. Tight Junction in the Intestinal Epithelium: Its Association with Diseases and Regulation by Phytochemicals. *J. Immunol. Res.* 2018, 2645465. <https://doi.org/10.1155/2018/2645465>
- Lee, E.Y.P., Ng, M.-Y., Khong, P.-L., 2020. COVID-19 pneumonia: what has CT taught us? *Lancet Infect. Dis.* 20, 384–385. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30134-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30134-1)
- Lee, J.-H., Jung, Y., Lee, S.-K., Kim, J., Lee, C.-S., Kim, S., Lee, J.-S., Kim, N.-H., Kim, H.-G., 2022. Rapid Biosensor of SARS-CoV-2 Using Specific Monoclonal Antibodies Recognizing Conserved Nucleocapsid Protein Epitopes. *Viruses* 14. <https://doi.org/10.3390/v14020255>
- Lekagul, A., Tangcharoensathien, V., Yeung, S., 2019. Patterns of antibiotic use in global pig production: A systematic review. *Vet. Anim. Sci.* 7, 100058. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2019.100058>
- Levison, M.E., 2004. Pharmacodynamics of antimicrobial drugs. *Antibact. Ther. Newer Agents* 18, 451–465. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2004.04.012>
- Li, J., Feng, W., Dai, R., Li, B., 2022. Recent Progress on the Identification of Phenanthrene Derivatives in Traditional Chinese Medicine and Their Biological Activities. *Pharmacol. Res. - Mod. Chin. Med.* 3, 100078. <https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2022.100078>

- Li, L., Wang, X., Hua, Y., Liu, P., Zhou, J., Chen, Jing, An, F., Hou, F., Huang, W., Chen, Jinping, 2021. Epidemiological Study of Betacoronaviruses in Captive Malayan Pangolins. *Front. Microbiol.* 12, 657439. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.657439>
- Li, R.C., Lee, S.W., Kong, C.H., 1997. Correlation between bactericidal activity and postantibiotic effect for five antibiotics with different mechanisms of action. *J. Antimicrob. Chemother.* 40, 39–45. <https://doi.org/10.1093/jac/40.1.39>
- Lipsky, B.A., Aragón-Sánchez, J., Diggle, M., Embil, J., Kono, S., Lavery, L., Senneville, É., Urbančič-Rovan, V., Van Asten, S., on behalf of the International Working Group on the Diabetic Foot (IWGDF), 2016. IWGDF guidance on the diagnosis and management of foot infections in persons with diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 32, 45–74. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2699>
- Liu, J., Pan, X., Zhang, S., Li, M., Ma, K., Fan, C., Lv, Y., Guan, X., Yang, Y., Ye, X., Deng, X., Wang, Y., Qin, L., Xia, Z., Ge, Z., Zhou, Q., Zhang, X., Ling, Y., Qi, T., Wen, Z., Huang, S., Zhang, L., Wang, T., Liu, Y., Huang, Y., Li, W., Du, H., Chen, Y., Xu, Y., Zhao, Q., Zhao, R., Annane, D., Qu, J., Chen, D., 2023. Efficacy and safety of Paxlovid in severe adult patients with SARS-Cov-2 infection: a multicenter randomized controlled study. *Lancet Reg. Health – West. Pac.* 33. <https://doi.org/10.1016/j.lanwpc.2023.100694>
- Liu, W., Meng, M., Zhang, B., Du, L., Pan, Y., Yang, P., Gu, Z., Zhou, Q., Cao, Z., 2015. Dehydroeffusol effectively inhibits human gastric cancer cell-mediated vasculogenic mimicry with low toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 287, 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.05.003>
- Liu, Y., Gayle, A.A., Wilder-Smith, A., Rocklöv, J., 2020. The reproductive number of COVID-19 is higher compared to SARS coronavirus. *J. Travel Med.* 27. <https://doi.org/10.1093/jtm/taaa021>
- Liu, Y., Lin, T., Cheng, C., Wang, Q., Lin, S., Liu, C., Han, X., 2021. Research Progress on Synthesis and Application of Cyclodextrin Polymers. *Mol. Basel Switz.* 26. <https://doi.org/10.3390/molecules26041090>
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., Chen, J., Meng, Y., Wang, J., Lin, Y., Yuan, J., Xie, Z., Ma, J., Liu, W.J., Wang, D., Xu, W., Holmes, E.C., Gao, G.F., Wu, G., Chen, W., Shi, W., Tan, W., 2020. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet* 395, 565–574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
- Ma, W., Liu, F., Ding, Y.-Y., Zhang, Y., Li, N., 2015. Four new phenanthrenoid dimers from *Juncus effusus* L. with cytotoxic and anti-inflammatory activities. *Fitoterapia* 105, 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.06.006>
- Ma, W., Zhang, Y., Ding, Y.-Y., Liu, F., Li, N., 2016. Cytotoxic and anti-inflammatory activities of phenanthrenes from the medullae of *Juncus effusus* L. *Arch. Pharm. Res.* 39, 154–160. <https://doi.org/10.1007/s12272-015-0680-x>

Références bibliographiques

- Macía, M., 2001. Economic use of Totorilla (*Juncus arcticus*, Juncaceae) in Ecuador. *Econ. Bot.* 55, 236–242. <https://doi.org/10.1007/BF02864561>
- MacKenzie, F.M., Gould, I.M., 1993. The post-antibiotic effect. *J. Antimicrob. Chemother.* 32, 519–537. <https://doi.org/10.1093/jac/32.4.519>
- MacLowry, J.D., Jaqua, M.J., Selepak, S.T., 1970. Detailed methodology and implementation of a semiautomated serial dilution microtechnique for antimicrobial susceptibility testing. *Appl. Microbiol.* 20, 46–53. <https://doi.org/10.1128/am.20.1.46-53.1970>
- Mahieux, S., Nieto-Bobadilla, M., Houcke, I., Neut, C., 2018. How to Study Antimicrobial Activities of Plant Extracts: A Critical Point of View. pp. 55–71. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67045-4_3
- Mahmoud, T., Sanjay, S., 2013. Traditional knowledge and use of medicinal plants in the Eastern Desert of Egypt: a case study from Wadi El-Gemal National Park. *J. Med. Plants Stud.* 1, 10–17. <https://www.plantsjournal.com/archives/2013/vol1issue6/PartA/3.1.pdf>
- Mali, K.R., Eerike, M., Raj, G.M., Bisoi, D., Priyadarshini, R., Ravi, G., Chaliserry, L.F., Janti, S.S., 2022. Efficacy and safety of Molnupiravir in COVID-19 patients: a systematic review. *Ir. J. Med. Sci.* 1971 -. <https://doi.org/10.1007/s11845-022-03139-y>
- Mansour, R.M.A., Zahran, M.A., Saleh, N.A.M., 1986. Flavonoids and ecology of *Juncus acutus* and *Juncus rigidus* in Egypt. *Egypt J Bot* 29, 161–166.
- Marone, D., Mastrangelo, A.M., Borrelli, G.M., Mores, A., Laidò, G., Russo, M.A., Ficco, D.B.M., 2022. Specialized metabolites: Physiological and biochemical role in stress resistance, strategies to improve their accumulation, and new applications in crop breeding and management. *Plant Physiol. Biochem.* 172, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.12.037>
- Martel, B., Morcellet, M., Ruffin, D., Ducoroy, L., Weltrowski, M., 2002. Finishing of Polyester Fabrics with Cyclodextrins and Polycarboxylic Acids as Crosslinking Agents. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 44, 443–446. <https://doi.org/10.1023/A:1023080221850>
- Martel, B., Ruffin, D., Weltrowski, M., Lekchiri, Y., Morcellet, M., 2005. Water-soluble polymers and gels from the polycondensation between cyclodextrins and poly(carboxylic acid)s: A study of the preparation parameters. *J. Appl. Polym. Sci.* 97, 433–442. <https://doi.org/10.1002/app.21391>
- Martinez-Urtaza, J., Trinanès, J., Gonzalez-Escalona, N., Baker-Austin, C., 2016. Is El Niño a long-distance corridor for waterborne disease? *Nat. Microbiol.* 1, 16018. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.18>
- Masters, P.S., Perlman, S., 2013. Coronaviridae. *Fields Virol.* 1, 825–858.
- Matsuyama, S., Nagata, N., Shirato, K., Kawase, M., Takeda, M., Taguchi, 2010. Efficient Activation of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein by the Transmembrane Protease TMPRSS2. *J. Virol.* 84, 12658–12664. <https://doi.org/10.1128/JVI.01542-10>

Références bibliographiques

- McArthur, D.B., 2019. Emerging Infectious Diseases. *Nurs. Clin. North Am.* 54, 297–311. <https://doi.org/10.1016/j.cnur.2019.02.006>
- McEwen, S.A., Collignon, P.J., 2018. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective, in: *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals*. pp. 521–547. <https://doi.org/10.1128/9781555819804.ch25>
- McMichael, C., 2015. Climate change-related migration and infectious disease. *Virulence* 6, 548–553. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1021539>
- Mehta, Y., Mishra, K.C., Paliwal, Y., Rangappa, P., Sinha, S., Bhapkar, S., 2022. Meeting the Unmet Need in the Management of MDR Gram-Positive Infections with Oral Bactericidal Agent Levonadifloxacin. *Crit. Care Res. Pract.* 2022, 2668199. <https://doi.org/10.1155/2022/2668199>
- Menendez-Baceta, G., Aceituno-Mata, L., Molina, M., Reyes-García, V., Tardío, J., Pardo-de-Santayana, M., 2014. Medicinal plants traditionally used in the northwest of the Basque Country (Biscay and Alava), Iberian Peninsula. *J. Ethnopharmacol.* 152, 113–134. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.12.038>
- Menendez-Baceta, G., Aceituno-Mata, L., Reyes-García, V., Tardío, J., Salpeteur, M., Pardo-de-Santayana, M., 2015. The importance of cultural factors in the distribution of medicinal plant knowledge: A case study in four Basque regions. *J. Ethnopharmacol.* 161, 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.12.007>
- Menon, R., Holland, M.M., 2013. Phosphorus Retention in Constructed Wetlands Vegetated with *Juncus effusus*, *Carex lurida*, and *Dichanthelium acuminatum* var. *acuminatum*. *Water. Air. Soil Pollut.* 224, 1602. <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1602-5>
- Mensa, B., Howell, G.L., Scott, R., DeGrado, W.F., 2014. Comparative mechanistic studies of brilacidin, daptomycin, and the antimicrobial peptide LL16. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5136–5145. <https://doi.org/10.1128/AAC.02955-14>
- Menuel, S., Joly, J.-P., Courcot, B., Elysée, J., Ghermani, N.-E., Marsura, A., 2007. Synthesis and inclusion ability of a bis- β -cyclodextrin pseudo-cryptand towards Busulfan anticancer agent. *Tetrahedron* 63, 1706–1714. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.10.070>
- Merchaoui, H., Ksouri, R., Abdelly, C., Hanana, M., 2022. Halophytes.tn: an innovative database for Tunisian halophyte plant identification, distribution and characterization. *Database J. Biol. Databases Curation* 2022. <https://doi.org/10.1093/database/baab082>
- Meunier, T., Desmarests, L., Bordage, S., Bamba, M., Hervouet, Rouillé, Y., François, N., Decossas, M., Sencio, V., Trottein, F., Lambert Olivier, Dubuisson Jean, Belouzard Sandrine, Sahpaz Sevser, Séron Karin, 2022. A Photoactivable Natural Product with Broad Antiviral Activity against Enveloped Viruses, Including Highly Pathogenic Coronaviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 66, e01581-21. <https://doi.org/10.1128/AAC.01581-21>

- Micoli, F., Bagnoli, F., Rappuoli, R., Serruto, D., 2021. The role of vaccines in combatting antimicrobial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 287–302. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00506-3>
- Miguel, B., Edell, A., Edson, Y., Edwin, P., 2013. A phytoremediation approach using *Calamagrostis ligulata* and *Juncus imbricatus* in Andean wetlands of Peru. *Environ. Monit. Assess.* 185, 323–334. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2552-x>
- Miles, D.H., Bhattacharyya, J., Mody, N.V., Atwood, J.L., Black, S., Hedin, P.A., 1977. The structure of juncusol. A novel cytotoxic dihydrophenanthrene from the Estuarine marsh plant *Juncus roemerianus*. *J. Am. Chem. Soc.* 99, 618–620. <https://doi.org/10.1021/ja00444a056>
- Miles, D.H., Mody, N.V., Minyard, J., Hedin, P.A., 1973. Constituents of marsh grass: Survey of the essential oils in *Juncus roemerianus*. *Phytochemistry* 12, 1399–1404. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(73\)80573-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(73)80573-4)
- Mody, N.V., Mahmoud, I.I., Finer-Moore, J., Pelletier, S.W., 1982. Constituents of *Juncus effusus*: The X-ray Analysis of Effusol Diacetate. *J. Nat. Prod.* 45, 733–737. <https://doi.org/10.1021/np50024a017>
- Mogrovejo-Valdivia, A., Rahmouni, O., Tabary, N., Maton, M., Neut, C., Martel, B., Blanchemain, N., 2019. *In vitro* evaluation of drug release and antibacterial activity of a silver-loaded wound dressing coated with a multilayer system. *Int. J. Pharm.* 556, 301–310. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.12.018>
- Morgan, D.D., Horgan, S.W., Orchin, M., 1970. Photocyclization of stilbene analogs I. The oxidative photocyclization of 1,3-distyrylbenzene. *Tetrahedron Lett.* 11, 4347–4350. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)89482-4](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)89482-4)
- Moriguchi, T., Harii, N., Goto, J., Harada, D., Sugawara, H., Takamino, J., Ueno, M., Sakata, H., Kondo, K., Myose, N., Nakao, A., Takeda, M., Haro, H., Inoue, O., Suzuki-Inoue, K., Kubokawa, K., Ogihara, S., Sasaki, T., Kinouchi, H., Kojin, H., Ito, M., Onishi, H., Shimizu, T., Sasaki, Y., Enomoto, N., Ishihara, H., Furuya, S., Yamamoto, T., Shimada, S., 2020. A first case of meningitis/encephalitis associated with SARS-Coronavirus-2. *Int. J. Infect. Dis.* 94, 55–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.062>
- Morteza Bahram, Naimeh Mohseni, Mehdi Moghtader, 2016. An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications, in: *Sutapa Biswas Majee (Ed.), Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels. IntechOpen, Rijeka*, p. Ch. 2. <https://doi.org/10.5772/64301>
- Moustafa, S., El-Alfy, T., Hasan, N., Abou El-Seoud, K., 2002. Inhibitory effect of flavonoids isolated from some *Juncus species* (flowers & callus) on blood platelets aggregation. *Bull. Pharm. Sci. Assiut* 25, 43–52. <https://doi.org/10.21608/bfsa.2002.65508>
- Mubarak, A., Alturaiki, W., Hemida, M.G., 2019. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV): Infection, Immunological Response, and Vaccine Development. *J. Immunol. Res.* 2019, 6491738. <https://doi.org/10.1155/2019/6491738>

Références bibliographiques

Murphy-Lavoie, H.M., Ramsey, A., Nguyen, M., Singh, S., 2022. Diabetic Foot Infections., in: *StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL)*. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.ressources-electroniques.univ-lille.fr/28722943/>

Muxika, A., Etxabide, A., Uranga, J., Guerrero, P., de la Caba, K., 2017. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 105, 1358–1368. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.087>

Muzzarelli, R.A.A., 2009. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydr. Polym.* 77, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.01.016>

Najjar-Debbiny, R., Gronich, N., Weber, G., Khoury, J., Amar, M., Stein, N., Goldstein, L.H., Saliba, W., 2023. Effectiveness of Paxlovid in Reducing Severe Coronavirus Disease 2019 and Mortality in High-Risk Patients. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 76, e342–e349. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac443>

Neely, M.N., Youn, G., Jones, B., Jelliffe, R.W., Drusano, G.L., Rodvold, K.A., Lodise, T.P., 2014. Are vancomycin trough concentrations adequate for optimal dosing? *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 309–316. <https://doi.org/10.1128/AAC.01653-13>

NIAIDs. « NIAID Novel Coronavirus SARS-CoV-2 » [en ligne]. Disponible sur : <https://www.flickr.com/photos/niaid/49534865371/>. (consulté le 06 Juin 2023).

Noviello, S., Huang, D.B., Corey, G.R., 2018. Iclaprim: a differentiated option for the treatment of skin and skin structure infections. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 16, 793–803. <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1536545>

Nunes da Silva, M., Mucha, A.P., Rocha, A.C., Silva, C., Carli, C., Gomes, C.R., Almeida, C.M.R., 2014. Evaluation of the ability of two plants for the phytoremediation of Cd in salt marshes. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 141, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2014.03.004>

OECD, 2018 « Stemming the superbug tide, OECD health policy studies » [en ligne]. Disponible sur : <https://www.oecd-ilibrary.org/sites/9789264307599-en/index.html?itemId=/content/publication/9789264307599-en&csp=33f7c05cefd0845031c4db9085aa0f90&itemIGO=oecd&itemContentType=book>. (consulté le 01 Août 2023).

OMS. « Coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV) - Arabie saoudite - Arabie Saoudite » [en ligne]. Disponible sur : <https://www.who.int/fr/emergencies/disease-outbreak-news/item/2022-DON422>. (consulté le 06 Juin 2023).

O'Neill, J., 2016. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. <https://apo.org.au/node/63983>

O'Neill, J., 2014. Review on antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Antimicrob. Resist. Tackling Crisis Health Wealth Nations* 2014, 20. https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf

Références bibliographiques

O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R., 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 49–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>

Orchidées en Nord. « *Juncus inflexus* L., » [en ligne]. Disponible sur : <https://www.orchid-nord.com/Flore-France/Juncaceae/Juncus%20inflexus/Juncus-inflexus.html>. (consulté le 03 Juin 2023).

Orchidées en Nord. « *Juncus maritimus* Lam., » [en ligne]. Disponible sur : <https://www.orchid-nord.com/Flore-France/Juncaceae/Juncus%20maritimus/Juncus-maritimus.html>. (consulté le 06 Juin 2023).

Ouarghidi, A., Martin, G.J., Powell, B., Esser, G., Abbad, A., 2013. Botanical identification of medicinal roots collected and traded in Morocco and comparison to the existing literature. *J. Ethnobiol. Ethnomedicine* 9, 59. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-9-59>

Ouerghemmi, S., Degoutin, S., Tabary, N., Cazaux, F., Maton, M., Gaucher, V., Janus, L., Neut, C., Chai, F., Blanchemain, N., Martel, B., 2016. Triclosan loaded electrospun nanofibers based on a cyclodextrin polymer and chitosan polyelectrolyte complex. *Int. J. Pharm.* 513, 483–495. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.09.060>

Painter, W.P., Holman, W., Bush, J.A., Almazedi, F., Malik, H., Eraut, N.C.J.E., Morin, M.J., Szewczyk, L.J., Painter, G.R., 2021. Human Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Molnupiravir, a Novel Broad-Spectrum Oral Antiviral Agent with Activity Against SARS-CoV-2. *Antimicrob. Agents Chemother.* 65, AAC.02428-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.02428-20>

Palomino-Durand, C., 2019. Hydrogels injectables et éponges à base de complexe polyélectrolytes (chitosane/polymère de cyclodextrine) pour une application en ingénierie tissulaire osseuse. Université de Lille. <https://theses.hal.science/tel-02275357/document>

Palomino-Durand, C., Lopez, M., Cazaux, F., Martel, B., Blanchemain, N., Chai, F., 2019. Influence of the Soluble–Insoluble Ratios of Cyclodextrins Polymers on the Viscoelastic Properties of Injectable Chitosan–Based Hydrogels for Biomedical Application. *Polymers* 11. <https://doi.org/10.3390/polym11020214>

Paniz-Mondolfi, A., Bryce, C., Grimes, Z., Gordon, R.E., Reidy, J., Lednický, J., Sordillo, E.M., Fowkes, M., 2020. Central nervous system involvement by severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *J. Med. Virol.* 92, 699–702. <https://doi.org/10.1002/jmv.25915>

Parrino, B., Schillaci, D., Carnevale, I., Giovannetti, E., Diana, P., Cirrincione, G., Cascioferro, S., 2019. Synthetic small molecules as anti-biofilm agents in the struggle against antibiotic resistance. *Eur. J. Med. Chem.* 161, 154–178. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.10.036>

Penesyan, A., Gillings, M., Paulsen, I.T., 2015. Antibiotic Discovery: Combatting Bacterial Resistance in Cells and in Biofilm Communities. *Molecules* 20, 5286–5298. <https://doi.org/10.3390/molecules20045286>

Petersen, E., Koopmans, M., Go, U., Hamer, D.H., Petrosillo, N., Castelli, F., Storgaard, M., Al Khalili, S., Simonsen, L., 2020. Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza

pandemics. *Lancet Infect. Dis.* 20, e238–e244. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30484-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30484-9)

Petersen, E., Petrosillo, N., Koopmans, M., 2018. Emerging infections-an increasingly important topic: review by the Emerging Infections Task Force. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 24, 369–375. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.035>

Pichot, A., Mimoz, O., Couet, W., 2013. Pharmacologie des antibiotiques en reanimation. https://sofia.medicalistes.fr/spip/IMG/pdf/Pharmacologie_des_antibiotiques_en_reanimation.pdf

Pinho, E., Grootveld, M., Soares, G., Henriques, M., 2014. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydr. Polym.* 101, 121–135. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.078>

Plichta, J., Kuna, P., Panek, M., 2022. Monoclonal Antibodies as Potential COVID-19 Therapeutic Agents. *COVID 2*, 599–620. <https://doi.org/10.3390/covid2050045>

Pokhrel, R., Chapagain, P., Siltberg-Liberles, J., 2020. Potential RNA-dependent RNA polymerase inhibitors as prospective therapeutics against SARS-CoV-2. *J. Med. Microbiol.* 69, 864–873. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001203>

Puelles, V.G., Lütgehetmann, M., Lindenmeyer, M.T., Sperhake, J.P., Wong, M.N., Allweiss, L., Chilla, S., Heinemann, A., Wanner, N., Liu, S., Braun, F., Lu, S., Pfefferle, S., Schröder, A.S., Edler, C., Gross, O., Glatzel, M., Wichmann, D., Wiech, T., Kluge, S., Puschel, K., Aepfelbacher, M., Huber, T.B., 2020. Multiorgan and Renal Tropism of SARS-CoV-2. *N. Engl. J. Med.* 383, 590–592. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2011400>

Qi, J., Jiang, W., Chen, G., Zhou, D., Li, N., 2020. Studies on the chemical components and biological activities of the genus of *Juncus*. *Asian J. Tradit. Med.* 15, 375–393.

Qi, Z.H., Sikorski, C.T., 1999. Controlled delivery using cyclodextrin technology. *ACS Publications*.

Quincampoix, J.C., Mainardi, J.L., 2001. Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. *Réanimation* 10, 267–275. [https://doi.org/10.1016/S1164-6756\(01\)00114-1](https://doi.org/10.1016/S1164-6756(01)00114-1)

Raafat, D., von Bargen, K., Haas, A., Sahl, H.-G., 2008. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3764–3773. <https://doi.org/10.1128/AEM.00453-08>

Raghavan, S.R., Cipriano, B.H., 2005. Gel Formation: Phase Diagrams Using Tabletop Rheology and Calorimetry, in: *Molecular Gels: Materials with Self-Assembled Fibrillar Networks*. Springer Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/1-4020-3689-2>

Rakholiya, K.D., Kaneria, M.J., Chanda, S.V., 2013. Chapter 11 - Medicinal Plants as Alternative Sources of Therapeutics against Multidrug-Resistant Pathogenic Microorganisms Based on Their Antimicrobial Potential and Synergistic Properties, in: *Rai, M.K., Kon, K.V. (Eds.), Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their*

Références bibliographiques

Components. Academic Press, San Diego, pp. 165–179. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398539-2.00011-2>

Raspovic, K.M., Wukich, D.K., 2014. Self-reported quality of life and diabetic foot infections. *J. Foot Ankle Surg. Off. Publ. Am. Coll. Foot Ankle Surg.* 53, 716–719. <https://doi.org/10.1053/j.jfas.2014.06.011>

Reisch, J., Gombos, M., Szendrei, K., Novák, I., 1974. [Thebaol, component of opium]. *Arch. Pharm. (Weinheim)* 307, 814–816. <https://doi.org/10.1002/ardp.19743071015>

Rhouma, M., Beaudry, F., Thériault, W., Letellier, A., 2016. Colistin in Pig Production: Chemistry, Mechanism of Antibacterial Action, Microbial Resistance Emergence, and One Health Perspectives. *Front. Microbiol.* 7, 1789. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01789>

Rikli, M., 1943. Das Pflanzenkleid der Mittelmeerländer. H. Huber.

Rodrigues, M.J., Gangadhar, K.N., Vizetto-Duarte, C., Wubshet, S.G., Nyberg, N.T., Barreira, L., Varela, J., Custódio, L., 2014. Maritime Halophyte Species from Southern Portugal as Sources of Bioactive Molecules. *Mar. Drugs* 12, 2228–2244. <https://doi.org/10.3390/md12042228>

Rolta, R., Kumar, V., Sourirajan, A., Upadhyay, N.K., Dev, K., 2020. Bioassay guided fractionation of rhizome extract of *Rheum emodi* wall as bio-availability enhancer of antibiotics against bacterial and fungal pathogens. *J. Ethnopharmacol.* 257, 112867. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112867>

Rosenke, K., Hansen, F., Schwarz, B., Feldmann, F., Haddock, E., Rosenke, R., Barbian, K., Meade-White, K., Okumura, A., Leventhal, S., Hawman, D.W., Ricotta, E., Bosio, C.M., Martens, C., Saturday, G., Feldmann, H., Jarvis, M.A., 2021. Orally delivered MK-4482 inhibits SARS-CoV-2 replication in the Syrian hamster model. *Nat. Commun.* 12, 2295. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22580-8>

Rukavina, Z., Šegvić Klarić, M., Filipović-Grčić, J., Lovrić, J., Vanić, Ž., 2018. Azithromycin-loaded liposomes for enhanced topical treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections. *Int. J. Pharm.* 553, 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.10.024>

Sabadini, E., Cosgrove, T., Egídio, F. do C., 2006. Solubility of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) in H₂O and D₂O: a comparative study. *Carbohydr. Res.* 341, 270–274. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.11.004>

Sabir, J.S.M., Lam, T.T.-Y., Ahmed, M.M.M., Li, L., Shen, Y., Abo-Aba, S.E.M., Qureshi, M.I., Abu-Zeid, M., Zhang, Y., Khiyami, M.A., Alharbi, N.S., Hajrah, N.H., Sabir, M.J., Mutwakil, M.H.Z., Kabli, S.A., Alsulaimany, F.A.S., Obaid, A.Y., Zhou, B., Smith, D.K., Holmes, E.C., Zhu, H., Guan, Y., 2016. Co-circulation of three camel coronavirus species and recombination of MERS-CoVs in Saudi Arabia. *Science* 351, 81–84. <https://doi.org/10.1126/science.aac8608>

Sahli, R., 2017. Etude phytochimique de quelques plantes extrêmophiles tunisiennes et exploration de leurs activités biologiques. Université de Lille & Institut National des Sciences

Appliquées et de Technologie. <https://pepite-depot.univ-lille.fr/LIBRE/EDBSL/2017/2017LIL2S016.pdf>

Sahli, R., Rivière, C., Neut, C., Bero, J., Sahuc, M.-E., Smaoui, A., Beaufay, C., Roumy, V., Hennebelle, T., Rouillé, Y., Quetin-Leclercq, J., Séron, K., Ksouri, R., Sahpaz, S., 2017. An ecological approach to discover new bioactive extracts and products: the case of extremophile plants. *J. Pharm. Pharmacol.* 69, 1041–1055. <https://doi.org/10.1111/jphp.12728>

Sahli, R., Rivière, C., Siah, A., Smaoui, A., Samaillie, J., Hennebelle, T., Roumy, V., Ksouri, R., Halama, P., Sahpaz, S., 2018. Biocontrol activity of effusol from the extremophile plant, *Juncus maritimus*, against the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 29775–29783. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9043-0>

Sahuc, M.-E., Sahli, R., Rivière, C., Pène, V., Lavie, M., Vandeputte, A., Brodin, P., Rosenberg, A.R., Dubuisson, J., Ksouri, R., Rouillé, Y., Sahpaz, S., Séron, K., 2019. Dehydrojuncusol, a Natural Phenanthrene Compound Extracted from *Juncus maritimus*, Is a New Inhibitor of Hepatitis C Virus RNA Replication. *J. Virol.* 93. <https://doi.org/10.1128/JVI.02009-18>

Saiman, L., 2007. Clinical utility of synergy testing for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis: ‘the motion for.’ *Paediatr. Respir. Rev.* 8, 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2007.04.006>

Sallam, M., Ababneh, N.A., Dababseh, D., Bakri, F.G., Mahafzah, A., 2021. Temporal increase in D614G mutation of SARS-CoV-2 in the Middle East and North Africa. *Heliyon* 7, e06035. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06035>

Santos, J., Al-Azzawi, M., Aronson, J., Flowers, T.J., 2016. eHALOPH a Database of Salt-Tolerant Plants: Helping put Halophytes to Work. *Plant Cell Physiol.* 57, e10–e10. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv155>

Saokham, P., Muankaew, C., Jansook, P., Loftsson, T., 2018. Solubility of Cyclodextrins and Drug/Cyclodextrin Complexes. *Mol. Basel Switz.* 23. <https://doi.org/10.3390/molecules23051161>

Sarkar, H., Zerezhghi, M., Bhattacharyya, J., 1988. Dehydrojuncusol, a constituent of the roots of *Juncus roemerianus*. *Phytochemistry* 27, 3006–3008. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80714-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80714-3)

Schindell, B.G., Allardice, M., McBride, J.A.M., Dennehy, B., Kindrachuk, J., 2022. SARS-CoV-2 and the Missing Link of Intermediate Hosts in Viral Emergence - What We Can Learn From Other Betacoronaviruses. *Front. Virol.* 2. <https://doi.org/10.3389/fviro.2022.875213>

Sen, D.N., Rajpurohit, K.S., 1982. Contributions to the ecology of halophytes. *Springer Dordrecht*.

Senefeld, J.W., Franchini, M., Mengoli, C., Cruciani, M., Zani, M., Gorman, E.K., Focosi, D., Casadevall, A., Joyner, M.J., 2023. COVID-19 Convalescent Plasma for the Treatment of Immunocompromised Patients: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw. Open* 6, e2250647–e2250647. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2022.50647>

Références bibliographiques

- Senneville, E., Brière, M., Neut, C., Messad, N., Lina, G., Richard, J.-L., Sotto, A., Lavigne, J.-P., 2014. First report of the predominance of clonal complex 398 *Staphylococcus aureus* strains in osteomyelitis complicating diabetic foot ulcers: a national French study. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, O274–O277. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12375>
- Shamekhi, M.A., Rabiee, A., Mirzadeh, H., Mahdavi, H., Mohebbi-Kalhari, D., Baghaban Eslaminejad, M., 2017. Fabrication and characterization of hydrothermal cross-linked chitosan porous scaffolds for cartilage tissue engineering applications. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 80, 532–542. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.194>
- Shan, C.-Y., Ye, Y.-H., Jiang, H.-F., Zhang, J., 2008. Study on chemical constituents isolated from *Juncus effuses*. *Zhong Yao Cai Zhongyao Cai J. Chin. Med. Mater.* 31, 374–376.
- Sharma, N., Baldi, A., 2016. Exploring versatile applications of cyclodextrins: an overview. *Drug Deliv.* 23, 729–747. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.938839>
- Shereen, M.A., Khan, S., Kazmi, A., Bashir, N., Siddique, R., 2020. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *J. Adv. Res.* 24, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.03.005>
- Shima, K., Toyota, M., Asakawa, Y., 1991. Phenanthrene derivatives from the medullae of *Juncus effusus*. *Phytochemistry* 30, 3149–3151. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)98276-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)98276-1)
- Shulla, A., Heald-Sargent, T., Subramanya, G., Zhao, J., Perlman, S., Gallagher, T., 2011. A transmembrane serine protease is linked to the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor and activates virus entry. *J. Virol.* 85, 873–882. <https://doi.org/10.1128/JVI.02062-10>
- Singh, A., Ranawat, B., Meena, R., 2019. Extraction and characterization of cellulose from halophytes: next generation source of cellulose fibre. *SN Appl. Sci.* 1, 1311. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1160-6>
- Sjöström, J.E., Löfdahl, S., Philipson, L., 1975. Transformation reveals a chromosomal locus of the gene(s) for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 123, 905–915. <https://doi.org/10.1128/jb.123.3.905-915.1975>
- Smith, K.P., James E., K., 2016. Verification of an Automated, Digital Dispensing Platform for At-Will Broth Microdilution-Based Antimicrobial Susceptibility Testing. *J. Clin. Microbiol.* 54, 2288–2293. <https://doi.org/10.1128/jcm.00932-16>
- Sommer, R., Rox, K., Wagner, S., Hauck, D., Henrikus, S.S., Newsad, S., Arnold, T., Ryckmans, T., Brönstrup, M., Imbert, A., Varrot, A., Hartmann, R.W., Titz, A., 2019. Antibiofilm Agents against *Pseudomonas aeruginosa*: A Structure–Activity Relationship Study of C-Glycosidic LecB Inhibitors. *J. Med. Chem.* 62, 9201–9216. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01120>
- Srimani, J.K., Huang, S., Lopatkin, A.J., You, L., 2017. Drug detoxification dynamics explain the postantibiotic effect. *Mol. Syst. Biol.* 13, 948. <https://doi.org/10.15252/msb.20177723>

Références bibliographiques

- Srinivasan, B., Kolli, A.R., Esch, M.B., Abaci, H.E., Shuler, M.L., Hickman, J.J., 2015. TEER measurement techniques for *in vitro* barrier model systems. *J. Lab. Autom.* 20, 107–126. <https://doi.org/10.1177/2211068214561025>
- Stefkó, D., Kúsz, N., Csorba, A., Jakab, G., Bérdi, P., Zupkó, I., Hohmann, J., Vasas, A., 2019a. Phenanthrenes from *Juncus atratus* with antiproliferative activity. *Tetrahedron* 75, 116–120. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2018.11.039>
- Stefkó, D., Kúsz, N., Csorba, A., Jakab, G., Bérdi, P., Zupkó, I., Hohmann, J., Vasas, A., 2019b. Phenanthrenes from *Juncus atratus* with antiproliferative activity. *Tetrahedron* 75, 116–120. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2018.11.039>
- Stevens, M., 2000. Plant Guide : Soft rush. https://plants.usda.gov/DocumentLibrary/plantguide/pdf/pg_juef.pdf.
- Strike, S.S., 1994. Ethnobotany of the California Indians: Aboriginal uses of California's indigenous plants. *Koeltz Scientific Books*.
- Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A.C.K., Zhou, J., Liu, W., Bi, Y., Gao, G.F., 2016. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol.* 24, 490–502. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.003>
- Su, X.-H., Yuan, Z.-P., Li, C.-Y., Zhong, Y.-J., Du, H.-J., Wen, Y.-Y., Li, Y.-F., Liang, B., 2013. Phenanthrenes from *Juncus effusus*. *Planta Med.* 79, 1447–1452. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1350768>
- Sun, H., Chow, E.C., Liu, S., Du, Y., Pang, K.S., 2008. The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 4, 395–411. <https://doi.org/10.1517/17425255.4.4.395>
- Sun, L., Fu, Q., Zhan, C.-X., Wang, X.-H., Wang, Q.-H., Pang, H.-H., Jiang, M.-F., Huang, J.-M., 2016. Phenanthrenes from aerial part of *Juncus setchuensis* with anxiolytic activity. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi Zhongguo Zhongyao Zazhi China J. Chin. Mater. Medica* 41, 1070–1074. <https://doi.org/10.4268/cjcmm20160616>
- Syranidou, E., Christofilopoulos, S., Kalogerakis, N., 2017. *Juncus spp.*—The helophyte for all (phyto)remediation purposes? *EBC-VI Recent Adv. Environ. Biotechnol.* 38, 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.12.005>
- Sysbio_base de données de systématique. « *Juncus acutus* (jonc piquant) » [en ligne]. Disponible sur : <http://sysbio.univ-lille1.fr/fiche/acutus>. (consulté le 03 Juin 2023).
- Szejtli, J., 1998. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.* 98, 1743–1754. <https://doi.org/10.1021/cr970022c>
- Tabish, S.A., Syed, N., 2015. The Future of Humanity and Microbes: Impact of Emerging Infectious Diseases on Global Health and Economies. *Int. J. Sci. Res. IJSR* 438, 2427–2442. https://www.researchgate.net/publication/275407307_The_Future_of_Humanity_and_Microbes_Impact_of_Emerging_Infectious_Diseases_on_Global_Health_and_Economies

Références bibliographiques

- Talan, D.A., Krishnadasan, A., Gorwitz, R.J., Fosheim, G.E., Limbago, B., Albrecht, V., Moran, G.J., 2011. Comparison of *Staphylococcus aureus* from skin and soft-tissue infections in US emergency department patients, 2004 and 2008. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 53, 144–149. <https://doi.org/10.1093/cid/cir308>
- Tchobanian, A., Van Oosterwyck, H., Fardim, P., 2019. Polysaccharides for tissue engineering: Current landscape and future prospects. *Carbohydr. Polym.* 205, 601–625. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.039>
- Tela Botanica. « *Juncus acutus* L., » [en ligne]. Disponible sur : <https://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-75471-synthese>. (consulté le 03 Juin 2023).
- Tela Botanica. « *Juncus inflexus* L., » [en ligne]. Disponible sur : <https://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-36551-synthese>. (consulté le 03 Juin 2023).
- Tela Botanica. « *Juncus maritimus* Lam., » [en ligne]. Disponible sur : <https://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-36591-synthese>. (consulté le 06 Juin 2023).
- Teng, Z., Yuan, C., Zhang, F., Huan, M., Cao, W., Li, K., Yang, J., Cao, D., Zhou, S., Mei, Q., 2012. Intestinal Absorption and First-Pass Metabolism of Polyphenol Compounds in Rat and Their Transport Dynamics in Caco-2 Cells. *PLOS ONE* 7, e29647. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029647>
- Tison, J.-M., De Foucault, B., 2014. Flora gallica - Flore de France, *Biotope. ed.*
- Tóth, B., Chang, F.-R., Hwang, T.-L., Szappanos, Á., Mándi, A., Hunyadi, A., Kurtán, T., Jakab, G., Hohmann, J., Vasas, A., 2017. Screening of *Luzula* species native to the Carpathian Basin for anti-inflammatory activity and bioactivity-guided isolation of compounds from *Luzula luzuloides* (Lam.) Dandy & Wilmott. *Fitoterapia* 116, 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.12.004>
- Tóth, B., Liktó-Busa, E., Kúsz, N., Szappanos, Á., Mándi, A., Kurtán, T., Urbán, E., Hohmann, J., Chang, F.-R., Vasas, A., 2016. Phenanthrenes from *Juncus inflexus* with Antimicrobial Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Nat. Prod.* 79, 2814–2823. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00581>
- Tóth, B.É., 2016. Bioactive secondary metabolites from Juncaceae species. University of Szeged, Szeged, Hungary. https://doktori.bibl.u-szeged.hu/id/eprint/3912/1/Dissz_TothBarbara.pdf
- Traynor, C., 2008. *Juncus kraussii* harvesting in Umlalazi Nature Reserve, KwaZulu-Natal, South Africa: Socio-economic aspects and sustainability. *Afr. J. Aquat. Sci. - AFR J AQUAT SCI* 33, 27–36. <https://doi.org/10.2989/AJAS.2007.33.1.3.387>
- Tsai, G.J., Su, W.H., 1999. Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* 62, 239–243. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-62.3.239>
- Turner, N.A., Sharma-Kuinkel, B.K., Maskarinec, S.A., Eichenberger, E.M., Shah, P.P., Carugati, M., Holland, T.L., Fowler, V.G., 2019. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*:

an overview of basic and clinical research. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 203–218. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0147-4>

UK Health Security Agency (UKHSA). « UKHSA Science Strategy 2023 to 2033 Securing health and prosperity » [en ligne]. Disponible sur : https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/1158470/UKHSA_Science_strategy.pdf. (consulté le 06 Juin 2023).

United Nations meeting on antimicrobial resistance, 2016. *Bull. World Health Organ.* 94, 638–639. <https://doi.org/10.2471/BLT.16.020916>

Urban-Chmiel, R., Marek, A., Stępień-Pyśniak, D., Wieczorek, K., Dec, M., Nowaczek, A., Osek, J., 2022. Antibiotic Resistance in Bacteria-A Review. *Antibiot.* Basel Switz. 11. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081079>

US Food and Drug Administration, 2023. Fact sheet for healthcare providers: emergency authorization for Paxlovid. <https://www.fda.gov/media/155050/download>.

Vabret, A., Mischczak, F., 2010. Changement de tropisme des coronavirus. *Trop. Virus Anim. À Homme* 2010, 63–68. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(10\)70561-X](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(10)70561-X)

van den Worm, S.H.E., Eriksson, K.K., Zevenhoven, J.C., Weber, F., Züst, R., Kuri, T., Dijkman, R., Chang, G., Siddell, S.G., Snijder, E.J., Thiel, V., Davidson, A.D., 2012. Reverse Genetics of SARS-Related Coronavirus Using Vaccinia Virus-Based Recombination. *PLOS ONE* 7, e32857. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032857>

van Hoek, A.H.A.M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A.P., Aarts, H.J.M., 2011. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front. Microbiol.* 2, 203. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00203>

Vasas, A., 2020. Phenanthrenes from Orchidaceae and Their Biological Activities, in: Merillon, J.-M., Kodja, H. (Eds.), *Orchids Phytochemistry, Biology and Horticulture: Fundamentals and Applications*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–41. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11257-8_34-1

Vassilara, F., Spyridaki, A., Pothitos, G., Deliveliotou, A., Papadopoulos, A., 2018. A Rare Case of Human Coronavirus 229E Associated with Acute Respiratory Distress Syndrome in a Healthy Adult. *Case Rep. Infect. Dis.* 2018, 6796839. <https://doi.org/10.1155/2018/6796839>

Venkatesan, J., Kim, S.K., 2014. Chitosan for bone repair and regeneration, in: Mallick, K. (Ed.), *Bone Substitute Biomaterials*. Woodhead Publishing, pp. 244–260. <https://doi.org/10.1533/9780857099037.3.244>

Vermote, A., Brackman, G., Risseuw, M.D.P., Coenye, T., Van Calenbergh, S., 2017. Novel hamamelitannin analogues for the treatment of biofilm related MRSA infections–A scaffold hopping approach. *Eur. J. Med. Chem.* 127, 757–770. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.10.056>

Références bibliographiques

Victorian Ressources Online Statewide. « Spiny rush (*Juncus acutus*) » [en ligne]. Disponible sur : https://vro.agriculture.vic.gov.au/dpi/vro/vrosite.nsf/pages/weeds_perennial_spiny_rush. (consulté le 05 Juin 2023).

Vo, A., Doumit, M., Rockwell, G., 2016. The Biomechanics and Optimization of the Needle-Syringe System for Injecting Triamcinolone Acetonide into Keloids. *J. Med. Eng.* 2016, 5162394. <https://doi.org/10.1155/2016/5162394>

Vunain, E., Mishra, A.K., Mamba, B.B., 2017. Fundamentals of chitosan for biomedical applications, in: Jennings, J.A., Bumgardner, J.D. (Eds.), *Chitosan Based Biomaterials Volume 1*. Woodhead Publishing, pp. 3–30. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100230-8.00001-7>

Wagner, H., Ulrich-Merzenich, G., 2009. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* 16, 97–110. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.018>

Wagner Luiz Ramos Barbosa, Myrth Soares do Nascimento, Lucianna do Nascimento Pinto, Fernando Luiz Costa Maia, Antonio Jorge Ataíde Sousa, José Otávio Carréra Silva Júnior, Maurícia Melo Monteiro, Danilo Ribeiro de Oliveira, 2012. Selecting Medicinal Plants for Development of Phytomedicine and Use in Primary Health Care, in: Iraj Rasooli (Ed.), *Bioactive Compounds in Phytomedicine*. IntechOpen, Rijeka, p. Ch. 1. <https://doi.org/10.5772/26078>

Wahl, A., Gralinski, L.E., Johnson, C.E., Yao, W., Kovarova, M., Dinnon, K.H. 3rd, Liu, H., Madden, V.J., Krzystek, H.M., De, C., White, K.K., Gully, K., Schäfer, A., Zaman, T., Leist, S.R., Grant, P.O., Bluemling, G.R., Kolykhalov, A.A., Natchus, M.G., Askin, F.B., Painter, G., Browne, E.P., Jones, C.D., Pickles, R.J., Baric, R.S., Garcia, J.V., 2021. SARS-CoV-2 infection is effectively treated and prevented by EIDD-2801. *Nature* 591, 451–457. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03312-w>

Waldrop, R., McLaren, A., Calara, F., McLemore, R., 2014. Biofilm growth has a threshold response to glucose *in vitro*. *Clin. Orthop.* 472, 3305–3310. <https://doi.org/10.1007/s11999-014-3538-5>

Wang, J., Liu, J., Wen, Q., Li, C., Li, Y., Lian, B., Tang, H., Yao, T., 2010. Chemical constituents from the aerial parts of *Juncus setchuensis*. *Biochem. Syst. Ecol.* 38, 1039–1041. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2010.10.008>

Wang, X.-Y., Ke, C.-Q., Tang, C.-P., Yuan, D., Ye, Y., 2009. 9,10-Dihydrophenanthrenes and Phenanthrenes from *Juncus setchuensis*. *J. Nat. Prod.* 72, 1209–1212. <https://doi.org/10.1021/np9000834>

Wang, Y., Li, G.-Y., Fu, Q., Hao, T.-S., Huang, J.-M., Zhai, H.-F., 2014. Two new anxiolytic phenanthrenes found in the medullae of *Juncus effusus*. *Nat. Prod. Commun.* 9, 1177–1178. <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1934578X1400900830>

Wang, Y.-G., Wang, Y.-L., Zhai, H.-F., Liao, Y.-J., Zhang, B., Huang, J.-M., 2012. Phenanthrenes from *Juncus effusus* with anxiolytic and sedative activities. *Nat. Prod. Res.* 26, 1234–1239. <https://doi.org/10.1080/14786419.2011.561491>

Références bibliographiques

Wang, Z., Wang, N., Yang, L., Song, X.-Q., 2022. Bioactive natural products in COVID-19 therapy. *Front. Pharmacol.* 13, 926507. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.926507>

Wang, Z., Yang, L., 2022. Broad-spectrum prodrugs with anti-SARS-CoV-2 activities: Strategies, benefits, and challenges. *J. Med. Virol.* 94, 1373–1390. <https://doi.org/10.1002/jmv.27517>

Weltrowski, M., Morcellet, M., Martel, B., 2003. Cyclodextrin polymers and/or cyclodextrin derivatives with complexing properties and ion-exchange properties and method for the production thereof. US 6,660,804 B1. <https://patents.google.com/patent/EP1165621A1/en>

Wertheim, H.F., Melles, D.C., Vos, M.C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H.A., Nouwen, J.L., 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect. Dis.* 5, 751–762. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70295-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70295-4)

WFO. « Juncaceae Juss. » [en ligne]. Disponible sur : <https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-7000000310>. (consulté le 13 Septembre 2023).

WFO. « *Juncus acutus* L. » [en ligne]. Disponible sur : <https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000775729>. (consulté le 13 Septembre 2023).

WHO, 2003. Report of the Twenty-First Meeting of Ministers of Health of Countries of the South-East Asia Region, New Delhi, India, 8-9 September 2003. WHO Regional Office for South-East Asia, New Delhi. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/127605/HMM_21ST.pdf?sequence=1&isAllowed=y. (consulté le 06 Juin 2023).

WHO. « Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics » [en ligne]. Disponible sur : <http://remed.org/wp-content/uploads/2017/03/global-priority-list-of-antibiotic-resistant-bacteria-2017.pdf>. (consulté le 25 Juillet 2023).

WHO. « Antimicrobial resistance » [en ligne]. Disponible sur : <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance#:~:text=The%20main%20drivers%20of%20antimicrobial,access%20to%20quality%2C%20affordable%20medicines%2C>. (consulté le 06 Mai 2023).

WHO. « WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard 2023 » [en ligne]. Disponible sur : <https://covid19.who.int/>. (consulté le 29 Juin 2023).

WHO Solidarity Trial Consortium, 2022. Remdesivir and three other drugs for hospitalised patients with COVID-19: final results of the WHO Solidarity randomised trial and updated meta-analyses. *The Lancet* 399, 1941–1953. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00519-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00519-0)

Wikimedia Commons « Apigenin » [en ligne]. Disponible sur : <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Apigenin.svg>. (consulté le 04 Juillet 2023).

Wikimedia Commons « Luteolin » [en ligne]. Disponible sur : <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Luteolin.svg>. (consulté le 04 Juillet 2023).

Références bibliographiques

Wikimedia Commons « Quercetin » [en ligne]. Disponible sur : <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Quercetin.svg>. (consulté le 04 Juillet 2023).

Wittke Frederick, Vincent Catherine, Chen James, Heller Barry, Kabler Heidi, Overcash J. Scott, Leylaverigne François, Dieppois Guennaëlle, 2020. Afabacin, a First-in-Class Antistaphylococcal Antibiotic, in the Treatment of Acute Bacterial Skin and Skin Structure Infections: Clinical Noninferiority to Vancomycin/Linezolid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 64, 10.1128/aac.00250-20. <https://doi.org/10.1128/aac.00250-20>

Woodell, S.R.J., 1985. Salinity and Seed Germination Patterns in Coastal Plants. *Vegetatio* 61, 223–229.

Wu, B., Kulkarni, K., Basu, S., Zhang, S., Hu, M., 2011. First-pass metabolism via UDP-glucuronosyltransferase: a barrier to oral bioavailability of phenolics. *J. Pharm. Sci.* 100, 3655–3681. <https://doi.org/10.1002/jps.22568>

Wu, C., Liu, Y., Yang, Y., Zhang, P., Zhong, W., Wang, Y., Wang, Q., Xu, Y., Li, M., Li, X., Zheng, M., Chen, L., Li, H., 2020. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharm. Sin. B* 10, 766–788. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.02.008>

Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y.-M., Wang, W., Song, Z.-G., Hu, Y., Tao, Z.-W., Tian, J.-H., Pei, Y.-Y., Yuan, M.-L., Zhang, Y.-L., Dai, F.-H., Liu, Y., Wang, Q.-M., Zheng, J.-J., Xu, L., Holmes, E.C., Zhang, Y.-Z., 2020. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 579, 265–269. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>

Xiao, F., Li, Q., Tang, C.-P., Ke, C.-Q., Ye, Y., Yao, S., 2016. Two new phenanthrenoid dimers from *Juncus effusus*. *Chin. Chem. Lett.* 27, 1721–1724. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2016.04.008>

Xiao, F., Tang, M., Zheng, X., Liu, Y., Li, X., Shan, H., 2020. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology* 158, 1831-1833.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.02.055>

Xue, Z., Li, S., Wang, S., Wang, Y., Yang, Y., Shi, J., He, L., 2006. Mono-, Bi-, and Triphenanthrenes from the Tubers of *Cremastra appendiculata*. *J. Nat. Prod.* 69, 907–913. <https://doi.org/10.1021/np060087n>

Yang, G.Z., Li, H.X., Song, F.J., Chen, Y., 2007. Diterpenoid and Phenolic Compounds from *Juncus effusus* L. *Helv. Chim. Acta* 90, 1289–1295. <https://doi.org/10.1002/hlca.200790129>

Yoshimoto, F.K., 2020. The Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the Cause of COVID-19. *Protein J.* 39, 198–216. <https://doi.org/10.1007/s10930-020-09901-4>

Young, D.H., Kauss, H., 1983. Release of Calcium from Suspension-Cultured Glycine max Cells by Chitosan, Other Polycations, and Polyamines in Relation to Effects on Membrane Permeability. *Plant Physiol.* 73, 698–702. <https://doi.org/10.1104/pp.73.3.698>

- Yu, P., Zaleski, A., Li, Q., He, Y., Mapili, K., Pruden, A., Alvarez, P.J.J., Stadler, L.B., 2018. Elevated Levels of Pathogenic Indicator Bacteria and Antibiotic Resistance Genes after Hurricane Harvey's Flooding in Houston. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 5, 481–486. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.8b00329>
- Zahedi, E., Ansari, S., Wu, B.M., Bencharit, S., Moshaverinia, A., 2017. Hydrogels in craniofacial tissue engineering, in: *Tayebi, L., Moharamzadeh, K. (Eds.), Biomaterials for Oral and Dental Tissue Engineering*. Woodhead Publishing, pp. 47–64. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100961-1.00004-9>
- Zahran, M.A., El-Demerdash, M.A., Mashaly, I.A., 1993. On the ecology of *Juncus acutus* and *J. rigidus* as fiber producing halophytes in arid regions, in: *Lieth, H., Al Masoom, A.A. (Eds.), Towards the Rational Use of High Salinity Tolerant Plants: Vol. 2 Agriculture and Forestry under Marginal Soil Water Conditions*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 331–342. https://doi.org/10.1007/978-94-011-1860-6_40
- Zaki, A.M., van Boheemen, S., Bestebroer, T.M., Osterhaus, A.D.M.E., Fouchier, R.A.M., 2012. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N. Engl. J. Med.* 367, 1814–1820. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1211721>
- Zarrintaj, P., Khodadadi Yazdi, M., Youssefi Azarfam, M., Zare, M., Ramsey, J.D., Seidi, F., Reza Saeb, M., Ramakrishna, S., Mozafari, M., 2021. Injectable Cell-Laden Hydrogels for Tissue Engineering: Recent Advances and Future Opportunities. *Tissue Eng. Part A* 27, 821–843. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2020.0341>
- Zhanel, G.G., Hoban, D.J., Harding, G.K., 1991. The postantibiotic effect: a review of *in vitro* and *in vivo* data. *DICP Ann. Pharmacother.* 25, 153–163. <https://doi.org/10.1177/106002809102500210>
- Zhang, F., Cheng, W., 2022. The Mechanism of Bacterial Resistance and Potential Bacteriostatic Strategies. *Antibiotics* 11. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091215>
- Zhang, J., Ma, P.X., 2013. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: Recent progress and future perspective. *Polysacch.-Based Syst. Drug Gene Deliv.* 65, 1215–1233. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.05.001>
- Zhang, P., Lu, J., Jing, Y., Tang, S., Zhu, D., Bi, Y., 2017. Global epidemiology of diabetic foot ulceration: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Med.* 49, 106–116. <https://doi.org/10.1080/07853890.2016.1231932>
- Zhao, W., Xu, L.-L., Zhang, X., Gong, X.-W., Zhu, D.-L., Xu, X.-H., Wang, F., Yang, X.-L., 2018. Three new phenanthrenes with antimicrobial activities from the aerial parts of *Juncus effusus*. *Fitoterapia* 130, 247–250. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.09.007>
- Zhou, P., Yang, X.-L., Wang, X.-G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.-R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.-L., Chen, H.-D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R.-D., Liu, M.-Q., Chen, Y., Shen, X.-R., Wang, X., Zheng, X.-S., Zhao, K., Chen, Q.-J., Deng, F., Liu, L.-L., Yan, B., Zhan, F.-X., Wang, Y.-Y., Xiao, G.-F., Shi, Z.-L., 2020. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>

Références bibliographiques

Zhou, Y., Gao, H.-L., Shen, L.-L., Pan, Z., Mao, L.-B., Wu, T., He, J.-C., Zou, D.-H., Zhang, Z.-Y., Yu, S.-H., 2016. Chitosan microspheres with an extracellular matrix-mimicking nanofibrous structure as cell-carrier building blocks for bottom-up cartilage tissue engineering. *Nanoscale* 8, 309–317. <https://doi.org/10.1039/C5NR06876B>

Zhou, Y., Hou, Y., Shen, J., Huang, Y., Martin, W., Cheng, F., 2020. Network-based drug repurposing for novel coronavirus 2019-nCoV/SARS-CoV-2. *Cell Discov.* 6, 14. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0153-3>

Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G.F., Tan, W., 2020. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 382, 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>

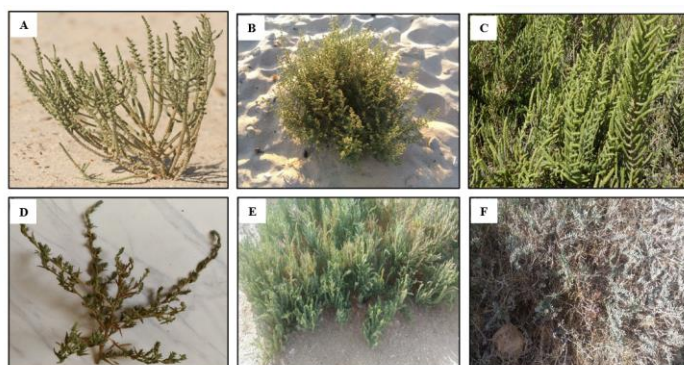
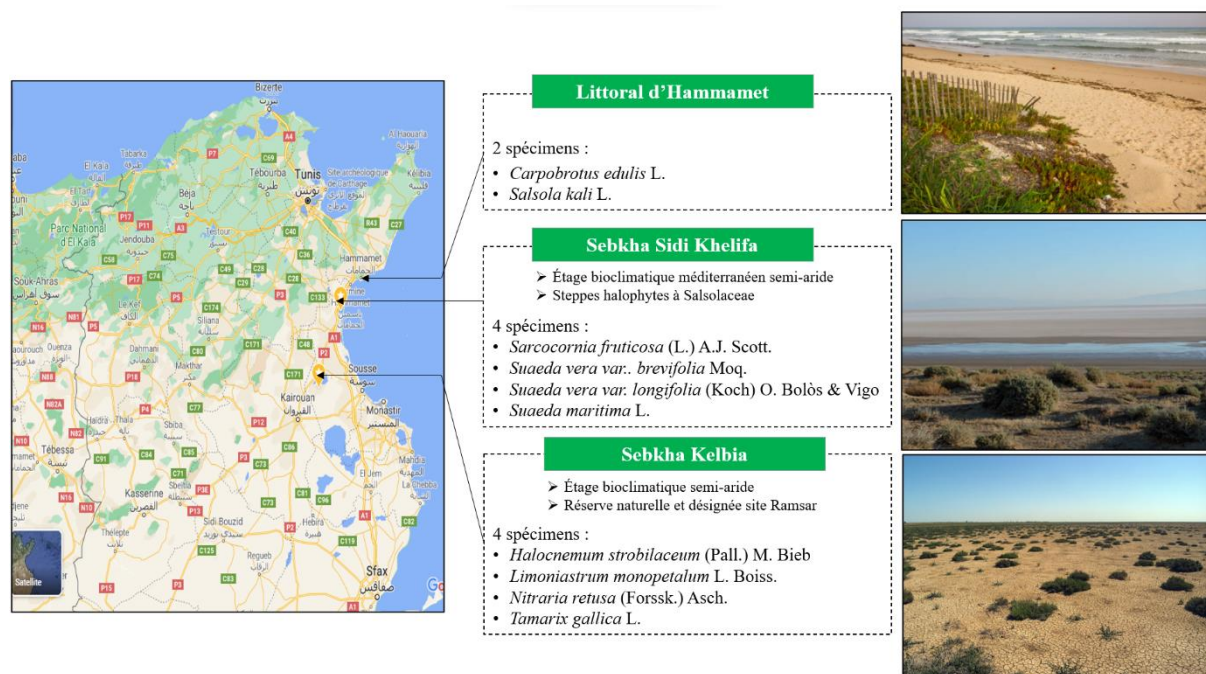
Zou, Y., Teng, Y., Li, J., Yan, Y., 2023. Recent advances in the biosynthesis of coumarin and its derivatives. *Green Chem. Eng.* <https://doi.org/10.1016/j.gce.2023.04.003>

Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., van 't Riet, K., 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875–1881. <https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1875-1881.1990>

Annexes

ANNEXES

Annexe 1 : Récapitulatif des plantes collectées en Tunisie durant le mois d'août 2020 et leurs lieux de collecte



Amaranthaceae

- (A) *Halocnemum strobilaceum* (Pall.) M. Bieb
(B) *Salsola kali* L.
(C) *Sarcocornia fruticosa* (L.) A.J. Scott
(D) *Suaeda maritima* L.
(E) *Suaeda vera* var. *brevifolia* (K.Koch) O.Bolòs & Vigo,
(F) *Suaeda vera* var. *longifolia* Moq.

Aizoraceae

*Carpobrotus edulis* L.

Nitrariaceae

*Nitraria retusa* (Forssk.) Asch

Plumbaginaceae

*Limoniastrum monopetalum* L. Boiss.

Tamaricaceae

*Tamarix gallica* L.

Remarque : L'identification des différentes plantes collectées a été réalisée dans un premier temps sur la base des descriptions fournies dans diverses ressources et supports disponibles sur internet sur la flore Tunisienne (www.tela-botanica.org et www.tropicos.org). Une vérification des noms attribués aux différentes espèces a été ensuite faite par la botaniste, Mme Zeineb

Ghrabi-Gammar, maître de conférences à l'Institut National Agronomique de Tunisie, qui a gentiment accepté de m'aider. Ses corrections ont été réalisées en se référant aux descriptions de la littérature, notamment l'ouvrage « Flore analytique et synoptique de la Tunisie: Cryptogames vasculaires gymnospermes et monocotylédones » (Cuénod et al., 1954) et le Catalogue synonymique commenté de la Flore de Tunisie de Le Floch et al., (2010) pour vérifier la nomenclature actualisée des espèces Tunisiennes.

Annexes

Annexe 2. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$) déterminées pour les extraits bruts méthanoliques et les sous-extraits des différentes plantes collectées en Tunisie durant le mois d'août 2020 contre les différentes souches bactériennes et fongiques sélectionnées en utilisant la méthode de dilution en milieu solide sur agar. Les différents extraits et sous-extraits ont été testés à une gamme de concentrations finales allant de 600 à $37,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ obtenue par des dilutions successives au demi. Ces données sont le résultat d'une seule expérience.

N°	Souches bactériennes et fongiques	CMI des antibiotiques et des antifongiques ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)													
						Tiges de <i>Sarcocornia fruticosa</i>				Tiges de <i>Tamarix gallica</i>					Feuilles de <i>Carpobrotus edulis</i>				
						EB	CycloH	DCM	AcOEt	EB	CycloH	DCM	AcOEt	Aq	EB	CycloH	DCM	AcOEt	Aq
	Levures	AMB	FLC	SER	VRC														
1	<i>Candida albicans</i> 10286	4	32	> 64	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0,5	8	64	S	NA	NA	NA	300	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	600	600	NA
	Bactéries à Gram positif	GEN	VAN	AMX	OXA														
3	<i>Enterococcus faecalis</i> C159-6	4	0,5	64		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	600	NA	NA
4	<i>Enterococcus</i> sp. 8153	2	4	2		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
5	<i>Mycobacterium smegmatis</i> 5003	0,03	0,5	2		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
6	<i>Staphylococcus aureus</i> 8146	0,5	2	4		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	600	NA	NA	NA	NA	NA	NA
7	<i>Staphylococcus aureus</i> 8241	0,5	2	16	S	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
8	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0,25	2	0,125	S	NA	NA	NA	600	NA	NA	NA	300	NA	NA	NA	NA	NA	NA
9	<i>Staphylococcus aureus</i> T28-1	0,5	2	16	R	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
10	<i>Staphylococcus aureus</i> T17-4	0,5	2	1		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	600	NA	NA	NA	NA	NA	NA
11	<i>Staphylococcus epidermis</i> T46A1	0,06	2	0,5		NA	NA	NA	300	NA	NA	NA	300	NA	NA	NA	600	600	NA
12	<i>Staphylococcus epidermis</i> T19A1	32	2	8		NA	NA	NA	300	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	600	600	NA
13	<i>Staphylococcus epidermis</i> T21A5	0,06	2	16		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	300	NA	NA	NA	600	NA	NA
14	<i>Staphylococcus warneri</i> T12A12	0,06	2	1		NA	NA	NA	600	NA	NA	NA	600	NA	NA	NA	600	600	NA
15	<i>Staphylococcus warneri</i> T26A1	0,06	2	0,25		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
16	<i>Streptococcus pettenkoferi</i> T47.A6	0,06	2	0,25		NA	NA	NA	600	NA	NA	NA	300	NA	NA	NA	NA	NA	NA
17	<i>Streptococcus agalactiae</i> T38.2	2	0,5	0,06		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Annexes

18	<i>Streptococcus agalactiae</i> T53C9	1	0,5	0,03		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	300	300	156,25	NA
19	<i>Streptococcus pyogenes</i> 16138	0,125	0,25	0,03		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
20	<i>Streptococcus pyogenes</i> 16135	0,125	0,25	0,03		NA	156,25	300	600	NA	300	NA	600	NA	NA	75	37,5	NA	NA
21	<i>Corynebacterium striatum</i> T40A3	0,03	1	0,25		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	600	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Bactéries à Gram négatif																		
22	<i>Citrobacter freundii</i> 11041	0,25	> 64	2		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
23	<i>Citrobacter freundii</i> 10268	NA	NA	NA		NA	NA	300	600	600	300	600	600	NA	NA	NA	300	600	NA
24	<i>Escherichia Coli</i> ATCC 25922	0,5	> 64	16		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
25	<i>Escherichia Coli</i> T20A1	0,25	> 64	> 64		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
26	<i>Escherichia Coli</i> 8138	0,5	> 64	> 64		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
27	<i>Escherichia Coli</i> 8157	0,5	> 64	> 64		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
28	<i>Enterobacter aerogenes</i> 9004	0,5	> 64	> 64		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
29	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 10270	8	> 64	> 64		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
30	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 11016	0,25	> 64	> 64		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
31	<i>Proteus mirabilis</i> 11060	0,5	> 64	2		NA	150	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
32	<i>Proteus mirabilis</i> T28-3	0,5	> 64	1		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
33	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 8131	1	> 64	> 64		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
34	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27583	2	> 64	> 64		NA	NA	600	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
35	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 8129	0,03	> 64	> 64		NA	NA	NA	600	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	600	NA
36	<i>Salmonella sp.</i> 11033	0,25	> 64	2		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

N°	Feuilles de <i>Suaeda vera</i> var. <i>longifolia</i>				Feuilles de <i>Suaeda vera</i> subsp. <i>brevifolia</i>					Tiges de <i>Suaeda maritima</i>					Feuilles de <i>Salsola kali</i>				Feuilles de <i>Nitraria retusa</i>				
	EB	CycloH	DCM	AcOEt	EB	CycloH	DCM	AcOEt	Aq	EB	CycloH	DCM	AcOEt	Aq	EB	CycloH	DCM	AcOEt	EB	CycloH	DCM	AcOEt	Aq
1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2	NA	NA	NA	NA	300	NA	NA	300	150	NA	NA	NA	300	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	600	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Annexes

4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
7	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
8	NA	NA	NA	NA	600	NA	NA	600	300	NA	NA	NA	300	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
9	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
11	NA	NA	NA	NA	600	NA	NA	300	300	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
12	NA	NA	NA	NA	600	NA	NA	300	300	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
13	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	600	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
14	NA	NA	NA	NA	600	NA	NA	600	300	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
15	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
16	NA	NA	NA	NA	600	600	NA	600	300	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
17	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	600	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
19	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
20	NA	NA	37,5	37,5	NA	NA	600	600	600	NA	NA	150	NA	300	NA	150	NA	NA	37,5	150	75	37,5	37,5
21	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
22	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	600	600	NA	600	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
23	NA	NA	NA	NA	NA	600	NA	600	600	NA	NA	NA	NA	NA	NA	600	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
24	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
25	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
26	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
27	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
28	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
29	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
30	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
31	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Annexes

32	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
33	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
34	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	600	600	NA	150	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
35	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	600	600	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
36	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

N°	Tiges de <i>Halocnemum strobilaceum</i>				Tiges de <i>Limoniastrum strobilaceum</i>				
	EB	CycloH	DCM	AcOEt	EB	CycloH	DCM	AcOEt	Aq
1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2	NA	NA	600	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3	NA	600	600	NA	NA	NA	NA	NA	NA
4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
7	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
8	NA	NA	600	NA	NA	NA	NA	NA	NA
9	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
11	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
12	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
13	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
14	NA	600	600	NA	NA	NA	NA	NA	NA
15	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
16	NA	NA	300	NA	NA	NA	NA	NA	NA
17	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
18	NA	300	300	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Annexes

19	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
20	NA	75	37,5	600	NA	37,5	37,5	300	NA
21	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
22	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
23	NA	600	300	NA	NA	NA	NA	NA	NA
24	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
25	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
26	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
27	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
28	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
29	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
30	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
31	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
32	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
33	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
34	NA	600	300	NA	NA	NA	NA	NA	NA
35	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
36	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Amphotéricine B (AMB) : $S \leq 1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $R > 1 \mu\text{g.mL}^{-1}$; Amoxicilline (AMX) : $S \leq 4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $R > 16 \mu\text{g.mL}^{-1}$; Fluconazole (FLC) : $S \leq 2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $I = 4$ et $R > 4 \mu\text{g.mL}^{-1}$; Gentamicine (GEN) : $S \leq 4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $R > 8 \mu\text{g.mL}^{-1}$; Sertaconazole (SER) : points critiques cliniques (*clinical breakpoints*) non déterminés ; Vancomycine (VAN) : $S \leq 4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $R > 16 \mu\text{g.mL}^{-1}$; Voriconazole (VRC) : $S \leq 0,06$ et $I \in [0,125-0,25]$ et $R > 0,25$ (EUCAST, 2023) et Oxacilline (OXA): $S \leq 2$ et $R > 2$ (Cavallo et al., 2005 ; EUCAST, 2019 ; EUCAST 2023)

NA : non actif ; ND : non déterminé ; S : sensible ; I : intermédiaire et R : résistant

Résumé

Les métabolites spécialisés du genre *Juncus* : approfondissement de leur potentiel antimicrobien et étude de leur biodisponibilité

La recherche de nouveaux antimicrobiens est actuellement cruciale pour faire face aux maladies émergentes (pandémie de la COVID-19) et à la résistance aux antibiotiques. La présente étude vise à mettre en exergue le potentiel d'espèces végétales, sélectionnées sur la base de critères écologiques et chimiotaxonomiques, comme source naturelle de composés dotés d'une grande diversité structurale et d'un éventail d'activités biologiques prometteuses. Des espèces de *Juncus*, collectées à partir de 3 localités en France, ont été étudiées pour leur potentiel antiviral contre les coronavirus et antibactérien contre des souches bactériennes à Gram positif. À cet effet, l'approche du fractionnement bioguidé employant des techniques séparatives conventionnelles (HPLC préparative et CPC), a été adoptée. L'étude de l'activité antivirale menée contre le coronavirus HCoV-229E a mis en évidence le pouvoir antiviral de la lutéoline isolée à partir du sous-extrait AcOEt des tiges de *J. acutus* (localité 2). Le criblage de l'activité antibactérienne a souligné un effet remarquable du sous-extrait CH₂Cl₂ des rhizomes de *J. inflexus* (localité 3), enrichi en composés phénanthréniques, notamment contre les souches de *S. aureus*. Ainsi, des expériences complémentaires, permettant d'approfondir la compréhension de l'effet antibactérien de certains des composés phénanthréniques isolés, ont été réalisées en orientant le travail sur une souche de *S. aureus* résistante à la méticilline (SARM) et provenant d'un prélèvement sur un pied diabétique. Suite aux résultats promoteurs obtenus, le développement d'une formulation topique à base de juncusol a été initié. Des travaux portant sur la biodisponibilité de ce composé phénanthrénique ont été également réalisés par le biais d'expériences de passage de barrière intestinale *in vitro* au moyen de coculture cellulaire Caco2/HT29-MTX.

Mots-clés : *Juncus*, fractionnement bioguidé, dérivés phénanthréniques, juncusol, lutéoline, activité anti-HCoV- 229E, activité anti-SARM, formulation topique, biodisponibilité

Abstract

Specialized metabolites from Juncaceae species: an insight into their antimicrobial activity and their bioavailability

To address the current challenges raised by emerging diseases (COVID-19 pandemic) and antibiotic resistance, the search for new antimicrobials has become urgent. The present study aims to highlight the potential of plant species, selected according to ecological and chemotaxonomic criteria, as a natural source of compounds with a wide structural diversity and promising biological activities. *Juncus* species collected from 3 localities in France were investigated for their potential antimicrobial effect against coronaviruses and Gram-positive bacterial strains. For this purpose, the approach of bioguided fractionation was adopted through the use of conventional separation techniques (preparative HPLC and CPC). The antiviral study conducted against the coronavirus HCoV-229E highlighted the antiviral potential of luteolin, a flavone that was isolated from the EtOAc sub-extract of *J. acutus* stems (locality 2). The screening for antibacterial activity led to the selection of the CH₂Cl₂ sub-extract of *J. inflexus* rhizomes (locality 3) for the rest of this study as this enriched-phenanthrene derivative sub-extract demonstrated a remarkable activity in particular against *S. aureus* strains. Additional experiments to deepen the understanding of the antibacterial effect of some of the isolated phenanthrene derivatives were performed focusing on a methicillin-resistant *S. aureus* strain that was isolated from a diabetic foot infection. Regarding the promising results, the development of a topical formulation involving juncusol as an active component was initiated. Bioavailability studies were also performed on this phenanthrene derivative through *in vitro* absorption and intestinal permeability experiments across Caco2/HT29-MTX co-cultured cells.

Keywords: *Juncus*, bioguided fractionation, phenanthrene derivatives, juncusol, luteolin, anti-HCoV-229E activity, anti-MRSA activity, topical formulation, biodisponibility

Article

Luteolin Isolated from *Juncus acutus* L., a Potential Remedy for Human Coronavirus 229E

Asma Hakem ^{1,2} , Lowiese Desmarests ³ , Ramla Sahli ^{1,2}, Rawen Ben Malek ¹, Charline Camuzet ³, Nathan François ³, Gabriel Lefèvre ¹, Jennifer Samaillie ¹, Sophie Moureu ¹ , Sevser Sahpaz ¹, Sandrine Belouzard ³, Riadh Ksouri ², Karin Séron ^{3,†}  and Céline Rivière ^{1,*,†} 

- ¹ Joint Research Unit 1158, BioEcoAgro, Univ. Lille, INRAE, Univ. Liège, UPJV, JUNIA, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte d'Opale, ICV—Institut Charles Viollette, 59650 Villeneuve-d'Ascq, France; asma.hakem.etu@univ-lille.fr (A.H.); sahliramla@gmail.com (R.S.); rawen.ben-malek@inrae.fr (R.B.M.); gabriel.lefevre@univ-lille.fr (G.L.); jennifer.samaillie@univ-lille.fr (J.S.); sophie.moureu@gmail.com (S.M.); sevser.sahpaz@univ-lille.fr (S.S.)
 - ² Laboratory of Aromatic and Medicinal Plants, Biotechnology Centre of Borj-Cedria (CBBC), Hammam-Lif 2050, Tunisia; ksouriradh@gmail.com
 - ³ Center for Infection and Immunity of Lille (CIIL), Univ. Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019—UMR 9017, 59000 Lille, France; lowiese.desmarests@ibl.cnrs.fr (L.D.); charline.camuzet@pasteur-lille.fr (C.C.); nathanfrancoislille@gmail.com (N.F.); sandrine.belouzard@ibl.cnrs.fr (S.B.); karin.seron@ibl.cnrs.fr (K.S.)
- * Correspondence: celine.riviere@univ-lille.fr; Tel.: +33-(0)3-20-96-40-41
† These authors contributed equally to this work.

Abstract: The COVID-19 pandemic, caused by SARS-CoV-2, addressed the lack of specific antiviral drugs against coronaviruses. In this study, bioguided fractionation performed on both ethyl acetate and aqueous sub-extracts of *Juncus acutus* stems led to identifying luteolin as a highly active antiviral molecule against human coronavirus HCoV-229E. The apolar sub-extract (CH₂Cl₂) containing phenanthrene derivatives did not show antiviral activity against this coronavirus. Infection tests on Huh-7 cells, expressing or not the cellular protease TMPRSS2, using luciferase reporter virus HCoV-229E-Luc showed that luteolin exhibited a dose-dependent inhibition of infection. Respective IC₅₀ values of 1.77 μM and 1.95 μM were determined. Under its glycosylated form (luteolin-7-O-glucoside), luteolin was inactive against HCoV-229E. Time of addition assay showed that utmost anti-HCoV-229E activity of luteolin was achieved when added at the post-inoculation step, indicating that luteolin acts as an inhibitor of the replication step of HCoV-229E. Unfortunately, no obvious antiviral activity for luteolin was found against SARS-CoV-2 and MERS-CoV in this study. In conclusion, luteolin isolated from *Juncus acutus* is a new inhibitor of alphacoronavirus HCoV-229E.

Keywords: HCoV-229E; SARS-CoV-2; MERS-CoV; *Juncus* species; bioguided fractionation; luteolin



Citation: Hakem, A.; Desmarests, L.; Sahli, R.; Malek, R.B.; Camuzet, C.; François, N.; Lefèvre, G.; Samaillie, J.; Moureu, S.; Sahpaz, S.; et al. Luteolin Isolated from *Juncus acutus* L., a Potential Remedy for Human Coronavirus 229E. *Molecules* **2023**, *28*, 4263. <https://doi.org/10.3390/molecules28114263>

Academic Editor: Fernando Albericio

Received: 6 May 2023

Revised: 17 May 2023

Accepted: 18 May 2023

Published: 23 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Viruses are responsible for 25.4% of infectious diseases affecting human health [1]. Some of these viruses are implicated in respiratory infections causing thereby a high rate of mortality worldwide, especially in developing countries. The most well-known examples are the Spanish flu (H1N1) which occurred in Spain in 1918 and caused the death of about 50 million persons worldwide mainly due to bacterial pneumonia complications, as well as the Asian flu (H2N2) in 1957 and the Hong Kong flu (H3N2) in 1968 responsible for the death of 4 million and one million people, respectively. Over the past two decades, three highly pathogenic human coronaviruses belonging to the genus Betacoronavirus have emerged, SARS-CoV (severe acute respiratory syndrome coronavirus) and MERS-CoV (Middle East respiratory syndrome coronavirus), which were first at the origin of two new severe respiratory epidemics [2] and lately SARS-CoV-2.

The SARS-CoV originated in Southern China in 2002 has infected 8437 individuals leading to 813 deaths [3]. The MERS-CoV appeared 10 years later. This virus was isolated, for the first time, from a sputum sample of a male patient suffering from a severe pneumonia in Djeddah (Saudi Arabia) [4]. According to the World Health Organization's data, since 2012, MERS-CoV has killed 945 people with a case fatality rate of more than 30%, and the epidemic is still ongoing [5]. In December 2019, SARS-CoV-2 was identified as the infectious agent responsible for the COVID-19 pandemic. So far, it is estimated to have caused the death of more than 6.9 million people [6].

Before the emergence of these highly pathogenic coronaviruses, other human coronaviruses existed but not much attention was accorded to them because of their minor pathogenic potential. The human coronavirus 229E (HCoV-229E) was isolated in the mid-1960's and was originally discovered in Great Britain from a nasal wash of patients with cold [7]. HCoV-229E is an alphacoronavirus characterized by a single positively-charged RNA strand of about 27.7 kb [8]. Its emergence into the human population is estimated to about 200 years ago. HCoV-229E as well as other coronaviruses causing mild symptoms, notably HCoV-OC43, HCoV-NL63, and HCoV-HKU1, are well adapted to humans and do not seem to need an animal reservoir for transmission unlike the betacoronaviruses MERS-CoV, SARS-CoV and SARS-CoV-2. However, the latter now also shows a very efficient human-to-human transmission. Epidemics that have appeared during these last 20 years highlight the ability of coronaviruses to cross barriers between species causing severe pathologies in humans. This clearly underlines that this family of viruses constitutes a reservoir of emerging pathogens [9–11].

To deal with the SARS-CoV-2 pandemic, the scientific community worldwide put into action many strategies to counteract SARS-CoV-2 infection, such as blocking SARS-CoV-2 entry with monoclonal antibodies [12], impairing SARS-CoV-2 replication with polymerase or protease inhibitors [13,14], inhibiting excessive inflammatory response by repurposing already existing antivirals and broad-spectrum drugs [15,16]. While RNA vaccines have shown evidence of efficacy to prevent severe outcomes in patients, few other therapeutic options seemed to significantly reduce the symptomatology caused by SARS-CoV-2. Some therapeutic and prophylactic options to help fight COVID-19 were nonetheless developed and approved by the European Medicines Agency (EMA) and/or the Food and Drug Administration via the Emergency Use Authorizations (FDA EUAs), like for instance Monoclonal antibody treatments (mAb) and the new approved drug, Paxlovid®.

The efficacy of mAbs treatment against SARS-CoV-2 was demonstrated in several studies including clinical trials, however the anticipated activity of the different anti-SARS-CoV-2 mAb therapies varied dramatically depending on the circulating variant [17,18]. The antiviral drug Paxlovid® is prescribed once the first signs of COVID-19 infection appear to help prevent severe outcomes. This medicine was authorized for marketing across the European Union by the European Commission on the 28th of January 2022. Paxlovid® is composed of 2 drugs: nirmatrelvir, which is an orally bioavailable viral protease Mpro inhibitor and ritonavir, an inhibitor of cytochrome P450 (CYP) 3A4 and a pharmacokinetic boosting agent. Paxlovid® has proven its efficacy clinically in reducing the mortality rate [19]. Two other SARS-CoV-2 antivirals targeting the viral RNA-dependent RNA polymerase are available for COVID-19 therapy, remdesivir and molnupiravir. However, remdesivir benefits are low. Only a small effect against death or progression to ventilation was observed in hospitalized patients that had not yet been ventilated. Recent data on molnupiravir, whose mode of action apparently involves a two-step mechanism, showed no effect on death outcome of the patients [20,21].

Despite the development of highly efficient vaccines, the global fast-spreading of SARS-CoV-2 led to the emergence of multiple new variants decreasing the efficacy of both vaccines and mAb therapy. Therefore, it is clear that vaccines are part of the solution but the search for specific antiviral treatments remains challenging. In this context, our study aims to explore the plant kingdom in order to find specific antiviral natural compounds against coronaviruses, in particular against HCoV-229E, SARS-CoV-2 and MERS-CoV.

Natural products from plant species continue to hold a powerful position in drug discovery process [22]. They are renowned for their structural diversity and their promising biological activities. 42% of the total antiviral agents produced between 1981 and 2019 were derived from natural products [22,23]. So far, a number of high-throughput in silico studies highlighted the great potential of phytochemicals against coronaviruses [24,25]. In the case of our study, we are mainly seeking in vitro evidence. The choice of plant species was based on an ecological approach and we specifically selected halophytes. Even though the definition of halophytes remains debated, these plant species can simply be defined as having the ability to survive in saline environments with NaCl concentrations around 85 mM or more (up to 2 M in the case of some *Tecticornia* species) [26–29]. In a previous collaborative study, we demonstrated that dehydrojuncusol, a natural phenanthrene derivative, isolated from *Juncus maritimus* was able to inhibit hepatitis C virus replication by targeting the non-structural protein NS5A [30,31]. To conduct our study, different *Juncus* species, halophytes and glycophytes, were selected and collected from different locations in France. Bioguided fractionation was performed in order to thoroughly investigate their antiviral activity against HCoV-229E, SARS-CoV-2 and MERS-CoV coronaviruses and identify the natural bioactive compound(s).

2. Results

2.1. Antiviral Activity of Different *Juncus* Species against HCoV-229E

A primary screening based on the use of a luciferase recombinant HCoV-229E (HCoV-229E-Luc) was carried out on the crude methanolic extracts of rhizomes, stems and inflorescences of the collected *Juncus* species (*Juncus acutus* L., *Juncus inflexus* L. and *Juncus maritimus* Lam.) in order to identify the most active extract(s) against HCoV-229E. Infection was performed in Huh-7 cells expressing the transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2). TMPRSS2 is a key enzyme in HCoV-229E and SARS-CoV-2 entry as it allows the fusion of the viral particle to the cell membrane, which is the major entry pathway for coronaviruses [32–34]. In the absence of TMPRSS2, the virus enters the cell via endocytosis and fusion with the endosomal membrane. Among all crude methanolic extracts tested at $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figure 1), the highest antiviral activities against HCoV-229E-Luc were respectively observed for *J. acutus* closed inflorescences (locality 1) = JA1 CICE, *J. acutus* rhizomes (locality 2) = JA2 RCE, *J. acutus* open inflorescences (locality 1) = JA1 OICE, *J. acutus* stems (locality 2) = JA2 SCE, and finally for *J. inflexus* rhizomes (locality 3) = JI3 RCE. The activity of these five crude extracts was quite similar.

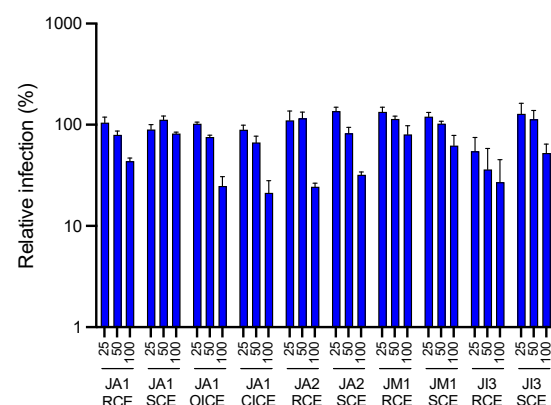


Figure 1. Antiviral activity of the different crude methanolic extracts of *Juncus* species against HCoV-229E-Luc in Huh-7/TMPRSS2 cells. Huh-7/TMPRSS2 cells were inoculated with HCoV-229E-Luc in the presence of the different extracts at 25, 50 and $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The cells were lysed 7 h post-inoculation and luciferase activity was quantified. Data are expressed at mean $\pm$ SEM of 3 experiments performed in triplicate and relative to the control without extract (DMSO) for which a value of 100 was attributed. JA1 = *J. acutus* (locality 1); JA2 = *J. acutus* (locality 2); JM1 *J. maritimus* (locality 1); JI3 = *J. inflexus* (locality 3); RCE = rhizome crude extract; SCE = stem crude extract; OICE = open inflorescence crude extract; CICE = closed inflorescence crude extract.

2.2. Antiviral Activity of Sub-Extracts of *Juncus acutus* Stems (JA2) against HCoV-229E

Ecological reasons to maintain biodiversity led us to continue our study on *Juncus acutus* stems. Indeed, *Juncus* inflorescences were not the most abundant organs in terms of weight of plant raw materials. Even though their crude methanolic extracts demonstrated the most important antiviral activity, it was difficult to continue working on them. Moreover, in an effort to preserve *Juncus* plants, we also decided not to carry on the antiviral study on *J. acutus* rhizomes and *J. inflexus* rhizomes because this plant part is implicated in the vegetative replication of these species and therefore their durability. It was therefore more appropriate to perform our study on the stems of *Juncus acutus* that was collected in the locality 2 in Brittany.

In order to identify the molecule(s) responsible for this activity, bioguided fractionation was performed. At first, liquid-liquid extraction was done using solvents with increasing polarity. Three sub-extracts, methylene chloride (CH_2Cl_2), ethyl acetate (EtOAc) and aqueous were obtained and they were, in their turn, evaluated for their antiviral activity against HCoV-229E. A crude methanolic extract of *Mallotus oppositifolius* was used as a control because this latter was previously described as a highly active extract against HCoV-229E [35].

Our results showed that crude methanolic extract, as well as EtOAc and aqueous sub-extracts obtained from JA2, tested at $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, were the most active against HCoV-229E (Figure 2). EtOAc sub-extract exhibited the most anti-HCoV-229E activity followed by the crude methanolic extract and aqueous sub-extract.

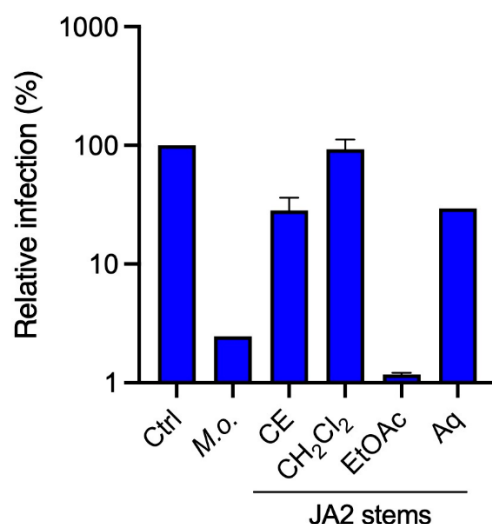


Figure 2. Antiviral activity of crude methanolic extract and sub-extracts obtained from JA2, *Juncus acutus* stems, against HCoV-229E-Luc in Huh-7/TMPRSS2 cells. Huh-7/TMPRSS2 cells were inoculated with HCoV-229E-Luc in the presence of the different extracts at $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The cells were lysed 7 h post-inoculation and luciferase activity was quantified. Results are expressed at the mean $\pm$ SEM of one or two experiments performed in triplicate. Results are expressed relative to the control (DMSO).

2.3. Analysis by UHPLC-UV-MS of Sub-Extracts of *Juncus acutus* Stems (JA2)

Taking into account the polarity nature of both EtOAc and aqueous sub-extracts, it can be assumed that the compound(s) responsible for this anti-HCoV-229E activity are moderately polar constituents or polar constituents. The existing literature has highlighted the fact that flavonoids are specialized metabolites rarely isolated from *Juncus* species [36]. However, some flavones, including luteolin and some of its derivatives, have already been reported in some *Juncus* species, such as *Juncus acutus* [30,36–38].

The different sub-extracts obtained from JA2 were analyzed by UHPLC-UV-MS (Figure 3). The chromatogram of the EtOAc sub-extract at $\lambda = 254 \text{ nm}$ showed the presence of two major peaks with the corresponding retention times $R_t = 3.42 \text{ min}$ and $R_t = 4.36 \text{ min}$. Mass spectra for

these two peaks gave molecular ions $[M - H]^-$ at m/z 447 and 285, respectively. The comparison of retention times and mass spectra of these two peaks with reference standards confirmed the presence of luteolin ($R_t = 4.36$ min; $MW = 286.24$ g·mol $^{-1}$; $C_{15}H_{10}O_6$) and one of its glucoside, luteolin-7-*O*-glucoside ($R_t = 3.42$ min; $MW = 448.4$ g·mol $^{-1}$; $C_{21}H_{20}O_{11}$). These two flavones could potentially be responsible for the antiviral activity highlighted for the EtOAc sub-extract against HCoV-229E. They were also detected in the aqueous sub-extract in trace amounts, which may explain the activity close to that of the crude extract and slightly higher than that of the non-active CH_2Cl_2 sub-extract. The chromatogram of this latter, obtained by UHPLC-UV-MS, showed the presence of phenanthrene derivatives as previously detected in other *Juncus* species, such as juncusol. This class of phytochemicals was already reported in other *Juncus* species [39,40].

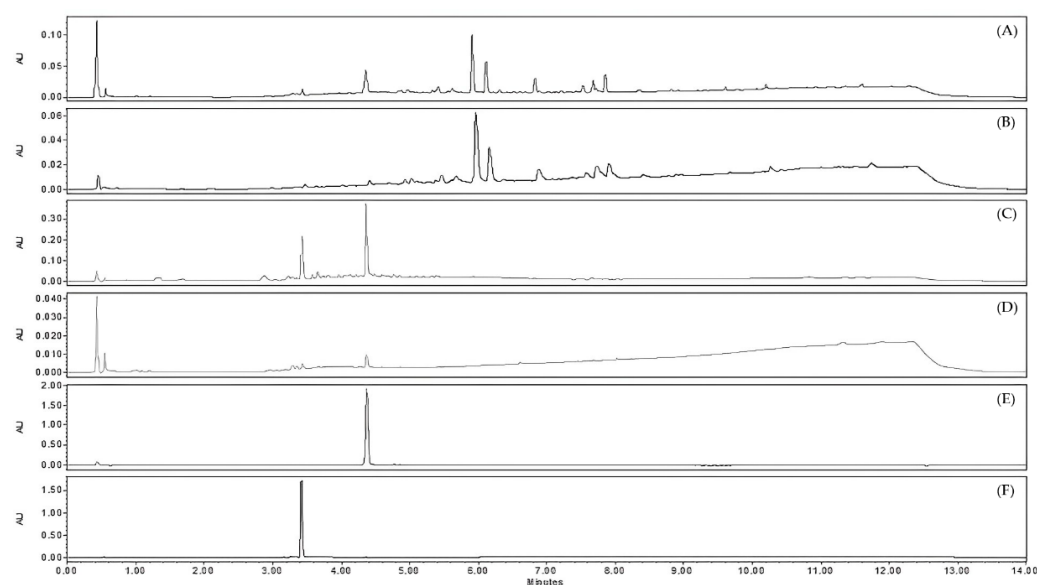


Figure 3. Chromatograms obtained by UHPLC-UV-MS at $\lambda = 254$ nm of different extracts of *J. acutus* stems (JA2) (A) crude methanolic extract, (B) CH_2Cl_2 sub-extract, (C) EtOAc sub-extract, (D) aqueous sub-extract; as well as reference standards (E) luteolin, (F) luteolin-7-*O*-glucoside.

2.4. Identification of the Active Antiviral Compound(s) from the Ethyl Acetate and the Aqueous Sub-Extracts of *Juncus acutus* Stems (JA2) following Bioguided Fractionation

In the light of the above promising antiviral activity results against HCoV-229E, it was decided to pursue bioguided fractionation process on both EtOAc and aqueous sub-extracts to identify the compound(s) responsible for this activity.

2.4.1. Antiviral Activity of Fractions Obtained from JA2 EtOAc Sub-Extract by Semi-Preparative HPLC

The fractionation of the EtOAc sub-extract of JA2 was performed by semi-preparative HPLC. The 12 pre-purified fractions were subjected to the above-mentioned antiviral activity assay against HCoV-229E. For this experiment, a lower range of concentrations was tested, 10 and 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Our results (Figure 4) clearly demonstrated that fraction F7 showed the most remarkable antiviral activity compared to the rest of the tested fractions, with a reduction of approximately 2 log $_{10}$ of the relative luciferase activity at 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

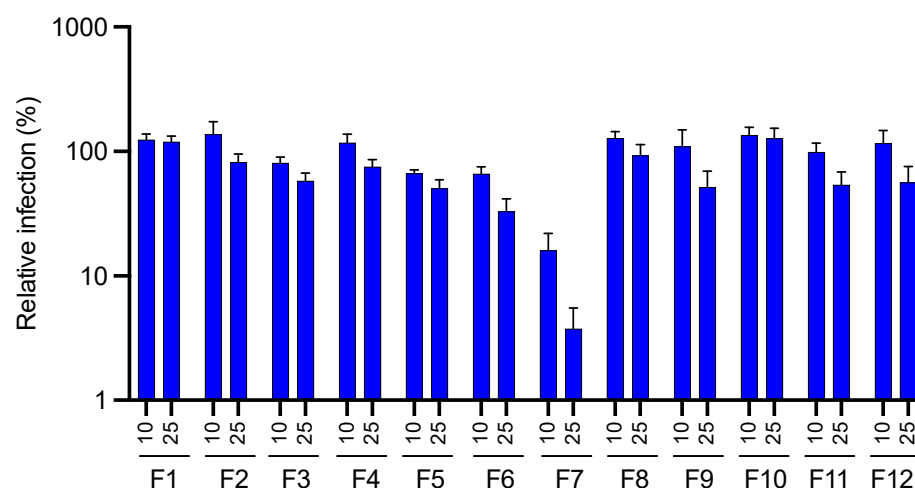


Figure 4. Anti-HCoV-229E activity of the different pre-purified fractions obtained from the EtOAc sub-extract of *J. acutus* stems (JA2) by semi-preparative HPLC. Huh-7/TMPRSS2 cells were inoculated with HCoV-229E-Luc in the presence of the different fractions (F1–F12) obtained from JA2 EtOAc sub-extract at 10 and 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Luciferase activity was quantified 7 h post-inoculation. Data are presented relative to control DMSO for which a value of 100 was attributed and as mean $\pm$ SEM of 3 independent experiments performed in triplicate.

UHPLC-UV-MS analysis were performed on the 12 fractions. The comparison of their UV chromatograms at $\lambda = 254$ nm with those of reference standards (luteolin and luteolin-7-O-glucoside) (Figures 5 and S1) highlighted the abundant presence of luteolin in the active fraction F7. On the basis of the PDA chromatogram, its estimated purity was about 92% according to the integration algorithm ‘Apex Track’ of the software Empower[®] version 3. Fraction F6 appeared to also contain luteolin but in a lesser amount, as well as other minor compounds. The other fractions were slightly active or inactive. Chromatograms from F8 to F12 displayed the presence of some phenanthrene derivatives such as juncusol $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_2$ ($R_t = 5.88$ min; $\text{MW} = 266.3$ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$). The fractions F1 to F5 were mainly consisted of luteolin-7-O-glucoside.

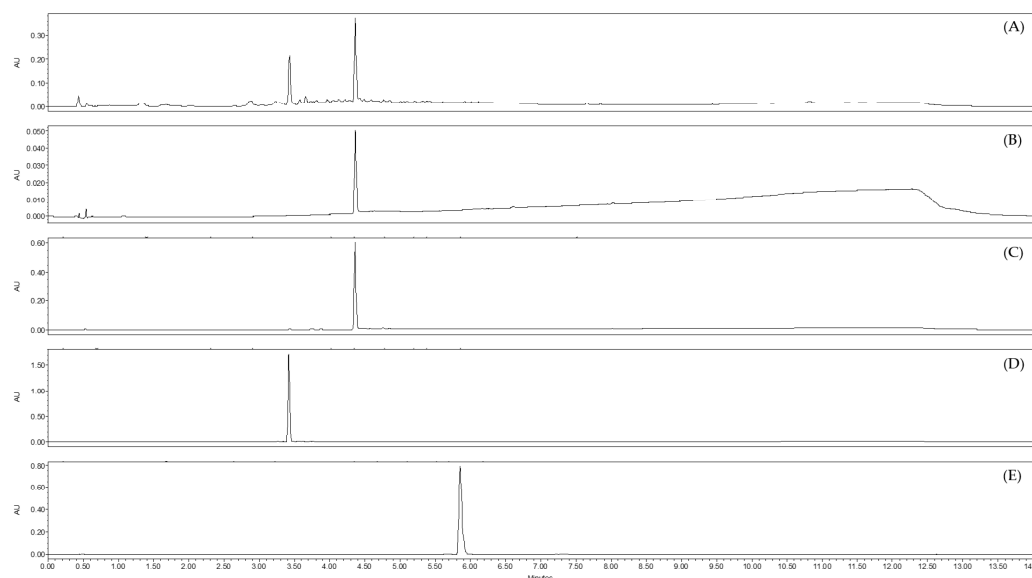


Figure 5. Chromatograms acquired by UHPLC-UV-MS at $\lambda = 254$ nm of (A) EtOAc sub-extract of *J. acutus* stems (JA2), (B) the active pre-purified fraction F7 obtained by semi-preparative HPLC from the same sub-extract, and reference standards (C) luteolin, (D) luteolin-7-O-glucoside and (E) juncusol (at $\lambda = 280$ nm).

All these findings supported the plausibility of our hypothesis that luteolin (Figure 6) was the flavone responsible for the antiviral activity against HCoV-229E. The glycosylated form of luteolin, luteolin-7-O-glucoside, was not active against HCoV-229E.

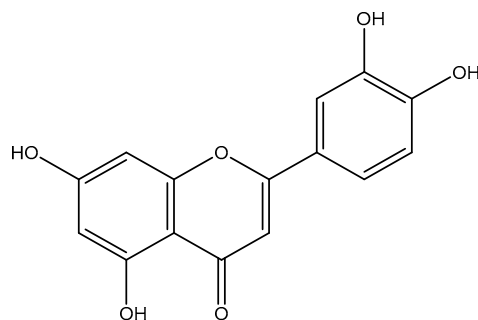


Figure 6. Luteolin.

2.4.2. Antiviral Activity of Fractions Obtained from JA2 Aqueous Sub-Extract by CPC

Compared to the EtOAc sub-extract, the aqueous sub-extract of JA2 displayed to a lesser degree an antiviral activity against the coronavirus HCoV-229E. Similarly to the EtOAc sub-extract, we wanted to identify the compound(s) responsible for this activity. For this purpose, the aqueous sub-extract was subjected to CPC fractionation using a ternary system composed of EtOAc/Isopropanol/Water (7:3:10). The 12 pre-purified fractions were grouped on the basis of similar chromatographic profiles, then were evaluated for their antiviral activity against HCoV-229E at a concentration of $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A higher concentration than the one used for the EtOAc fractions was used because no antiviral activity was observed at $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

According to our results, fractions F3 and F4 showed sequentially the highest anti-HCoV-229E activity (Figure 7). As we have previously postulated that luteolin present in both EtOAc and aqueous sub-extracts of *Juncus acutus* stems was responsible for the observed antiviral activity, we analyzed therefore the phytochemical composition of these two active pre-purified fractions by UHPLC-UV-MS. As suggested, our data (Figure 8) clearly confirmed the presence of luteolin in fractions F3 and F4. Hence, the abundance of luteolin in fraction F3 can be correlated with the antiviral activity previously observed for the same fraction. These results are in agreement with those obtained for the EtOAc sub-extract.

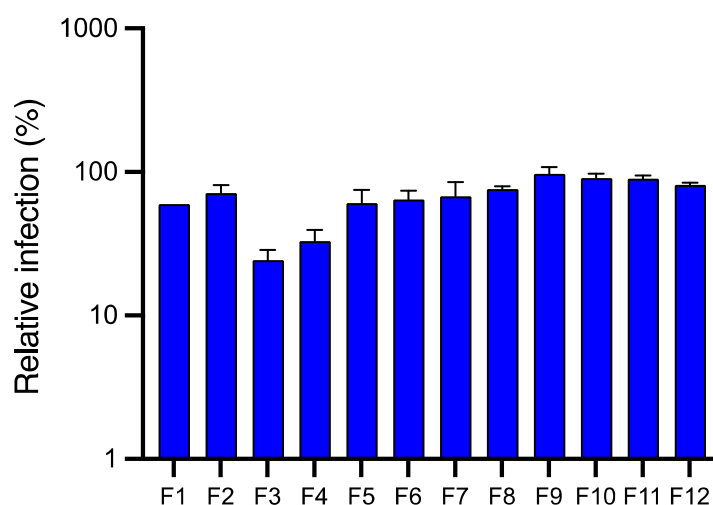


Figure 7. Anti-HCoV-229E activity of the different pre-purified fractions obtained from the aqueous sub-extract of *J. acutus* stems (JA2) by CPC. Huh-7/TMPRSS2 cells were inoculated with HCoV-229E-Luc in the presence of the different fractions (F1–F12) obtained from JA2 aqueous sub-extract at $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Data are expressed relative to control (DMSO) and as mean $\pm$ SEM of 3 independent experiments performed in triplicates.

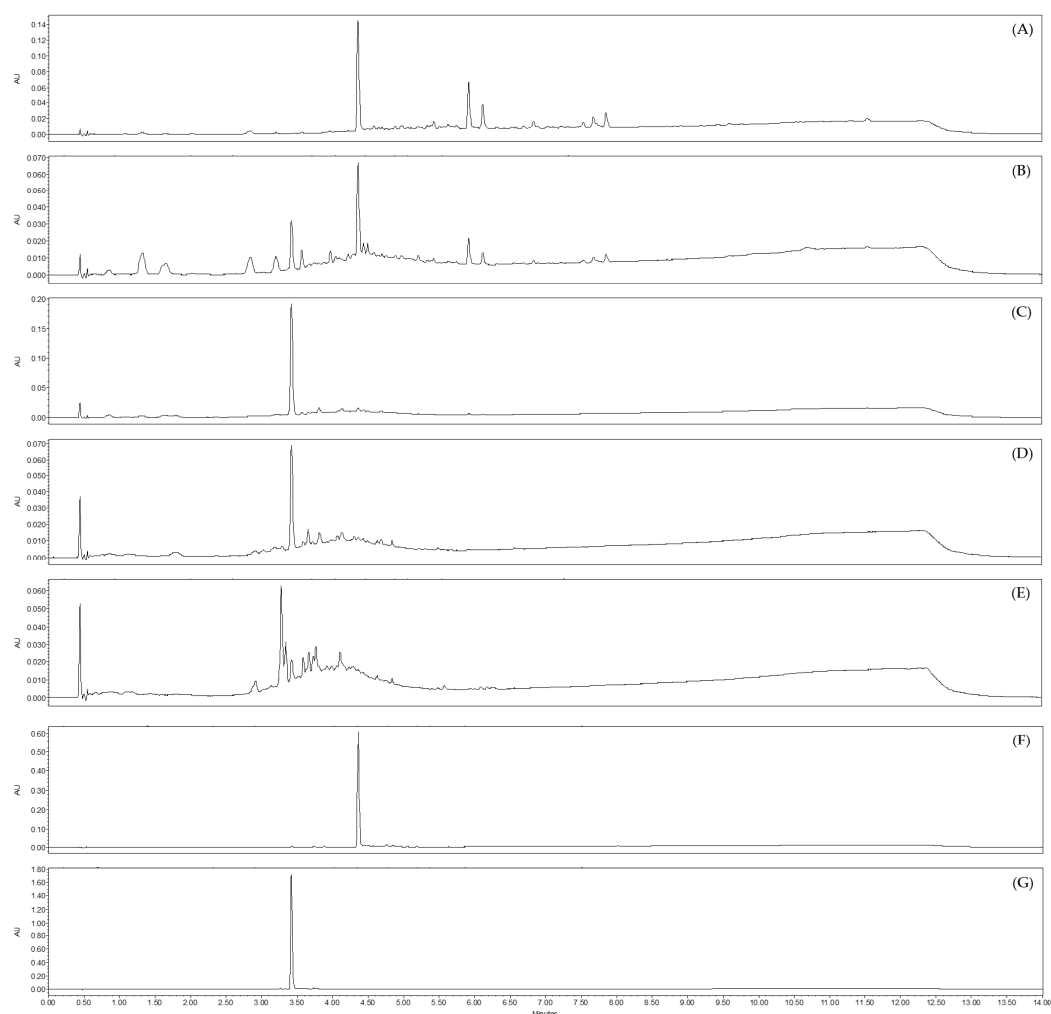


Figure 8. Chromatograms obtained by UHPLC-UV-MS at $\lambda = 254$ nm of the most active pre-purified fractions obtained by CPC from the aqueous sub-extract of *J. acutus* stems (JA2), (A) fraction F3, (B) fraction F4, as well as non-active fractions from the same sub-extract, (C) fraction F5, (D) fraction F6, (E) fraction F7. (F) luteolin and (G) luteolin-7-*O*-glucoside are reference standards.

Considering all acquired data, luteolin is undoubtedly the compound responsible for the antiviral activity against HCoV-229E of the two JA2 sub-extracts (EtOAc and aqueous). Further experiments were required in order to probe the antiviral activity of luteolin against HCoV-229E and to gain more insight into its toxicity and its potential mechanism of action.

2.5. Antiviral Activity of Luteolin against HCoV-229E and Toxicity in Huh-7 Cells

To confirm that luteolin is the active compound identified in the different pre-purified active fractions, its toxicity and its antiviral activity were tested in dose-response experiments. For toxicity, Huh-7 cells were incubated with luteolin at different concentrations for 24 h and the toxicity was quantified by MTS assay (Figure 9A). Our results showed that the half-maximal cytotoxic concentration (CC_{50}) of luteolin was approximately 33 μ M. For antiviral assays, Huh-7 cells expressing or not TMPRSS2 were inoculated with increasing concentrations of luteolin. Our data showed a dose-dependent inhibition of HCoV-229E-Luc infection confirming that luteolin was the active compound of JA2 sub-extracts (Figure 9B). The IC_{50} was similar in Huh-7 and Huh-7/TMPRSS2 cells (1.77 and 1.95 μ M, respectively) underlying thereby that luteolin exhibited an antiviral activity against HCoV-229E regardless the entry pathway. From these data, respective selectivity index (SI) values, 18.6 and 16.9, were determined. The results presented in Figure 9A clearly showed that luteolin was not toxic at active concentration.

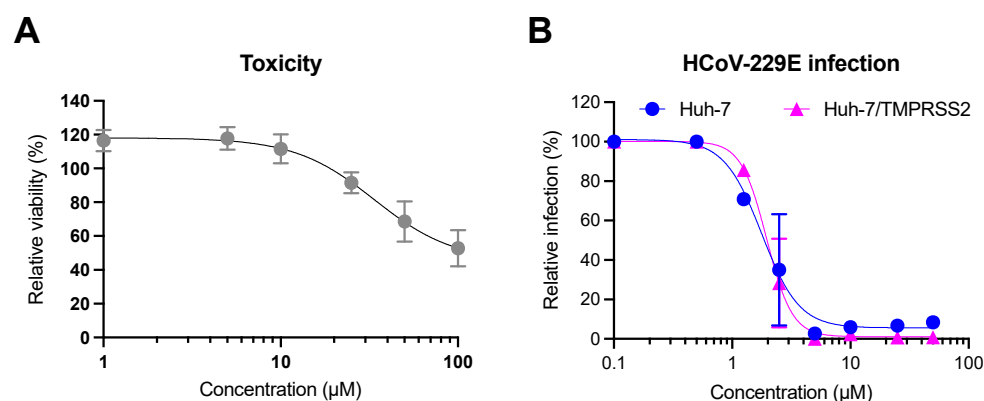


Figure 9. Toxicity and antiviral activity of luteolin. For toxicity assay (A), Huh-7 cells were incubated with different concentrations of luteolin for 24 h. The medium was replaced with MTS to determine the cell viability. For antiviral assays (B), Huh-7 cells expressing or not TMPRSS2 were inoculated with HCoV-229E-Luc in the presence of different concentration of luteolin for 1 h. The inoculum was removed and replaced with culture medium containing luteolin at the same concentration; 7 h post-inoculation, cells were lysed and luciferase activity was quantified. Results were expressed relative to the control for which a value of 100% (either viability or infection) was attributed. Results are the mean $\pm$ SEM of 3 experiments performed in triplicates.

2.6. Mechanism of Action of Luteolin against HCoV-229E

To determine which virus infection step was inhibited by luteolin, a time of addition assay was performed. The molecule was added, at a concentration of 10 μ M, at different time points during infection (Figure 10A). Three different inhibitors were added as control, camostat, a TMPRSS2 inhibitor that inhibits entry, GC376, a protease inhibitor that inhibits replication, and remdesivir, a RdRp inhibitor that also inhibits replication. As shown in Figure 10B, luteolin was the most active when it was added at post-inoculation (PI): either 1 h PI or 2 h PI, similarly to results obtained with GC376 and remdesivir. Taken together, these data indicated that luteolin was an inhibitor of the replication step of HCoV-229E.

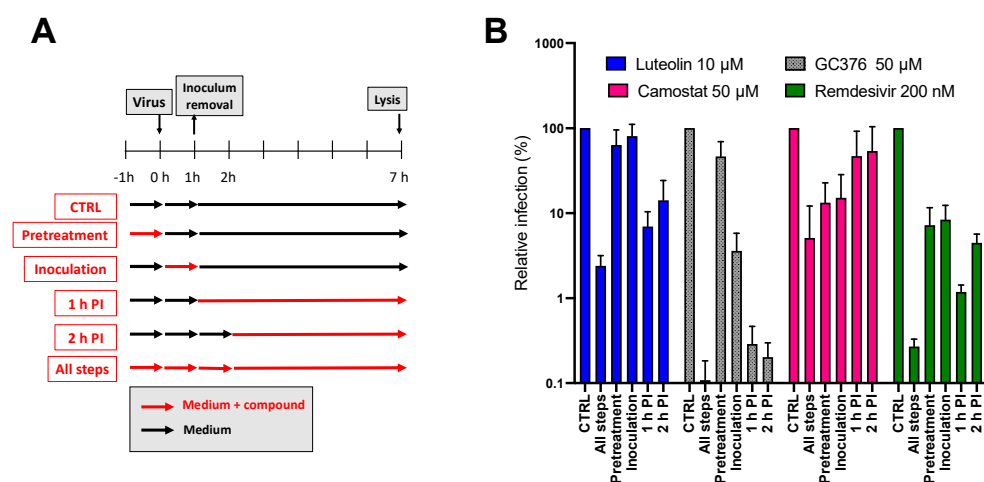


Figure 10. Luteolin is active at the replication step. (A) Schematic representation of the time of addition assay; (B) Huh-7/TMPRSS2 cells were inoculated with HCoV-229E-Luc. Luteolin (10 μ M), GC376 (50 μ M), camostat (50 μ M) and remdesivir (200 nM) were added at different time points either before, during or post-inoculation (1 h or 2 h post-inoculation). Cells were lysed 7 h post-inoculation and luciferase activity was quantified. Results were expressed relative to the control without compound for which a value of 100 was attributed. Results are means $\pm$ SEM of 3 experiments performed in triplicate.

2.7. Antiviral Activity of Luteolin against SARS-CoV-2 and MERS-CoV

Regarding the strong activity of luteolin on HCoV-229E, the antiviral activity of this molecule was tested against highly pathogenic coronaviruses SARS-CoV-2 and MERS-CoV. GC376, a protease inhibitor or remdesivir, were added as controls. The results showed that GC376 and remdesivir inhibited SARS-CoV-2 and MERS-CoV, respectively. Unfortunately, no inhibition of infection was observed against these two viruses showing that luteolin was not active neither on SARS-CoV-2 nor on MERS-CoV. Altogether, the findings showed that luteolin is a specific replication inhibitor of HCoV-229E but has no obvious antiviral activity on SARS-CoV-2 and MERS-CoV in vitro (Figure 11).

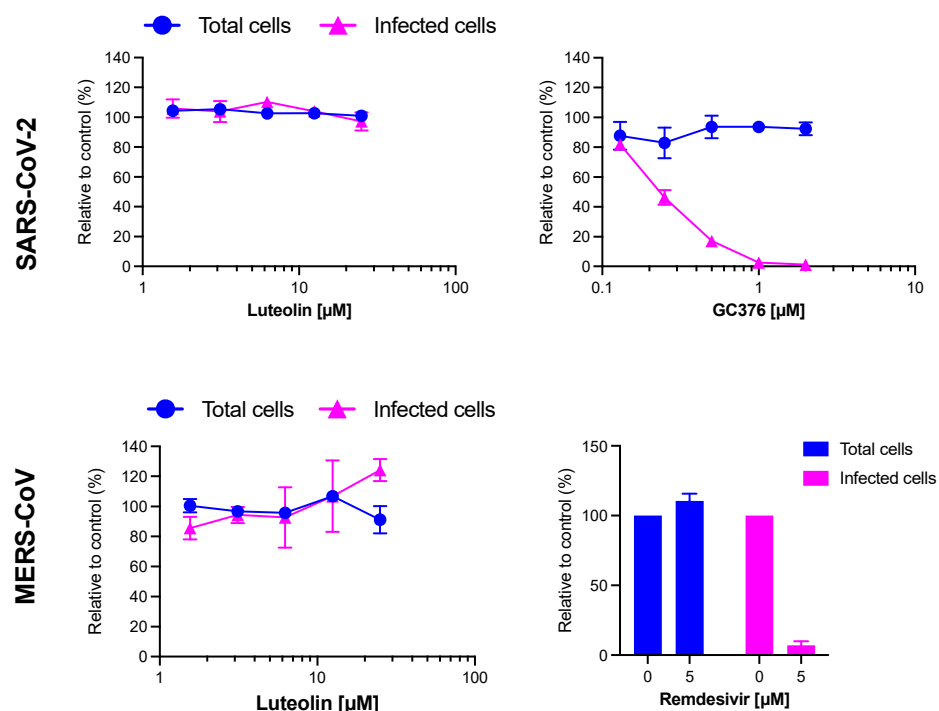


Figure 11. Luteolin is not active against SARS-CoV-2 and MERS-CoV. Vero81-derived F1G-red cells and Calu-3 cells were inoculated with SARS-CoV-2 and MERS-CoV (MOI 0.2), respectively, in the presence of increasing concentrations of luteolin or control compounds (GC376 and remdesivir for SARS-CoV-2 and MERS-CoV, respectively). For SARS-CoV-2 infection in F1Gred cells, infected cells and total cell numbers were recorded and quantified 16 h post-inoculation as previously described (Desmarets et al., 2022). For MERS-CoV infection in Calu-3 cells, cells were fixed with 4% PFA 16 h post-inoculation and immunofluorescence staining was performed against dsRNA. Nuclei were visualized with DAPI. Images were obtained with an EVOS M5000 imaging system and percentage of infected cells and total cell numbers were quantified with the Image J software version 1.5i. Data are presented as percentage of infection relative to the DMSO controls. Data are means $\pm$ SEM of 2 independent experiments performed in triplicates.

3. Discussion

Human coronaviruses, belonging to the genus Alphacoronavirus or Betacoronavirus, have the ability to trigger symptoms with different severity; from common cold to life-threatening respiratory illnesses in the lower respiratory tract [41]. The recent outbreak of COVID-19 has pointed out the lack of clinically proven therapeutics to combat coronavirus infections. Plants are known to be a great source of antimicrobial agents [22,42]. They can be selected according to different approaches: traditional knowledge, chemotaxonomy or ecological criteria. In a previous study conducted in our laboratory, we demonstrated the relevance of the ecological approach by underlining the antiviral activity of *Juncus maritimus* against hepatitis C virus and highlighting the potential of dehydrojuncusol as a NS5A inhibitor [30,31]. In this present study, we continued to investigate the antiviral potential

of *Juncus* species, whether halophytes and glycophytes, but this time against coronavirus infections. Considering some aspects of biodiversity preservation and accessibility to resources, we have chosen to deepen the antiviral activity of the crude methanolic extract of *Juncus acutus* stems, even if other crude extracts were slightly more active (inflorescences or rhizomes). HCoV-229E was selected for the evaluation of the antiviral activity of the selected plants because of its minimal pathogenicity and its general association with asymptomatic to mild disease and sometimes acute respiratory distress syndrome [43]. Bioguided fractionation, combining conventional purification techniques (liquid-liquid extraction, semi-preparative HPLC and CPC) with in vitro antiviral experiments allowed us to identify the molecule, present in the crude methanolic extract, responsible for this activity. It is the flavone luteolin or 3',4',5,7-tetrahydroxyflavone. This specialized metabolite was the major compound of the active fraction F7 obtained from the ethyl acetate sub-extract of *J. acutus* stems. Luteolin is commonly ubiquitous throughout the plant kingdom and was described as one of the major phenolic flavonoids of soft rush (*Juncus effusus* L.) [44,45]. This flavone is frequently present under its glycosylated form in various dietary sources and medicinal plants. The health benefits of luteolin have been extensively described in literature, among them, antioxidant, anti-inflammatory, sun protectant, antimicrobial, chemoprotective and chemotherapeutic properties [46–49]. In the case of our antiviral study, luteolin was inactive against HCoV-229E under its glycosylated form, luteolin-7-O-glucoside, the main constituent of fractions F2, F3, F4 and F5 of the EtOAc sub-extract and fractions F5 and F6 of the aqueous sub-extract of *J. acutus* stems (JA2). Likewise, phenanthrene derivatives, identified in the methylene chloride sub-extract, which had previously shown an antiviral activity against hepatitis C virus, were not active against coronaviruses.

Before conducting our antiviral study against HCoV-229-E and SARS-CoV-2, it was important to ensure that luteolin does not affect cellular functions when administered at the active dose. In this study, we determined a half-maximum cytotoxic concentration (CC₅₀) equal to 33 µM for luteolin using MTS assay on Huh-7 cells. A higher CC₅₀ (155 µM) was reported on Vero E6 cells by the MTT assay [50]. In another study, luteolin showed a cytotoxic effect at 50 µM on MH14 cells, which are a derivative of the Huh-7 cell line [51].

Afterward, we determined the antiviral activity of luteolin against HCoV-229E using Huh-7 and Huh-7/TMPRSS2 cells. Similar IC₅₀ values were obtained in both cell types, 1.77 and 1.95 µM respectively. These results showed clear evidence that luteolin exhibits anti-HCoV-229E activity regardless the entry pathway.

The antiviral activity of luteolin has been highlighted in many studies against both enveloped and non-enveloped viruses; among them the Influenza A virus, the Japanese encephalitis virus, the hepatitis B virus, the human immunodeficiency virus (HIV-1), the enterovirus 71 (EV71) and the coxsackievirus A16 (CA16) [49,52–55].

Depending on the studied virus, different mechanisms of action were reported for luteolin. For enteroviruses EV71 and CA16, it was reported that luteolin targets their post-attachment stage infection and block their RNA synthesis [55]. Luteolin was also described as anti-HIV-1 molecule, precisely at the Tat-LTR transactivation (transcriptional step) [54]. Moreover, Manvar and collaborators demonstrated that luteolin can inhibit the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) activity of the non-structural protein 5B (NS5B) of hepatitis C virus with a IC₅₀ equal to 52 µM [51]. More recently, the in vitro antiviral activity of luteolin against influenza A virus was outlined, specifically at the early stages of its lifecycle. Evidence that luteolin blocked the absorption and internalization of influenza virus was brought to light using time of addition assay. The highlighted mode of action of luteolin in the study was the one involving the host protein COPI [49].

To gain insight into the potential mechanism of action of luteolin against HCoV-229E, we added luteolin at different time points during infection and compared its activity with those of selected inhibitors, camostat, GC376 and remdesivir. Our data showed that luteolin had an antiviral activity at the same step as GC-376 (protease inhibitor) and remdesivir (RdRp inhibitor), when it was added at post-inoculation (1 h or 2 h). These findings

indicated that luteolin is an inhibitor of the replication step of HCoV-229E. However, further experiments are needed to determine its precise mechanism of action.

One of the main challenges in the fight against HCoVs is to find broad-spectrum antivirals capable of inhibiting both alphacoronavirus and betacoronavirus. Luteolin turned out to be inactive against both SARS-CoV-2 and MERS-CoV in our in vitro experiments showing that luteolin did not have a broad-spectrum activity against all HCoVs. Its activity seemed to be specific to the alphacoronavirus HCoV-229E. It would be interesting, in the future, to test its capacity to inhibit other coronaviruses belonging to alphacoronavirus genus. Luteolin has been the subject of multiple in silico studies showcasing molecular docking simulations. Unlike our in vitro results, in silico studies highlighted a potential interest of luteolin against SARS-CoV-2 infections. It was described as an allosteric modulator of the spike protein of SARS-CoV-2 [56]. In another study, luteolin was also reported as a potent inhibitor that is capable of getting entry into the active sites of Mpro (3CLpro) and ACE2 [57]. In the same way, the inhibitory activity of luteolin against the RdRp was demonstrated in the experimental-computational study of Munafò and his collaborators [58]. However, these in silico strategies must remain complementary to the in vitro and in vivo approaches as they may have some limitations [59]. In silico analysis were not confirmed by our in vitro assays.

A study conducted by Yi et al., right after the global outburst of SARS-CoV in 2003, has identified luteolin, among other small molecules, as a potential drug, which can interfere with the entry of SARS-CoV into host cells. Thanks to the frontal affinity chromatography-mass spectrometry (FAC/MS) method, luteolin was selected because it exhibited a strong binding affinity to the fusion protein GST-S2, an S2 protein fragment that corresponds to the sequence between Asn733 to Gln1190 of the SARS-CoV S protein and plays a crucial role in the virus-cell fusion process. To investigate its antiviral activity, HIV-luc/SARS pseudotyped virus and wild-type SARS-CoV infection assays were performed on Vero E6. Respective EC₅₀ values of 9.02 µM and 10.6 µM were determined for luteolin [50]. These results suggested that luteolin could be active at the entry pathway of SARS-CoV. Despite the similarities of SARS-CoV and SARS-CoV-2, we were not able to show an activity of luteolin on SARS-CoV-2 entry. It would be interesting to determine if luteolin is active on SARS-CoV, in a cell culture assay reproducing the complete viral cycle.

A better understanding of the mechanism of action of anti-SARS-CoV-2 candidates, including molecules from plant origin, is also highly important as natural products and/or their synthetic analogues can veritably accelerate the process of discovering and developing new molecular entities with greater efficacy and affinity, and with fewer side effects. The combination of already-existing antivirals with bioactive natural compounds such as luteolin or other drugs can also be a promising approach for developing anti-coronavirus treatments [22].

The bioavailability of luteolin still deserves further study, but it appears to be absorbed quite rapidly into plasma and persists in plasma after being metabolized to glucuronide and sulfate conjugates [60,61]. Luteolin was also previously identified as a highly bioactive phytochemical in *Artemisia afra* Jacq. ex Willd (Asteraceae), a plant widely used in traditional medicine especially for treating respiratory disorders. This flavone was demonstrated to contribute significantly in the broncho-dilatory effects of *Artemisia afra* notably under its nebulized form [62]. More recently, luteolin was also the focus of a clinical trial that aimed to treat olfactory dysfunction of SARS-CoV-2-affected patients. This latter showed that supplementation with palmitoylethanolamide (PEA) combined with luteolin can greatly improve the recovery of olfactory functions [63]. Luteolin is considered non-toxic with oral LD50 value greater than 2500 mg/kg in mouse and greater than 5000 mg/kg in rats [64]. No toxicity was observed in humans when administered at a dose of 100 mg/day [61]. Taken together, our data showed that luteolin might be a promising agent against mild HCoVs. Due to its good safety and its broad-spectrum antiviral activities, luteolin could provide a clinical solution for coronavirus treatment. Further experiments are needed to determine its precise mechanism of action.

4. Materials and Methods

4.1. Plant Material

Three *Juncus* species were collected in 2 regions in France, Brittany (2 different localities: 1 and 2) and Nouvelle-Aquitaine (locality 3) during July 2018 (Table 1 and Figure 12). Botanical identification was performed by Drs. Gabriel Lefèvre and Céline Rivière and a voucher specimen for each plant was deposited at the laboratory of Pharmacognosy, University of Lille, France.

Table 1. Collected *Juncus* species used in this study.

Species	Plant Part	Region	Geographical Coordinates
<i>Juncus acutus</i> L.	rhizomes, stems, inflorescences	Brittany, locality 1	48°48′44″ North, 3°05′27″ West
<i>Juncus acutus</i> L.	rhizomes, stems	Brittany, locality 2	48°49′48″ North, 3°04′40″ West
<i>Juncus inflexus</i> L.	rhizomes, stems	Nouvelle-Aquitaine, locality 3	44°59′44″ North, 0°26′41″ West
<i>Juncus maritimus</i> Lam	rhizomes, stems	Brittany locality 1	48°48′44″ North, 3°05′27″ West

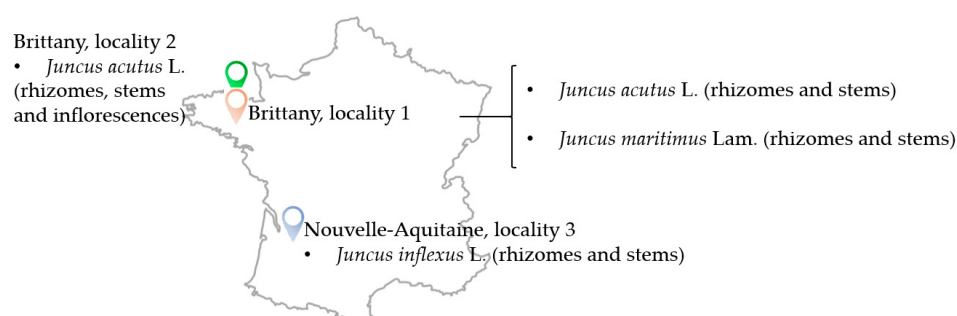


Figure 12. Illustrative map showing the locations from which *Juncus* species were collected during July 2018 (France).

4.2. Plant Extract Preparation

All collected plants were dried at 30 °C in a light protected environment. Their organs (rhizomes, stems and inflorescences) were powdered separately and stored in the dark. The crude extract of each organ was obtained by performing 4 sessions of maceration (12 h for each) in methanol, which were done at room temperature, away from light and under stirring. At the end of each maceration, the filtered methanolic extract was evaporated at 30 °C by a rotary evaporator (Heidolph™, Schwabach, Germany). The obtained dry methanolic extracts were then suspended in water in a round-bottom flasks, frozen overnight and finally lyophilized at −50 °C using a freeze dryer (Telstar Cryodos™, Barcelona, Spain) for better and longer preservation. The yield of each crude methanolic extract (%) was calculated based on the dry weight (20 g for rhizomes and stems and 10 g for inflorescences) (Table 2).

Table 2. Yields of the different crude methanolic extracts obtained after solid/liquid extraction.

Species	Plant Part	Abbreviation	Yield (%)
<i>J. acutus</i> (locality 1)	rhizomes	JA1 RCE	9.6
	stems	JA1 SCE	12.3
	open inflorescences	JA1 OICE	2.7
	closed inflorescences	JA1 CICE	8.5
<i>J. acutus</i> (locality 2)	stems	JA2 SCE	11.85
	rhizomes	JA2 RCE	6.95
<i>J. maritimus</i> (locality 1)	rhizomes	JM1 RCE	11.25
	stems	JM1 SCE	11.6
<i>J. inflexus</i> (locality 3)	rhizomes	JI3 RCE	5.2
	stems	JI3 SCE	11.5

4.3. Solvent-Solvent Partition of *Juncus acutus* Stems (JA2 SCE)

Only the crude extract of *Juncus acutus* stems (5.15 g) was subjected to partitioning with liquid-liquid extraction using solvents with increasing polarity. The crude extract was suspended in water (300 mL) and the partitioning was, firstly, performed with methylene chloride (CH₂Cl₂) (Carlo Erba Reagents[®], Val de Reuil, France) (3 × 300 mL) then with ethyl acetate (EtOAc) (Carlo Erba Reagents[®], Val de Reuil, France) (3 × 300 mL). Anhydrous sodium sulfate (Na₂SO₄) was added to the organic phase in order to remove residual traces of water. After filtration, the CH₂Cl₂ phase and the EtOAc phase were evaporated using a rotary evaporator and the aqueous phase was frozen then lyophilized. The yield percentages of the three obtained sub-extracts were the following: 7.13% for the CH₂Cl₂ sub-extract, 4.54% for the EtOAc sub-extract and 72.58% for the aqueous sub-extract.

4.4. Fractionation of the EtOAc Sub-Extract of *Juncus acutus* Stems

The fractionation of the EtOAc sub-extract of *Juncus acutus* stems was performed using semi-preparative HPLC. The equipment was composed of Shimadzu[®] LC-20AP binary high-pressure pumps, a SPD-M20A photodiode array detector and a CBM-20A controller. A VisionHT C₁₈ HL (5 µm, 250 × 10 mm) column (Grace, batch number 60/036) was used in this experiment as the stationary phase. The mobile phase was composed of ultra-pure water (Millipore Integral 5 Milli-Q, Merck[™], Trosly-Breuil, France) + 0.1% formic acid (Merck[™], Darmstadt, Germany) (solvent A) and acetonitrile (Carlo Erba Reagents[®], Val de Reuil, France) (solvent B). The elution program started with 5% of solvent B to reach 100% within 60 min. The flow rate was set at 3 mL·min^{−1}. 8 injections of 12.5 mg of EtOAc sub-extract of *Juncus acutus* stems solubilized in 500 µL of MeOH were performed. The fractionation monitoring was carried out at three main wavelengths: 254 nm, 280 nm and 320 nm. 12 fractions (EtOAc F1 → EtOAc F12) were obtained at the end of the experiment. They were, later on, analyzed with UHPLC-UV-MS.

4.5. Fractionation of the Aqueous Sub-Extract of *Juncus acutus* Stems

The fractionation of the aqueous sub-extract of *Juncus acutus* stems was carried out by centrifugal partition chromatography (CPC). Several ternary systems were tested in different proportions: AcOEt/ACN/H₂O, AcOEt/Isopropanol/H₂O and AcOEt/Butanol/H₂O. The ternary system composed of EtOAc/Isopropanol/H₂O (7:3:10; v/v/v) was selected because it provided a partition coefficient (K_d) for luteolin-7-O-glucoside close to 1 (K_d = 1.022), whereas luteolin remained in the upper phase.

The CPC instrument (Armen instruments[®], Saint-Avé, France) was equipped with a column compartment (250 mL rotor), a Shimadzu[®] pump (LC-20AP, Kyoto, Japan), a DAD detector (SPD-M20A) and an automated fraction collector (Gilson[®] FC 204, Villiers-le-Bel, France). The elution profile was monitored by LabSolutions[™] software version 1.25.

The CPC rotor was firstly filled with the stationary phase (lower phase) at a flow rate of $30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (500 rpm) in ascending mode. Equilibration was attained while introducing the mobile phase (upper phase) at 1600 rpm and a flow rate of $8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. 1 g of the aqueous sub-extract of *Juncus acutus* stems, previously dissolved in 8 mL of the organic/aqueous phase mixture (1:1, *v/v*) and filtered through a Millipore ($0.45 \mu\text{m}$) syringe filter, was immediately injected after the displacement of stationary phase (100 mL). The elution was done at $8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ for a duration of 60 min and monitored at $\lambda = 254 \text{ nm}$. After that, extrusion mode was performed to allow recover the molecules that were heavily retained in the stationary phase. At the end of the CPC run, the 105 obtained fractions were characterized by UHPLC-UV-MS and then pooled into 12 fractions according to their phytochemical profiles. The 12 fractions were then concentrated by a centrifugal concentrator (GenevacTM, Fisher-Scientific, Illkirch, France)

4.6. UHPLC-UV-MS Analysis

The Acquity UPLC H-Class Waters[®] System (Guyancourt, France) apparatus was equipped with two independent pumps, a controller, a diode array detector (DAD) and a QDa electrospray quadrupole mass spectrometer. The stationary phase was a C₁₈ BEH ($2.1 \times 50 \text{ mm}$, $1.7 \mu\text{m}$) reverse column. The mobile phase was composed of two solvents: (A) ultrapure water + 0.1% formic acid (Carlo Erba Reagents[®], Val de Reuil, France) and (B) Acetonitrile (Carlo Erba Reagents[®], Val de Reuil, France) + 0.1% formic acid. A method was specially developed for the analysis of *Juncus* extracts, sub-extracts, fractions and purified compounds. Flow rate and column temperature were set at $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and $30 \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ respectively. Wavelength range was fixed at 200–790 nm with a resolution of 1.2 nm. Ionization was carried out in both negative and positive mode with a mass range of 100 to 950 Da. Cone voltage and capillary voltage values were 15 V and 0.8 kV respectively. Injection volume was set at 2 μL . UHPLC-UV-MS analysis were executed following the elution program: 10% → 100% (B) (0–9 min), 100% (B) (9–11 min) and 10% (B) (11–14 min). All samples were prepared at $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ in analytical grade MeOH and filtered through a PTFE $0.4 \mu\text{m}$ membrane before injection. Only standards, luteolin (Sarsyntex), luteolin-7-O-glycoside (Sarget) and phenanthrene derivatives such as juncusol (purified in the laboratory) were prepared at $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. The acquired data were compared to online databases like PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) (accessed on 21 November 2022).

4.7. Cells and Culture Conditions

Human hepatoma cell line Huh-7 and African monkey kidney cell lines Vero-81 cells were grown in DMEM with glutaMAX-I and 10% FBS in an incubator at $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ with 5% CO₂. Human lung cell line Calu-3 (ATCC number HTB-55) was maintained in MEM supplemented with 10% FBS and glutaMAX-I.

4.8. Viruses

The following viral strains were used: recombinant HCoV-229E-Luc (kindly gifted by Pr. V. Thiel) [65]; SARS-CoV-2 (isolate SARS-CoV-2/human/FRA/Lille_Vero-81-TMPRSS2/2020, NCBI MW575140) and MERS-CoV (MERS-CoV-EMC12, kindly provided by Luis Enjuanes).

4.9. Cell Toxicity Assay

6×10^4 Huh-7 cells were seeded in 96-well plates and incubated for 16 h at $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ incubator. The cells were then treated with increasing concentrations of each extract, fraction or compound and incubated at $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ for 23 h. An MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]-based viability assay (Cell Titer 96 Aqueous non-radioactive cell proliferation assay, Promega) was performed as recommended by the manufacturer. The absorbance of formazan at $\lambda = 490 \text{ nm}$ was detected using a plate reader (ELX 808 Bio-Tek Instruments Inc., Charlotte,

VT, USA). Each measure was performed in triplicate and each experiment was repeated at least 3 times.

4.10. Antiviral Activity Assay on HCoV-229E

Hepatoma cell line Huh-7 and Huh-7 cells transduced with a lentivirus encoding for TMPRSS2 protease, a cellular protease that allows fusion of the virus at the host cell surface (Huh-7/TMPRSS2), were used for all HCoV-229E infection assays. All the above-mentioned samples from *Juncus acutus* stems were screened for their antiviral activity against HCoV-229E-Luc expressing the luciferase, a recombinant HCoV-229E with luciferase reporter gene. Huh-7 cells seeded in 96-well plates were inoculated with HCoV-229E-Luc in the presence of each extract, fraction or compound for 1 h. Inoculum was then removed and replaced with culture medium containing the compounds for another 6 h. Finally, cells were lysed in 20 µL of Renilla lysis buffer (Promega) and luciferase activity was quantified using Renilla luciferase assay kit (Promega). Luciferase activity was measured by the use of a Tristar LB941 luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany).

4.11. SARS-CoV-2 Infection Assay

A Vero-81 reporter cell line for SARS-CoV-2 infection, F1G-Red, was used in this study. F1G-red cells were seeded in 384-well plates at a concentration of 4000 cells per well. The next day, cells were inoculated with SARS-CoV-2 (MOI 0.2) in the presence of 50 nM tariquidar and increasing doses of luteolin (0, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5 or 25 µM) or GC376 (0, 0.125, 0.250, 0.5, 1 or 2 µM). 16 h post-inoculation, image acquisition was performed using an InCell-6500 automated confocal microscope (Cytiva) and percentages of infection and total cell numbers were assessed as described before [66].

4.12. MERS-CoV Infection Assay

Calu-3 cells, seeded on coverslips 24 h before inoculation, were inoculated with MERS-CoV at an MOI of 0.2 in the presence of increasing doses of luteolin (0, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5 or 25 µM) or remdesivir (0 or 5 µM). 16 h post-inoculation, cells were fixed with 4% PFA. After permeabilization with 0.1% Triton-X100 in PBS for 5 min at RT, cells were incubated with 10% normal goat serum for 20 min at RT. Viral dsRNA was visualized by incubation with mouse monoclonal anti-dsRNA antibodies (clone J2, Scicons) in 10% normal goat serum, followed by incubation with Alexa Fluor® 488-conjugated goat-anti-mouse IgG secondary antibodies. Nuclei were visualized with 1 µg/mL of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), and coverslips were mounted in Mowiol® mounting medium. Images were obtained with an EVOS M5000 imaging system and percentage of infected cells and total cell numbers were quantified with the Image J software version 1.5i.

5. Conclusions

Luteolin, isolated from *Juncus acutus* stems, showed a very strong antiviral activity against the alphacoronavirus HCoV-229E. Our study underlined that this ubiquitous flavone acts as an inhibitor of the replication step. The identification of its exact target could be a future perspective. On the other hand, the activity of luteolin could not be demonstrated against the betacoronaviruses, SARS-CoV-2 and MERS-CoV. This flavone is therefore not active against all of the members of the *Coronaviridae* family, suggesting that it could target a HCoV-229E protein(s) or a cellular factor specifically involved in HCoV-229E RNA replication. Moreover, our results are in discordance with some in silico studies focused on luteolin and highlight the relevance of using traditional in vitro strategies. To conclude, luteolin is showing promising results and could serve as a lead for further drug development in the treatment of coronavirus based on different strategies such as nanotechnology, pharmacomodulation, combination drug therapies or even a prodrug strategy [67].

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules28114263/s1>, Figure S1: Chromatograms acquired by UHPLC-UV-MS, at $\lambda = 254$ nm, of the different pre-purified fractions (F1 → F12) from the ethyl acetate sub-extract of *J. acutus* stems and of reference standards luteolin, luteolin-7-O-glucoside and juncusol (at $\lambda = 280$ nm).

Author Contributions: Conceptualization, L.D., R.S., G.L., S.B., K.S. and C.R.; Formal analysis, A.H., L.D., R.B.M., C.C., J.S., S.M., S.B., K.S. and C.R.; Funding acquisition, R.S., R.K., K.S. and C.R.; Investigation, A.H., L.D., R.B.M., C.C., N.F., G.L., J.S., S.M., S.B., K.S. and C.R.; Methodology, A.H., L.D., S.B., K.S. and C.R.; Project administration, S.S., R.K. and C.R.; Supervision, R.K. and C.R.; Validation, K.S. and C.R.; Writing—original draft, A.H., K.S. and C.R.; Writing—review & editing, L.D., K.S. and C.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research and the PhD of A.H. were supported by the PHC Utique 2020–2022 Program (Campus France code: 44197ZG & Comité Mixte franco-tunisien pour la coopération universitaire “CMCU” code: 20G0822), which is a French-Tunisian partnership, the MOBILEX grant provided by the University of Lille and the scholarships (Bourse alternance, 2020–2021 Edition code 2020-BALT-806 & 2021–2022 Edition code 2021-BALT-114, University of Carthage) provided by the Tunisian Ministry of Higher Education and Scientific Research.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: Authors are grateful to Nathalie Azaroual and the engineers Vincent Ultré and Alexandre Rech for their help to accessing NMR equipment (LARM, University of Lille, France).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Luteolin and luteolin-7-O-glucoside were purified from stems of *Juncus acutus* L. (JA2 SCE), whereas juncusol was purified from rhizomes of *Juncus inflexus* L. (J13 RCE). The three compounds were identified by NMR. Reference molecules and *Juncus* extracts are available at the Laboratory of Pharmacognosy (Joint Research Unit 1158, BioEcoAgro, Univ. Lille). Some reference samples such as luteolin (Sarsyntex) and luteolin-7-O-glucoside (Sarget) are also available.

Abbreviations

CH₂Cl₂: Methylene chloride; CICE, Closed inflorescence crude extract; COVID-19, Coronavirus disease; CPC, Centrifugal Partition Chromatography; CYP, Cytochrome; DMSO, Dimethylsulfoxide; EtOAc, Ethyl acetate; H1N1, Influenza A virus subtype H1N1; H2N2, Influenza A virus subtype H2N2; H3N2, Influenza A virus subtype H3N2; HCoV-229E, Human coronavirus 229E; HPLC, High-Performance Liquid Chromatography; Huh-77, Human hepatoma cell lines; MeOH, Methanol; MERS-CoV, Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus; NS5A, Non-structural protein 5A; OICE, Open inflorescences crude extract; RNA, Ribonucleic acid; RCE, Rhizome crude extract; SARS-CoV, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus; SARS-CoV-2, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2; SCE, Stem crude extract; TMPRSS2, Transmembrane protease serine 2; UHPLC-UV-MS, Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet-Mass Spectrometry.

References

1. Sa, T.; Syed, N. The Future of Humanity and Microbes: Impact of Emerging Infectious Diseases on Global Health and Economies. *IJSR* **2013**, *4*, 2427–2442.
2. Masters, P.S.; Perlman, S. Coronaviridae. *Fields Virol.* **2013**, *1*, 825–858.
3. WHO. *Report of the Twenty-First Meeting of Ministers of Health of Countries of the South-East Asia Region, New Delhi, India, 8–9 September 2003*; WHO Regional Office for South-East Asia: New Delhi, India, 2003.
4. Zaki, A.M.; van Boheemen, S.; Bestebroer, T.M.; Osterhaus, A.D.M.E.; Fouchier, R.A.M. Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *367*, 1814–1820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Petersen, E.; Koopmans, M.; Go, U.; Hamer, D.H.; Petrosillo, N.; Castelli, F.; Storgaard, M.; Al Khalili, S.; Simonsen, L. Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and Influenza Pandemics. *Lancet Infect. Dis.* **2020**, *20*, e238–e244. [[CrossRef](#)]
6. WHO. *WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard 2023*. Available online: <https://covid19.who.int/> (accessed on 21 May 2023).
7. Hamre, D.; Procknow, J.J. A New Virus Isolated from the Human Respiratory Tract. *Exp. Biol. Med.* **1966**, *121*, 190–193. [[CrossRef](#)]

8. Farsani, S.M.J.; Dijkman, R.; Jebbink, M.F.; Goossens, H.; Ieven, M.; Deijis, M.; Molenkamp, R.; van der Hoek, L. The First Complete Genome Sequences of Clinical Isolates of Human Coronavirus 229E. *Virus Genes* **2012**, *45*, 433–439. [\[CrossRef\]](#)
9. Corman, V.M.; Eckerle, I.; Memish, Z.A.; Liljander, A.M.; Dijkman, R.; Jonsdottir, H.; Juma Ngeiywa, K.J.Z.; Kamau, E.; Younan, M.; Al Masri, M.; et al. Link of a Ubiquitous Human Coronavirus to Dromedary Camels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 9864–9869. [\[CrossRef\]](#)
10. Sabir, J.S.M.; Lam, T.T.-Y.; Ahmed, M.M.M.; Li, L.; Shen, Y.; Abo-Aba, S.E.M.; Qureshi, M.I.; Abu-Zeid, M.; Zhang, Y.; Khayami, M.A.; et al. Co-Circulation of Three Camel Coronavirus Species and Recombination of MERS-CoVs in Saudi Arabia. *Science* **2016**, *351*, 81–84. [\[CrossRef\]](#)
11. Su, S.; Wong, G.; Shi, W.; Liu, J.; Lai, A.C.K.; Zhou, J.; Liu, W.; Bi, Y.; Gao, G.F. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol.* **2016**, *24*, 490–502. [\[CrossRef\]](#)
12. Lee, J.-H.; Jung, Y.; Lee, S.-K.; Kim, J.; Lee, C.-S.; Kim, S.; Lee, J.-S.; Kim, N.-H.; Kim, H.-G. Rapid Biosensor of SARS-CoV-2 Using Specific Monoclonal Antibodies Recognizing Conserved Nucleocapsid Protein Epitopes. *Viruses* **2022**, *14*, 255. [\[CrossRef\]](#)
13. Wang, Z.; Wang, N.; Yang, L.; Song, X. Bioactive Natural Products in COVID-19 Therapy. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 926507. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Pokhrel, R.; Chapagain, P.; Siltberg-Liberles, J. Potential RNA-Dependent RNA Polymerase Inhibitors as Prospective Therapeutics against SARS-CoV-2. *J. Med. Microbiol.* **2020**, *69*, 864–873. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Aldea, M.; Michot, J.-M.; Danlos, F.-X.; Ribas, A.; Soria, J.-C. Repurposing of Anticancer Drugs Expands Possibilities for Antiviral and Anti-Inflammatory Discovery in COVID-19. *Cancer Discov.* **2021**, *11*, 1336–1344. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Wang, Z.; Yang, L. Broad-spectrum Prodrugs with Anti-SARS-CoV-2 Activities: Strategies, Benefits, and Challenges. *J. Med. Virol.* **2022**, *94*, 1373–1390. [\[CrossRef\]](#)
17. Deb, P.; Molla, M.M.A.; Saif-Ur-Rahman, K.M. An Update to Monoclonal Antibody as Therapeutic Option against COVID-19. *Biosaf. Health* **2021**, *3*, 87–91. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Plichta, J.; Kuna, P.; Panek, M. Monoclonal Antibodies as Potential COVID-19 Therapeutic Agents. *COVID* **2022**, *2*, 599–620. [\[CrossRef\]](#)
19. Hammond, J.; Leister-Tebbe, H.; Gardner, A.; Abreu, P.; Bao, W.; Wisemandle, W.; Baniecki, M.; Hendrick, V.M.; Damle, B.; Simón-Campos, A.; et al. Oral Nirmatrelvir for High-Risk, Nonhospitalized Adults with COVID-19. *N. Engl. J. Med.* **2022**, *386*, 1397–1408. [\[CrossRef\]](#)
20. Kabinger, F.; Stiller, C.; Schmitzová, J.; Dienemann, C.; Kokic, G.; Hillen, H.S.; Höbartner, C.; Cramer, P. Mechanism of Molnupiravir-Induced SARS-CoV-2 Mutagenesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2021**, *28*, 740–746. [\[CrossRef\]](#)
21. WHO. Solidarity Trial Consortium Remdesivir and Three Other Drugs for Hospitalised Patients with COVID-19: Final Results of the WHO Solidarity Randomised Trial and Updated Meta-Analyses. *Lancet* **2022**, *399*, 1941–1953. [\[CrossRef\]](#)
22. Newman, D.J.; Cragg, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 770–803. [\[CrossRef\]](#)
23. Molyneux, R.J.; Lee, S.T.; Gardner, D.R.; Panter, K.E.; James, L.F. Phytochemicals: The Good, the Bad and the Ugly? *Phytochemistry* **2007**, *68*, 2973–2985. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Mani, J.S.; Johnson, J.B.; Steel, J.C.; Broszczak, D.A.; Neilsen, P.M.; Walsh, K.B.; Naiker, M. Natural Product-Derived Phytochemicals as Potential Agents against Coronaviruses: A Review. *Virus Res.* **2020**, *284*, 197989. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Elmorsy, M.A.; El-Baz, A.M.; Mohamed, N.H.; Almeer, R.; Abdel-Daim, M.M.; Yahya, G. In Silico Screening of Potent Inhibitors against COVID-19 Key Targets from a Library of FDA-Approved Drugs. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2022**, *29*, 12336–12346. [\[CrossRef\]](#)
26. Santos, J.; Al-Azzawi, M.; Aronson, J.; Flowers, T.J. eHALOPH a Database of Salt-Tolerant Plants: Helping put Halophytes to Work. *Plant Cell Physiol.* **2016**, *57*, e10. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Chapman, V.J. The New Perspective in the Halophytes. *Q. Rev. Biol.* **1942**, *17*, 291–311. [\[CrossRef\]](#)
28. Cheeseman, J.M. The Evolution of Halophytes, Glycophytes and Crops, and Its Implications for Food Security under Saline Conditions. *New Phytol.* **2015**, *206*, 557–570. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Merchaoui, H.; Ksouri, R.; Abdelly, C.; Hanana, M. Halophytes.Tn: An Innovative Database for Tunisian Halophyte Plant Identification, Distribution and Characterization. *Database* **2022**, *2022*, baab082. [\[CrossRef\]](#)
30. Sahli, R.; Rivière, C.; Neut, C.; Bero, J.; Sahuc, M.-E.; Smaoui, A.; Beaufay, C.; Roumy, V.; Hennebelle, T.; Rouillé, Y.; et al. An Ecological Approach to Discover New Bioactive Extracts and Products: The Case of Extremophile Plants. *J. Pharm. Pharmacol.* **2017**, *69*, 1041–1055. [\[CrossRef\]](#)
31. Sahuc, M.-E.; Sahli, R.; Rivière, C.; Pène, V.; Lavie, M.; Vandeputte, A.; Brodin, P.; Rosenberg, A.R.; Dubuisson, J.; Ksouri, R.; et al. Dehydrojuncusol, a Natural Phenanthrene Compound Extracted from *Juncus Maritimus*, Is a New Inhibitor of Hepatitis C Virus RNA Replication. *J. Virol.* **2019**, *93*, e02009-18. [\[CrossRef\]](#)
32. Matsuyama, S.; Nagata, N.; Shirato, K.; Kawase, M.; Takeda, M. Taguchi Efficient Activation of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein by the Transmembrane Protease TMPRSS2. *J. Virol.* **2010**, *84*, 12658–12664. [\[CrossRef\]](#)
33. Shulla, A.; Heald-Sargent, T.; Subramanya, G.; Zhao, J.; Perlman, S.; Gallagher, T. A Transmembrane Serine Protease Is Linked to the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Receptor and Activates Virus Entry. *J. Virol.* **2011**, *85*, 873–882. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

34. Koch, J.; Uckele, Z.M.; Doldan, P.; Stanifer, M.; Boulant, S.; Lozach, P.-Y. TMPRSS2 Expression Dictates the Entry Route Used by SARS-CoV-2 to Infect Host Cells. *EMBO J.* **2021**, *40*, e107821. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Meunier, T.; Desmarests, L.; Bordage, S.; Bamba, M.; Hervouet, K.; Rouillé, Y.; François, N.; Decossas, M.; Sencio, V.; Trottein, F.; et al. A Photoactivable Natural Product with Broad Antiviral Activity against Enveloped Viruses, Including Highly Pathogenic Coronaviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2022**, *66*, e01581-21. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. El-Shamy, A.I.; Abdel-Razek, A.F.; Nassar, M.I. Phytochemical Review of *Juncus* L. Genus (Fam. Juncaceae). *Arab. J. Chem.* **2015**, *8*, 614–623. [\[CrossRef\]](#)
37. Behery, F.A.A.; Naeem, Z.-E.M.; Maatooq, G.T.; Amer, M.M.A.; Ahmed, A.F. A Novel Antioxidant Phenanthrenoid Dimer from *Juncus acutus* L. *Nat. Prod. Res.* **2013**, *27*, 155–163. [\[CrossRef\]](#)
38. Moustafa, S.; El-Alfy, T.; Hasan, N.; Abou El-Seoud, K. Inhibitory Effect of Flavonoids Isolated from Some *Juncus* Species (Flowers & Callus) on Blood Platelets Aggregation. *Bull. Pharm. Sci. Assiut* **2002**, *25*, 43–52. [\[CrossRef\]](#)
39. Bús, C.; Tóth, B.; Stefkó, D.; Hohmann, J.; Vasas, A. Family Juncaceae: Promising Source of Biologically Active Natural Phenanthrenes. *Phytochem. Rev.* **2018**, *17*, 833–851. [\[CrossRef\]](#)
40. Kovács, A.; Vasas, A.; Hohmann, J. Natural Phenanthrenes and Their Biological Activity. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 1084–1110. [\[CrossRef\]](#)
41. Murgolo, N.; Therien, A.G.; Howell, B.; Klein, D.; Koeplinger, K.; Lieberman, L.A.; Adam, G.C.; Flynn, J.; McKenna, P.; Swaminathan, G.; et al. SARS-CoV-2 Tropism, Entry, Replication, and Propagation: Considerations for Drug Discovery and Development. *PLoS Pathog.* **2021**, *17*, e1009225. [\[CrossRef\]](#)
42. Chassagne, F.; Samarakoon, T.; Porras, G.; Lyles, J.T.; Dettweiler, M.; Marquez, L.; Salam, A.M.; Shabih, S.; Farrokhi, D.R.; Quave, C.L. A Systematic Review of Plants with Antibacterial Activities: A Taxonomic and Phylogenetic Perspective. *Front. Pharmacol.* **2021**, *11*, 586548. [\[CrossRef\]](#)
43. Vassilara, F.; Spyridaki, A.; Pothitos, G.; Deliveliotou, A.; Papadopoulos, A. A Rare Case of Human Coronavirus 229E Associated with Acute Respiratory Distress Syndrome in a Healthy Adult. *Case Rep. Infect. Dis.* **2018**, *2018*, 6796839. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Ishiuchi, K.; Kosuge, Y.; Hamagami, H.; Ozaki, M.; Ishige, K.; Ito, Y.; Kitanaka, S. Chemical Constituents Isolated from *Juncus effusus* Induce Cytotoxicity in HT22 Cells. *J. Nat. Med.* **2015**, *69*, 421–426. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Williams, C.A.; Harborne, J.B. Luteolin and Daphnetin Derivatives in the Juncaceae and Their Systematic Significance. *Biochem. Syst. Ecol.* **1975**, *3*, 181–190. [\[CrossRef\]](#)
46. Lin, Y.; Shi, R.; Wang, X.; Shen, H.-M. Luteolin, a Flavonoid with Potential for Cancer Prevention and Therapy. *Curr. Cancer Drug Targets* **2008**, *8*, 634–646. [\[CrossRef\]](#)
47. López-Lázaro, M. Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin. *Mini Rev. Med. Chem.* **2009**, *9*, 31–59. [\[CrossRef\]](#)
48. Wang, S.; Ling, Y.; Yao, Y.; Zheng, G.; Chen, W. Luteolin Inhibits Respiratory Syncytial Virus Replication by Regulating the MiR-155/SOCS1/STAT1 Signaling Pathway. *Virol. J.* **2020**, *17*, 187. [\[CrossRef\]](#)
49. Yan, H.; Ma, L.; Wang, H.; Wu, S.; Huang, H.; Gu, Z.; Jiang, J.; Li, Y. Luteolin Decreases the Yield of Influenza A Virus in Vitro by Interfering with the Coat Protein I Complex Expression. *J. Nat. Med.* **2019**, *73*, 487–496. [\[CrossRef\]](#)
50. Yi, L.; Li, Z.; Yuan, K.; Qu, X.; Chen, J.; Wang, G.; Zhang, H.; Luo, H.; Zhu, L.; Jiang, P.; et al. Small Molecules Blocking the Entry of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus into Host Cells. *J. Virol.* **2004**, *78*, 11334–11339. [\[CrossRef\]](#)
51. Manvar, D.; Mishra, M.; Kumar, S.; Pandey, V.N. Identification and Evaluation of Anti Hepatitis C Virus Phytochemicals from *Eclipta alba*. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *144*, 545–554. [\[CrossRef\]](#)
52. Bai, L.; Nong, Y.; Shi, Y.; Liu, M.; Yan, L.; Shang, J.; Huang, F.; Lin, Y.; Tang, H. Luteolin Inhibits Hepatitis B Virus Replication through Extracellular Signal-Regulated Kinase-Mediated Down-Regulation of Hepatocyte Nuclear Factor 4 α Expression. *Mol. Pharm.* **2016**, *13*, 568–577. [\[CrossRef\]](#)
53. Fan, W.; Qian, S.; Qian, P.; Li, X. Antiviral Activity of Luteolin against Japanese Encephalitis Virus. *Virus Res.* **2016**, *220*, 112–116. [\[CrossRef\]](#)
54. Mehla, R.; Bivalkar-Mehla, S.; Chauhan, A. A Flavonoid, Luteolin, Cripples HIV-1 by Abrogation of Tat Function. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e27915. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Xu, L.; Su, W.; Jin, J.; Chen, J.; Li, X.; Zhang, X.; Sun, M.; Sun, S.; Fan, P.; An, D.; et al. Identification of Luteolin as Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16 Inhibitors through Reporter Viruses and Cell Viability-Based Screening. *Viruses* **2014**, *6*, 2778–2795. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Alvarado, W.; Perez-Lemus, G.R.; Menéndez, C.A.; Byléhn, F.; De Pablo, J.J. Molecular Characterization of COVID-19 Therapeutics: Luteolin as an Allosteric Modulator of the Spike Protein of SARS-CoV-2. *Mol. Syst. Des. Eng.* **2022**, *7*, 58–66. [\[CrossRef\]](#)
57. Shawan, M.M.A.K.; Halder, S.K.; Hasan, M.d.A. Luteolin and Abyssinone II as Potential Inhibitors of SARS-CoV-2: An in Silico Molecular Modeling Approach in Battling the COVID-19 Outbreak. *Bull. Natl. Res. Cent.* **2021**, *45*, 27. [\[CrossRef\]](#)
58. Munafò, F.; Donati, E.; Brindani, N.; Ottonello, G.; Armirotti, A.; De Vivo, M. Quercetin and Luteolin Are Single-Digit Micromolar Inhibitors of the SARS-CoV-2 RNA-Dependent RNA Polymerase. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 10571. [\[CrossRef\]](#)
59. Sacan, A.; Ekins, S.; Kortagere, S. Applications and Limitations of In Silico Models in Drug Discovery. In *Bioinformatics and Drug Discovery*; Larson, R.S., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2012; Volume 910, pp. 87–124, ISBN 978-1-61779-964-8.
60. Yasuda, M.T.; Fujita, K.; Hosoya, T.; Imai, S.; Shimoi, K. Absorption and Metabolism of Luteolin and Its Glycosides from the Extract of *Chrysanthemum Morifolium* Flowers in Rats and Caco-2 Cells. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 7693–7699. [\[CrossRef\]](#)

61. Ali, F.; Siddique, Y.H. Bioavailability and Pharmacotherapeutic Potential of Luteolin in Overcoming Alzheimer's Disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **2019**, *18*, 352–365. [[CrossRef](#)]
62. Joel Mjiqiza, S.; Abraham Syce, J.; Chibuzo Obikeze, K. Pulmonary Effects and Disposition of Luteolin and *Artemisia Afra* Extracts in Isolated Perfused Lungs. *J. Ethnopharmacol.* **2013**, *149*, 648–655. [[CrossRef](#)]
63. D'Ascanio, L.; Vitelli, F.; Cingolani, C.; Maranzano, M.; Brenner, M.J.; Di Stadio, A. Randomized Clinical Trial "Olfactory Dysfunction after COVID-19: Olfactory Rehabilitation Therapy vs. Intervention Treatment with Palmitoylethanolamide and Luteolin": Preliminary Results. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2021**, *25*, 4156–4162. [[CrossRef](#)]
64. Aziz, N.; Kim, M.-Y.; Cho, J.Y. Anti-Inflammatory Effects of Luteolin: A Review of in Vitro, in Vivo, and in Silico Studies. *J. Ethnopharmacol.* **2018**, *225*, 342–358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. van den Worm, S.H.E.; Eriksson, K.K.; Zevenhoven, J.C.; Weber, F.; Züst, R.; Kuri, T.; Dijkman, R.; Chang, G.; Siddell, S.G.; Snijder, E.J.; et al. Reverse Genetics of SARS-Related Coronavirus Using Vaccinia Virus-Based Recombination. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32857. [[CrossRef](#)]
66. Desmarests, L.; Callens, N.; Hoffmann, E.; Danneels, A.; Lavie, M.; Couturier, C.; Dubuisson, J.; Belouzard, S.; Rouillé, Y. A Reporter Cell Line for the Automated Quantification of SARS-CoV-2 Infection in Living Cells. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 1031204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Yang, L.; Wang, Z. Natural Products, Alone or in Combination with FDA-Approved Drugs, to Treat COVID-19 and Lung Cancer. *Biomedicines* **2021**, *9*, 689. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

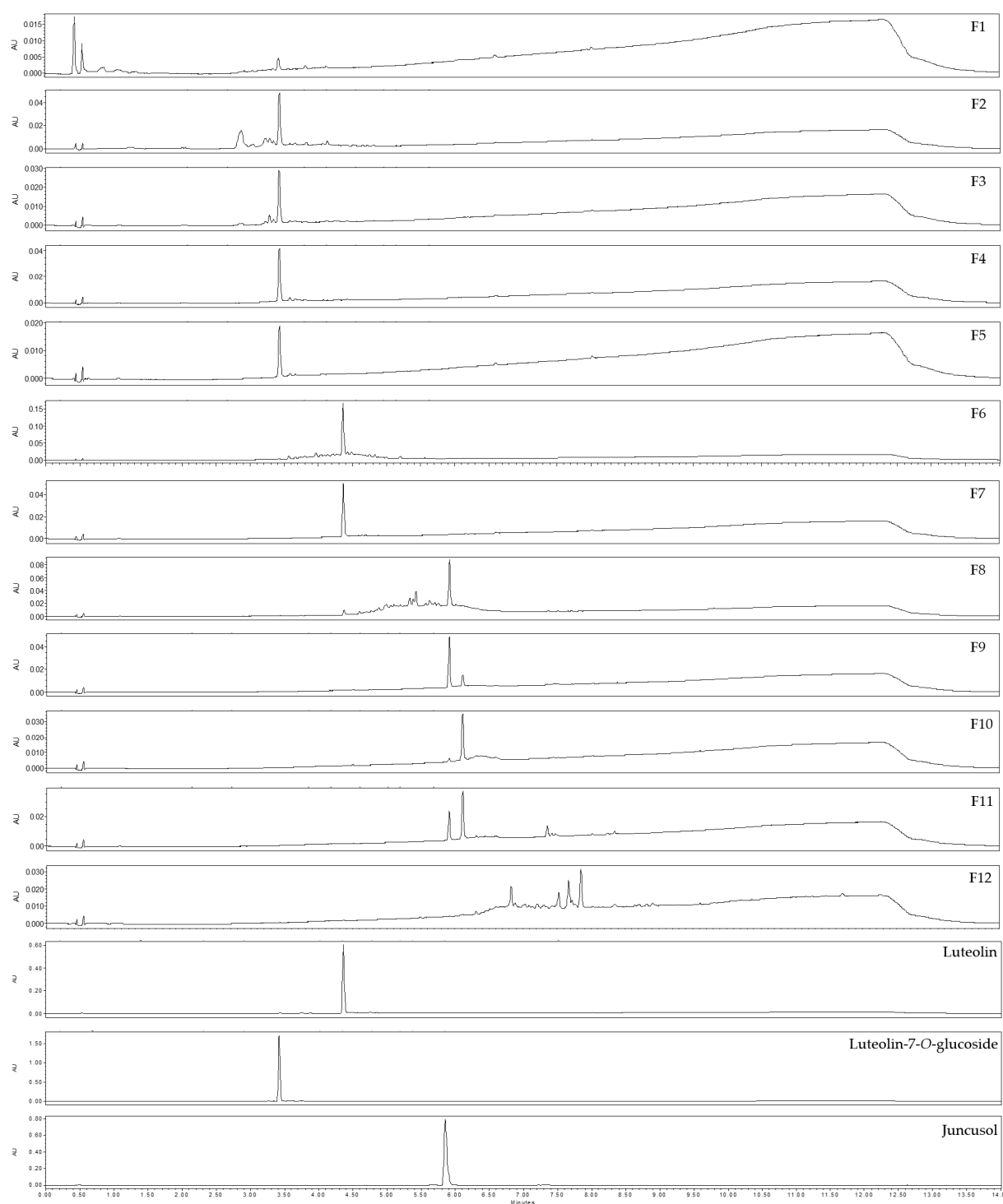


Figure S1. Chromatograms acquired by UHPLC-UV-MS at $\lambda = 254$ nm of the different pre-purified fractions (F1→F12) from the ethyl acetate sub-extract of *J. acutus* stems (JA2) and of reference standards, luteolin, luteolin-7-O-glucoside and juncusol (at $\lambda = 280$ nm)