UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE
Mention : **« Sciences de la Vie et de la Santé »**

par **Stéphane FONTANAY**

Complexation de triterpènes pentacycliques par des cyclodextrines

Caractérisation physicochimique et activités biologiques.

20 décembre 2012

Jury :

Rapporteurs :	M. Jean-François GOOSSENS	PR	EA 4481, Université Lille Nord de France	Lille
	M. Alain SIMON	MCF-HDR	EA 1069, Université de Limoges	Limoges
Examinateurs :	Mme. Francine KEDZIEREWICZ	MCF-HDR	UMR 7565, Université de Lorraine - CNRS Directeur de thèse	Nancy
	M. Raphaël E. DUVAL	PR	UMR 7565, Université de Lorraine - CNRS Co-encadrant de thèse	Nancy
Membre invité :	M. Igor CLAROT	MCF	UMR 7565, Université de Lorraine - CNRS	Nancy

UMR 7565, SRSMC, Université de Lorraine - CNRS, Faculté de Sciences et Techniques B.P. 70239, 54506, Vandoeuvre les Nancy Cedex, France

La perfection est un chemin, non une fin.

Proverbe coréen

Savoir que l'on sait ce que l'on sait,
et savoir que l'on ne sait pas ce que l'on ne sait pas :
voilà la véritable science.

Confucius

La sagesse est fille de l'expérience.

Léonard de Vinci

Remerciements

A Monsieur le Professeur Jean-François Goossens,
Pour me faire l'honneur de relire et de juger ce travail, je vous assure de ma plus sincère gratitude.

A Monsieur le Docteur Alain Simon,
Pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail, je vous adresse mes plus vifs remerciements.

A Madame le Docteur Francine Kedzierewicz,
Vous avez accepté de diriger ce travail, nous vous remercions de votre compétence, de votre soutien bienveillant et de votre persévérance. Vous nous avez été d'une aide précieuse dans la poursuite de nos rêves. Soyez en infiniment remerciée.

A Monsieur le Professeur Raphaël Emmanuel Duval,
Vous avez accepté de codiriger ce travail avec douceur, délicatesse, diplomatie, patience, pédagogie. Pour ça et pour tout le reste je vous remercie infiniment.

A Monsieur le Docteur Igor Clarot,
Vous avez suivi notre travail de physico-chimiste apprenti avec bonne humeur et entrain, soyez en toujours remercié.

A Madame le Professeur Finance,
Vous avez accepté l'idée que je puisse devenir doctorant dans votre équipe. Merci pour cette marque de confiance et ce soutien. Recevez toute ma gratitude.

Merci aussi aux membres de notre petite Communauté scientifique : Catherine, Mihayl, Eric, Marion, Anne-Charlotte, Maxime, Chloé, Hugues, Barbara.

Merci aussi à nos Stagiaires et plus particulièrement à : Amandine, Joséphine, Camille, Amélie, Charlène, Pauline, Christelle, Letitcia, Marielle, Magali et Luc.

Merci à ma Famille : Colette & Jean-Claude, Anne-Claire & Pierre.

Merci à mes Amis,
De Saint Etienne : Jérémie, Manu, Pierrot, François, Clothilde, Betty, Jérôme, Karine, Lionel, Steve, Anne-Paul, Laurent, Carole, Johanny, Olivier, Henri, Séverine.

De Lyon : Elodie, Anthony, Mathieu, Fabrice.

De Nancy : Aude, Mathilde, Marie-Eve, Emeline, Julie, Olympe, Anne, Valérie, Guillaume, Marie-Jo, Julien, Mathieu, Véronique, Pierre-Emmanuel, Ludovic, David, Maxime, Rémi, Jean-Michel, Sayed, Philippe, Michel, Raphaël, Jean-Louis, Jacques, Loïc, Jean-Mickaël.

De la XI^{ème}.

À ceux que j'oublie…

A vous tous, quel que fut la nature de votre aide, elle a contribué, par votre expertise du travail de laboratoire, votre contribution scientifique, votre soutien morale ou affectif à la réalisation de ce travail. Vous saviez tous à quel point cette étape me tenait à cœur soyez tous remerciés de votre implication sans faille. Je tiens aussi à remercier ici tous ceux qui m'ont soutenu et encouragé directement ou non, dans le passé ou le présent à me lancer dans cette aventure. Aujourd'hui je suis Achab !

A 금주

A Noélie

A Anaïs & Joannés

A Berthe & Gilbert

A Henri Decourt

A Jean-Louis Morvant

Table des matières

Remerciements ... ii
Table des matières ... v
Index des illustrations ... ix
Index des tableaux ... xi
Index des équations ... xv
Abréviations ... xvii
Introduction ... 2
Généralités ... 6
1 Les triterpènes ... 8
1.1 Définition et nomenclature ... 8
1.2 Voies de biosynthèse du diphosphonate d'isopenténylе ... 10
1.2.1 Voie du mévalonate ... 11
1.2.2 Voie du méthylérythritol phosphate ... 11
1.2.3 Formation des homologues supérieurs : prényl-transférases et terpènes synthases ... 12
1.3 Structure des terpènes ... 14
1.3.1 Règles et structures de base ... 16
1.3.2 Règles de numérotation ... 16
1.3.3 Saponines et sapogénines ... 17
1.3.4 Les acides hydroxy pentacycliques triterpénoiques ... 17
1.4 Propriétés physico-chimiques des acides hydroxy pentacycliques triterpénoiques ... 18
1.4.1 L'acide ursolique ... 19
1.4.2 L'acide oléanolique ... 20
1.4.3 L'acide bétulinique ... 21
1.5 Des intérêts écologiques aux intérêts en thérapeutique ... 22
1.5.1 Rôle physiologique chez les végétaux et applications en parapharmacie 22
1.5.2 Applications en santé humaine ... 24
2 Les méthodes d'hydro-solubilisation des acides hydroxy pentacycliques triterpénoiques ... 27
2.1 Modifications chimiques ... 27
2.2 Co-solvatation ... 28
2.3 Vectorisation ... 29
3 Les cyclodextrines ... 31
3.1 Définition, structure et nomenclature ... 31
3.2 Propriétés physico-chimiques des cyclodextrines ... 33
3.2.1 Cyclodextrines naturelles ... 33

3.2.2 Cyclodextrines modifiées 33
3.3 Toxicité des cyclodextrines 36
3.3.1 Toxicité cellulaire 36
3.3.2 Toxicité orale 37
3.3.3 Toxicité par voie parentérale 39
3.4 Les complexes de CDs 40
3.5 Applications de la complexation en thérapeutiques 42
3.5.1 Voie orale 43
3.5.2 Voie parentérale 43
3.5.3 Voie nasale 44
3.5.4 Voies locales 44
3.5.5 Spécialités pharmaceutiques contenant des cyclodextrines 44
3.6 Autres utilisations des cyclodextrines 48
3.6.1 Utilisation en agroalimentaire 48
3.6.2 Utilisation en chimie analytique 49
3.6.3 Utilisation pour la dépollution des sols 49
3.6.4 Utilisation diverses 49
3.7 Les complexes cyclodextriniques 50
3.7.1 Préparation des complexes 50
3.7.2 Caractérisation des complexes 51
4 Méthode d'évaluation des propriétés biologiques des complexes 54
4.1 L'antibactérien 54
4.2 La notion de cytotoxicité 55
4.3 L'antiviral 57
4.4 L'antifongique 60
4.5 L'anticancéreux 62
Matériel et méthodes 64
1 Etudes biologiques 66
1.1 Matériel biologique 66
1.1.1 Souches bactériennes 66
1.1.2 Souches virales 69
1.1.3 Souches fongiques 70
1.1.4 Cellules animales 71
1.2 Evaluation de l'activité antibactérienne 74
1.2.1 Matériel et réactifs 74
1.2.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice 74
1.3 Evaluation de la cytotoxicité 79
1.3.1 Matériel et réactifs 79

1.3.2 Méthode d'évaluation de la cytotoxicité ... 80
1.4 Evaluation de l'activité antivirale ... 86
1.4.1 Matériel et réactifs ... 86
1.4.2 Détermination de l'activité antivirale ... 86
1.5 Expérimentation antifongique ... 94
1.5.1 Matériel et réactifs ... 94
1.5.2 Détermination de la concentration minimum inhibitrice ... 94
1.6 Expérimentation anticancéreuse ... 98
1.6.1 Matériel et réactifs ... 99
1.6.2 Etudes d'efficacité ... 99
2 Etudes physico-chimiques ... 100
2.1 Caractérisation de la complexation des acides hydroxy pentacycliques triterpénoiques par chromatographie liquide haute performance ... 100
2.1.1 Matériel et réactifs ... 100
2.1.2 Méthodes ... 101
2.2 Préparation des complexes et des mélanges témoins acides hydroxy pentacycliques triterpénoiques / gamma-cyclodextrine ... 107
2.2.1 Préparation des complexes en milieu liquide ... 108
2.2.2 Préparation des mélanges témoins secs d'acides hydroxy pentacycliques triterpénoiques / gamma cyclodextrine ... 109
2.3 Caractérisation des complexes acides hydroxy pentacycliques triterpénoiques – gamma-cyclodextrine par calorimétrie différentielle à balayage et résonance magnétique nucléaire ... 110
2.3.1 Analyse calorimétrique différentielle (ACD) ... 110
2.3.2 Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ... 110
Résultats - Discussion ... 112
1 Activités biologiques des AHPTs ... 114
1.1 Activité anti-bactérienne ... 114
1.1.1 Comment tester des molécules hydrophobes avec une méthode de microdilution conventionnelle ? ... 114
1.1.2 Une réelle activité antibactérienne des AHPTs ... 115
1.2 Cytotoxicité ... 118
1.3 Une toxicité en faveur de l'utilisation des AHPTs contre les bactéries ... 120
1.4 Activité antifongique ... 122
1.4.1 Activité antifongique : méthodologie ... 122
1.4.2 Activité antifongique : application ... 132
1.5 Activité antivirale ... 133
1.5.1 Activité antivirale: méthodologie ... 135
1.5.2 Activité antivirale : application ... 142
1.5.3 Discussion à propos de la norme AFNOR NF EN 14476+A1 ... 144

1.6 Activité anticancéreuse 146
1.6.1 Efficacité sur les lignées cellulaires cancéreuses 146
1.6.2 Le rapport à la cytotoxicité sur MRC5 147
2 Etude physicochimique de la complexation et des complexes acides hydroxy pentacycliques triterpénoiques – gamma-cyclodextrine 150
2.1 Chromatographie liquide haute performance 150
2.1.1 Choix des conditions opératoires 150
2.1.2 Choix de la cyclodextrine 151
2.1.3 Caractérisation de la complexation des acides hydroxy pentacycliques triterpénoiques avec la gamma-cyclodextrine 153
2.1.4 Détermination de la solubilité des complexes acides hydroxy pentacycliques triterpénoiques – gamma-cyclodextrine selon Higuchi et Connors159
2.2 Préparation des complexes 160
2.3 Caractérisation des complexes acides hydroxy pentacycliques triterpénoiques – gamma-cyclodextrine 161
2.3.1 Analyse calorimétrique différentielle (ACD) 161
2.3.2 Résonance magnétique nucléaire (RMN) 163
3 Activités biologiques des complexes et de la gamma-cyclodextrine 167
3.1 Activité anti-bactérienne 167
3.2 Cytotoxicité 169
3.3 Activité antivirale 171
3.4 Activité anticancéreuse des complexes 172
3.4.1 Efficacité sur des lignées cellulaires cancéreuses 172
3.4.2 Cytotoxicité sur les cellules MRC5 174
Conclusion-Perspectives 178
Références bibliographiques 190
Annexes 224
Article 1 : Ursolic, oleanolic and betulinic acids : Antibacterial spectra and selectivity indexes 226
Article 2 : Physicochemical and thermodynamic characterisation of hydroxypentacyclic triterpenoic acid/γ-cyclodextrin inclusion complexes 246
Poster 1 : RICAI 2006 – L'acide ursolique : spectre d'activité antibactérienne d'une molécule d'origine végétale 256
Poster 2 : TERPNET 2007 - Ursolic, oleanolic and betulinic acids : Antibacterial spectra of natural pentacyclic triterpenoic acids 260
Poster 3 : 12°Journée du club français des cyclodextrines – Evaluation de la complexation triterpènes pentacycliques – γ-cyclodextrine par chromatographie liquide haute performance 280
Résumé 287
Summary 287

Index des illustrations

Figure 1 : De l'isoprène aux terpènes (Rohmer et Vandecasteele, 2007) 9
Figure 2 : Structure plane de l'IPP 10
Figure 3 : Structure plane du DMAPP 10
Figure 4 : Structure plane de l'acide mévalonique 11
Figure 5 : Structure plane du méthylérythritol phosphate 12
Figure 6 : Description schématique de l'activité d'un triterpène cyclase (Wendt *et al.*, 1997) 14
Figure 7 : Structures planes des squelettes carbonés de triterpènes pentacycliques, règles de numérotation des carbones et dénomination des cycles des triterpènes pentacycliques d'après la section F des recommandations de nomenclature de l'IUPAC (Giles, 1999) 15
Figure 8 : Exemple de structure d'une sapogénine avec un aglycone de type oléanane . 17
Figure 9 : Structure plane de l'acide ursolique 20
Figure 10 : Structure plane de l'acide oléanolique 21
Figure 11 : Structure de l'acide bétulinique 22
Figure 12 : Principe des prodrogues à transporteur 28
Figure 13 : Structure plane des trois principales cyclodextrines natives (Szejtli, 1988) 31
Figure 14 : Règle de numérotation des carbones sur une cyclodextrine (ici α-CD) 32
Figure 15 : différentes formes possibles de position de fonctionnalisation des cyclodextrines (Parrot-Lopez *et al.*, 2010) 35
Figure 16 : Schématisation de l'équilibre de complexation (Palem *et al.*, 2009) 41
Figure 17 : Schématisation des différents types de complexe d'inclusion pouvant exister avec des CD d'après Bakkour (Bakkour, 2005) 42
Figure 18 : Schéma de micro plaque pour la réalisation des CMI 77
Figure 19 : Schéma de plaque pour la réalisation du test de viabilité et/ou de toxicité cellulaire 82
Figure 20 : Schéma du mode opératoire pour la détermination du titre viral selon la méthode de Reed & Muench (Reed et Muench, 1938) 90
Figure 21 : Schéma du mode opératoire pour la détermination de l'activité antivirale du produit à tester. 93
Figure 22 : Mode opératoire schématique de la formation en phase aqueuse des complexes en fonction de la concentration en γ-CD 106
Figure 23 : Les différents types de complexe possibles (Higuchi et Connors, 1965) .. 107

Figure 24 : Mode opératoire schématique de la fabrication des complexes en milieu liquide 109
Figure 25 : Schéma des enveloppes bactériennes (Bosgiraud, 2003) 118
Figure 26 : Evolution des CI_{50} des AHPTs envers les K562 146
Figure 27 : Evolution des CI_{50} des AHPTs envers les MRC5. 148
Figure 28 : Influence de l'addition de γ-CD à différentes concentrations dans la phase mobile sur le temps de rétention de l'AU à 25°C. 154
Figure 29 : Diagramme de phase du système AHPTs/γ-CD 159
Figure 30 : Courbes de ACD des acides bétulinique (A), oléanolique (B) et ursolique (C): (a) acide seul, (b) γ-CD, (c) mélange physique (1:1) and (d) complexe 162
Figure 31 : Spectre ^{1}H-RMN de la γ-CD en D_2O à 400MHz entre 4 et 3,80 ppm (D_2O calibré à 4,79ppm). 164
Figure 32 : Spectre ^{1}H-RMN du complexe AU : γ-CD en D_2O à 400MHz entre 4 et 3,80 ppm (D_2O calibré à 4,79ppm). 164
Figure 33 : Valeurs des CI_{50} obtenues avec les complexes d'AHPTs et les AHPTs seuls lors des tests MTT sur K562 à 6, 12, 18, 24 et 48 heures – n=3 173
Figure 34 : Valeurs des CI_{50} obtenues avec les complexes d'AHPTs et les AHPTs seuls lors des tests MTT sur MRC5 à 6, 12, 18, 24 et 48 heures – n=3 174

Index des tableaux

Tableau I : Propriétés physicochimiques et monographies à la pharmacopée des cyclodextrines entrant dans la composition de produits pharmaceutiques commercialisés. 32
Tableau II : Liste des spécialités pharmaceutiques contenant des CD et commercialisées en France. 45
Tableau III : Exemples de spécialités pharmaceutiques contenant des CD et commercialisées à l'étranger (Chinna Reddy *et al.*, 2012). 47
Tableau IV : Différences entre IN virales et IN bactériennes et fongiques. 57
Tableau V : Souches bactériennes de référence utilisées. 66
Tableau VI : Souches bactériennes résistantes aux antibiotiques utilisés dans cette étude. 69
Tableau VII : Matériel utilisé pour les expérimentations bactériennes. 74
Tableau VIII : Réactifs utilisés pour les expérimentations bactériennes. 74
Tableau IX : Matériel spécifique pour la culture de cellules eucaryotes de vertébrés. .. 79
Tableau X : Réactifs spécifiques pour la culture de cellules eucaryotes animales. 79
Tableau XI : Matériel spécifique à la culture de champignons. 94
Tableau XII : Réactifs spécifique à la culture de champignons. 94
Tableau XIII : Matériel utilisé pour la caractérisation de la complexation des AHPTs. 100
Tableau XIV : Réactifs utilisés pour la caractérisation de la complexation des AHPTs. 101
Tableau XV : Matériel nécessaire aux expérimentations en ACD. 110
Tableau XVI : Matériel nécessaire aux études par RMN. 110
Tableau XVII : Valeurs de CMI (µg/mL) obtenues sur des souches de référence. 116
Tableau XVIII : Valeurs de CMI (µg/mL) obtenues sur des souches résistantes. 117
Tableau XIX : Valeurs des CI_{50} & CC_{50} (µg/mL d'AHPTs ou équivalent AHPTs). ... 119
Tableau XX : Valeurs des index de sélectivité ($IS=CI_{50}/CMI$). 120
Tableau XXI : variation de la croissance de *C. albicans*. 123
Tableau XXII : variation de la croissance de *A. niger*. 125
Tableau XXIII : Valeurs des CMI obtenues sur *C. albicans* avec l'amphotéricine B. . 126
Tableau XXIV : Valeurs des CMI obtenues sur *A. niger* avec l'amphotéricine B. 127
Tableau XXV : variation de la croissance de *C.albicans* en fonction de la concentration en PBS. 128

Tableau XXVI : variation de la croissance de *A. niger* en fonction de la concentration en PBS. 129
Tableau XXVII : Valeurs des CMI obtenues sur *C. albicans* avec l'itraconazole. 130
Tableau XXVIII : Valeurs des CMI obtenues sur *A. niger* avec l'itraconazole. 130
Tableau XXIX : Titres viraux du poliovirus de type 1 Lsc-2ab obtenus selon diverses méthodes de production virale. 135
Tableau XXX : Evolution du titre viral du poliovirus en fonction du temps d'incubation. 137
Tableau XXXI : CI_{50} des molécules de référence obtenues par le test MTT sur cellules Vero. 139
Tableau XXXII : CI50 des molécules de référence obtenues par test MTT sur cellules MRC5. 140
Tableau XXXIII : Δ $DICC_{50}$ obtenus sur le poliovirus pour les molécules de référence. 141
Tableau XXXIV : Δ $DICC_{50}$ des virus testés avec les AHPTs libre & impact du DMSO. 143
Tableau XXXV : CI_{50} des AHPTs obtenues par tests MTT sur K562 doxoR. 146
Tableau XXXVI : CI_{50} des AHPTs par test MTT sur IgROV1. 147
Tableau XXXVII : IS des AHPTs sur K562 *vs*. MRC5. 148
Tableau XXXVIII : K_f (M^{-1}) des complexes AHPTs : CD, à 50°C. 152
Tableau XXXIX: k' des AHPTs dans une phase mobile contenant de 0 à 4 mM de γ-CD. 156
Tableau XL : Influence de la température d'expérimentation (de 25 à 45°C) sur K_f. .. 157
Tableau XLI : Caractérisation thermodynamique de la complexation AHPTs / γ-CD à 25°C. 158
Tableau XLII : masses d'AHPTs et de γ-CD mises en œuvre et rendements de fabrication. 161
Tableau XLIII : Déplacements des ^1H de la γ-CD en D_2O. 165
Tableau XLIV : Variations des déplacements chimiques des protons de la γ-CD complexée avec les AHPTs dans D_2O. 166
Tableau XLV : CMI (µg/mL AHPTs ou *équivalent* AHPTs) obtenues sur des souches ATCC. 167
Tableau XLVI : Valeurs des CI_{50} (µg/mL d'AHPTs ou *équivalent* AHPTs) obtenues par test MTT sur MRC5. 169

Tableau XLVII : IS des AHPTs et de leurs complexes (antibactériens) sur MRC5. ... 170
Tableau XLVIII : Δ $DICC_{50}$ (en log) sur le hCMV pour les AHPTs libre ou complexés à la γ-CD..... 171
Tableau XLIX : IS (anticancéreux) des AHPTs et de leurs complexes sur K562 *vs*. MRC5. 175

Index des équations

Équation 1 : calcul du pourcentage de viabilité cellulaire 84
Équation 2 : calcul du pourcentage de cytotoxicité 85
Équation 3 : formule permettant de déterminer l'Unité Formant Plage 91
Équation 4 : Définition du facteur de rétention en CLHP 102
Équation 5 : équilibre AHPT / CD 102
Équation 6 : relation entre k', k'_0 et K_f 103
Équation 7 : relation de Van't Hoff 104
Équation 8 : second principe de la thermodynamique 105

Abréviations

α-CD	Alpha cyclodextrine
β-CD	Bêta cyclodextrine
γ-CD	Gamma cyclodextrine
AB	Acide Bétulinique
ABC	ATP Binding Cassette
ACD	Analyse Calorimétrique Différentielle
AFNOR	Agence Française de NORmalisation
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AHPTs	Acide Hydroxy Pentacyclique Triterpénoiques
ANSES	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
AO	Acide Oléanolique
ATB	Antibiotique
ATCC	« American Type Culture Collection »
AU	Acide Ursolique
BLSE	Bêta Lactamase à Spectre Etendu
BMR	Bactéries Multi-Résistantes
CA-SFM	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CC_{50}	Concentration Cytotoxique 50%
CD	Cyclodextrine(s)
CI_{50}	Concentration Inhibitrice 50%
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CLSI	« Clinical and Laboratory Standards Institute »
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CO_2	dioxyde de carbone
CsSP	Commission spécialisée Sécurité Patients
CTIN	Comité Technique national des Infections Nosocomiales
CTINILS	Comité Technique national des Infections Nosocomiales et des Infections Liées aux Soins
D_2O	Oxyde de Deutérium
DJA	Dose Journaliére Admissible
DMAPP	Diphosphate de diméthylallyle

DMEM	« Dulbecco's Modified Eagle's Medium »
DMSO	DiMéthyl SulfOxyde
DSC	« Differential Scanning Calorimetry »
EBV	« Epstein Barr Virus »
EC	*Escherichia coli*
EDTA	Acide Ethylène-Diamine-TétraAcétique
EF	*Enterococcus faecalis*
EN	« European Norme »
FDA	« Food and Drug Administration » (USA)
FDA	« Food and Drug Agency » (UK)
GTRV	Groupe de Thématique de Recherche sur la Vectorisation
H_2O	eau
HBSS	« Hanks Balanced Salt Solution »
hCMV	CytoMégaloVirus humain
HP-β-CD	Hydroxy Propyl Bêta Cyclo Dextrine
HP-γ-CD	Hydroxy Propyl Gamma Cyclo Dextrine
HPLC	« High Pressure Liquid Chromatography »
HSV	Herpès Simplex Virus
IAS	Infection(s) Associée(s) aux Soins
ILS	Infection(s) Liée(s) aux Soins
IN	Infection(s) Nosocomiale(s)
IPP	Diphosphate d'isopentényle
ISO	« International Standardization Organization »
IUPAC	« International Union of Pure and Applied Chemistry »
k'	Facteur de rétention
K	Degrés Kelvin
Kf	Constante de formation
KP	*Klebsiella pneumoniae*
MβCD	Methyl Bêta Cyclo Dextrine
MEM	« Modified Eagle's Medium »
mecA	Gène de résistance à la méticilline
MH	Mueller Hinton
min.	minute
MRSA	*Staphylococcus aureus* résistant à la Méticilline

MSDS	« Material Security Data Sheet »
MTT	Bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium
NCCLS	« National Committee for Clinical Laboratory Standards »
NF	Norme Française
NOEL	« No Observed Effect Level »
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PA	*Pseudomonas aeruginosa*
PBS	« Phosphate Buffered Saline »
PLP	Protéine Liant les Pénicillines
QAC	« Quaternary Ammonium Compound »
RAISIN	Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales
RAMEB	« RAndomly MEthylated β-cyclodextrin »
RMN	Résonnance Magnétique Nucléaire
RPM	Rotations Par Minute
RSA	Relation Structure Activité
SARM	*Staphylococcus aureus* Résistant à la Méticilline
SBE-β-CD	« Sulfobutyl ether bêta-cyclodextrin »
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TG	Thermo Gravimétrie
UFC	Unité Formant Colonie
USA	United States of America
van A	Gènes de résistance aux glycopéptides
van B	Gènes de résistance à la vancomycine
VZV	Varicelle-Zoster Virus

Introduction

Le manque de thérapies innovantes en chimiothérapie humaine et plus particulièrement en Infectiologie est principalement dû à l'apparition de résistances aux principaux traitements existants. Ce déficit incite la communauté scientifique à s'intéresser à de nouvelles sources de composées bioactifs. Nombreuses sont les molécules d'intérêt, de synthèse ou naturelles, qui ont été mises en avant le siècle dernier. Parmi celles-ci, nous pouvons citer les métabolites secondaires issus de plantes, auxquels appartiennent les acides hydroxy- pentacycliques triterpénoiques (AHPTs) et plus particulièrement l'acide ursolique (AU), l'acide oléanolique (AO) et l'acide bétulinique (AB).

Ces molécules, découvertes dans un contexte de recherche éthnopharmacologique au cours du siècle dernier, font depuis l'objet de nombreux travaux scientifiques qui tendent à démontrer leurs innombrables propriétés pharmacologiques : anti-infectieuses, anticancéreuses, antiprolifératives, anti-inflammatoires, hépatoprotectrices… et d'insister sur leur intérêt potentiel.

Si certains auteurs proposent déjà d'utiliser les AHPTs soit directement par voie orale, soit associés à un co-solvant (le DMSO) par voie transdermique ou intraveineuse, certaines études ne manquent pas de souligner que le principal obstacle à leur utilisation à des fins thérapeutiques chez l'homme, reste l'insolubilité de ces AHPTs dans l'eau, responsable de leur faible biodisponibilité.

Notre objectif a donc été d'augmenter l'hydrosolubilité de ces AHPTs afin de les rendre plus attractifs pour une éventuelle utilisation en thérapeutique humaine en évitant l'utilisation de solvant organique potentiellement toxique ou pour le moins irritant. La voie de la vectorisation par cyclodextrine native de ces composés pentacycliques, bien que proposée par différents brevets américain du début du XX^{ème} siècle, n'a jamais fait l'objet de publication scientifique ; c'est cette voie que nous avons suivi.

Ce travail porte donc sur la complexation d'AHPTs : AU, AO et AB par une gamma-cyclodextrine native (γ-CD) ; la caractérisation des complexes obtenus par un ensemble de techniques analytiques pertinentes pour l'étude de ces systèmes moléculaires : chromatographie liquide haute performance (CLHP), analyse calorimétrique différentielle (ACD) et résonnance magnétique nucléaire (RMN) ; ainsi que l'étude des

propriétés biologiques de ces nouvelles entités chimiques : activités anti-infectieuses (antibactériennes, antivirales, antifongiques) et anticancéreuses.

La première partie de ce travail a permis de définir le cadre expérimental, les méthodes en accord avec les recommandations et/ou normes existantes pour la détermination des activités anti-infectieuses et d'évaluer les propriétés « vraies » des 3 AHPTs. En effet, de nombreuses études portant sur l'évaluation des activités de ces AHPTs paraissent discutables eu égard aux méthodes et aux modèles biologiques utilisés.

La seconde partie a consisté en la fabrication et l'étude de complexes entre les AHPTs et des molécules hôtes largement décrites dans la littérature : les cyclodextrines. Dans ce but, la complexation en milieu liquide par co-précipitation des AHPTs (AU, AO et AB) avec différentes cyclodextrines natives et une CD modifiée a été évaluée et qualifiée.

La troisième et dernière partie de ce travail a alors consisté à évaluer les activités biologiques des nouvelles entités obtenues : les complexes AHPTs : γ-CD, suivant les méthodologies validées dans la première partie.

Pour conclure, en fonction des résultats obtenus, nous serons amenés à proposer différentes améliorations de notre méthodologie de mesure d'activités antiinfectieuses et de la vectorisation même des AHPTs. Quelques propositions seront faites dans le but de pouvoir identifier des cibles biologiques potentielles des AHPTs.

Généralités

(Etat de l'art)

1 Les triterpènes

Les stérols, du fait des problèmes qu'ils peuvent engendrer en santé humaine (cholestérol) sont beaucoup plus étudiés que les triterpènes desquels ils dérivent. Ces derniers, très répandus dans la nature, ne sont pourtant pas dénués d'intérêts.

1.1 Définition et nomenclature

Les terpènes ont été nommés par Friedrich Kekulé von Stradonitz (médaille Copley en 1885), (Stradonitz, 1865). Friedrich Kekulé est surtout connu pour avoir déterminé la formule développée du benzène avec son alternance de simples et de doubles liaisons. Il propose le terme **ter**pène en référence à la **tér**ébenthine qui, en plus des acides résiniques, contient aussi des hydrocarbures.

Ces terpènes ont été également étudiés par Otto Wallach (Wallach, 1910) collaborateur de Kekulé et de Lavoslav Ružička (Ruzicka, 1945).

Otto Wallach, en 1884, (Chaire de Pharmacologie de l'Université de Bonn en 1879) soulève la question de la diversité des différents composés de formule brute $C_{10}H_{16}$ connus sous les appellations de terpène, camphène, citrène, carvène, cinène, cajuputène, eucalyptine, hespéridine… En utilisant des réactifs communs tels que le chlorure d'hydrogène et le bromure d'hydrogène, il a réussi à différencier ces composés. En 1909, il publie les résultats de ses études dans le livre « *Terpene und Campher »*, (Wallach, 1914), où il établit que beaucoup de ces composés étaient identiques.

Lavoslav Ružička, commence sa carrière dans le domaine de la Chimie des Substances Naturelles en isolant la poudre de Dalmatie de *Pyrethrum cinereriifolium*. Pour cela, il se focalise sur la chimie des terpènes puis ajoute à son champ d'expérimentation la chimie des stéroïdes. Suite à la synthèse réussie de l'androstérone et de la testostérone, il reçoit le prix Nobel de Chimie en 1939 « pour son travail sur les polyméthylènes et les terpènes supérieurs ».

Feodor Lynen (Lynen, 1964) et Konrad Bloch (Bloch, 1964) ont décrit en 1964 la biosynthèse des terpènes.

Feodor Lynen publia en 1965 un livre intitulé *« L'acide acétique activé - Terpènes et acides de matière grasse »*.

Ces lipides peuvent être trouvés dans toutes les classes de créatures vivantes, et constituent le plus large groupe de produits naturels. Les terpènes sont produits par de nombreuses plantes, en particulier les conifères. Ce sont des composants majeurs de la

résine. Les terpènes sont des dérivés de l'isoprène C_5H_8 et ont pour formule de base des multiples de celle-ci, c'est-à-dire $(C_5H_8)_n$. On distingue ainsi les hémiterpènes (C_5), les monoterpènes (C_{10}), les sesquiterpènes (C_{15}), les diterpènes (C_{20}), les sesterterpènes (C_{25}), les triterpènes (C_{30}), les tétraterpènes (C_{40}) et les polyterpènes (C_{5n}). La plupart de ces composés ont des structures polycycliques qui différent les unes des autres non seulement par les groupes fonctionnels, mais aussi par la structure basique de leur squelette hydrocarboné.

L'isoprène (Figure 1) peut être considéré comme l'un des éléments de construction préféré de la nature. Le squelette de carbone des terpènes est constitué d'unités isoprène reliées entre elles; c'est la « règle isoprénique » énoncée en 1953 par Ruzicka et complétée par Lynen et Bloch.

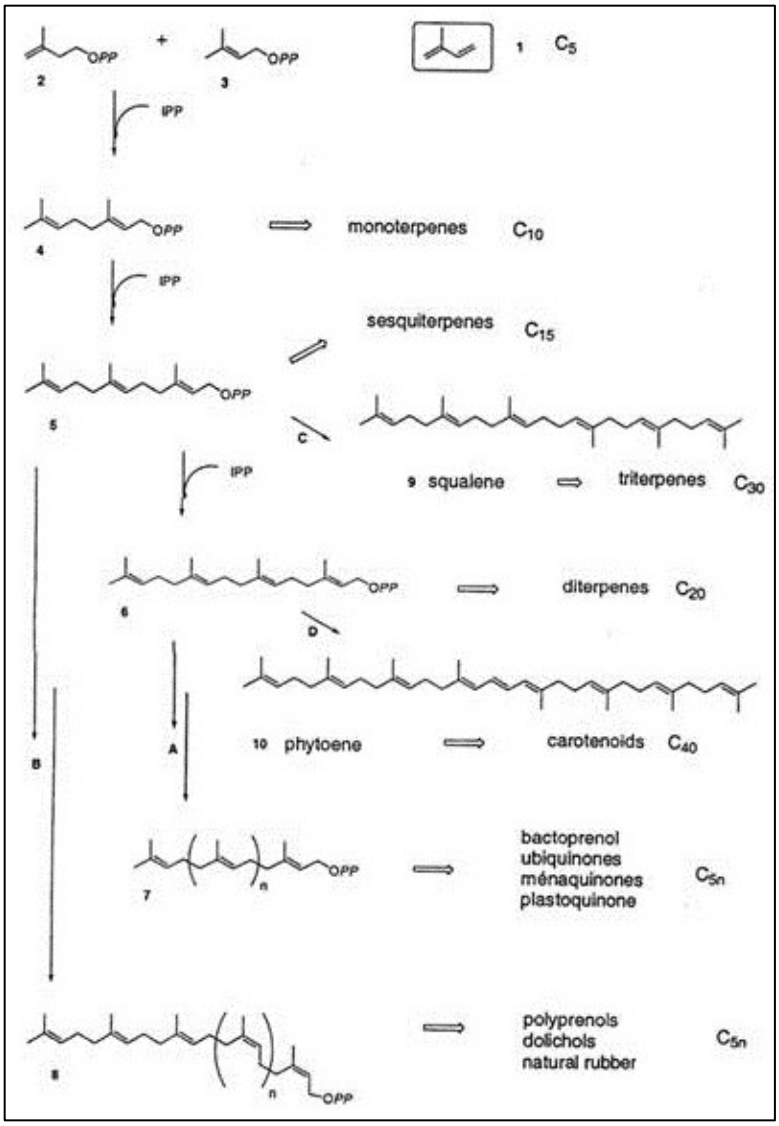


Figure 1 : De l'isoprène aux terpènes (Rohmer et Vandecasteele, 2007)

Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien former des cycles. Les stéroïdes et les stérols chez les animaux sont produits biologiquement à partir de précurseurs terpénoïdes et sont aussi diversifiés que chez les végétaux (Ebel, 2010 ; Isaka *et al.*, 2009 ; Isaka *et al.*, 2010). La liaison de protéines à des terpénoïdes a pour effet d'augmenter leur attachement à la membrane cellulaire ; cette modification post-traductionnelle s'appelle l'isoprénylation.

1.2 Voies de biosynthèse du diphosphonate d'isopenténylе

Le diphosphate d'isopenténylе (IPP) (Figure 2) et le diphosphate de diméthylallyle (DMAPP) (Figure 3), sont les précurseurs des tous les isoprénoïdes chez tous les êtres vivants. Ces deux métabolites représentent les équivalents biologiques de l'isoprène.
Deux voies de biosynthèse, tout à fait différentes, mènent à l'IPP, la voie du mévalonate et la voie du méthylérythritol phosphate.

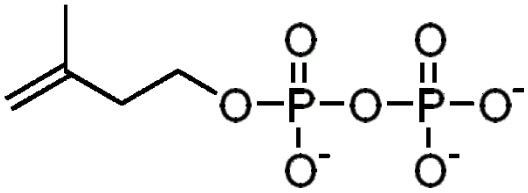


Figure 2 : Structure plane de l'IPP
(Hemmerlin *et al.*, 2011)

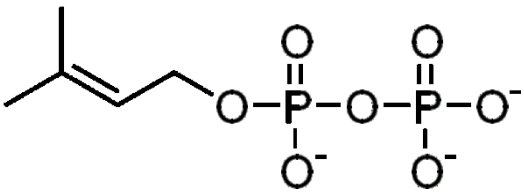


Figure 3 : Structure plane du DMAPP
(Hemmerlin *et al.*, 2011)

1.2.1 Voie du mévalonate

La voie du mévalonate (Figure 4), la plus anciennement connue, utilise l'acétyl-CoA comme point de départ, tout comme la biosynthèse des acides gras (Bloch, 1992 ; Bochar *et al.*, 1999). Cette voie métabolique est utilisée essentiellement pour la biosynthèse du cholestérol dans le foie ou de l'ergostérol dans la levure. Elle a été retrouvée ensuite chez un certain nombre d'isoprénoïdes végétaux (phytostérols, triterpènes, sesquiterpènes). Il a été admis que le mévalonate était le précurseur universel de tous les isoprénoïdes chez tous les êtres vivants, bien qu'un certain nombre de résultats expérimentaux sur la biosynthèse des isoprénoïdes de plantes ou de bactéries ne puissent pas être facilement interprétés dans le cadre de la voie du mévalonate. En fait, cette assertion s'est révélée par la suite incorrecte.

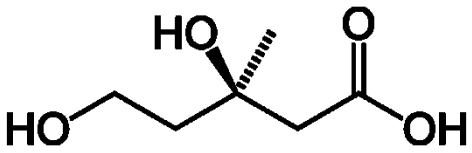


Figure 4 : Structure plane de l'acide mévalonique
(Hemmerlin *et al.*, 2011)

1.2.2 Voie du méthylérythritol phosphate

L'incorporation d'acétate ou de glucose marqué au ^{13}C dans les triterpènes bactériens de la série « hopane » a mis en évidence plus récemment une voie de biosynthèse de l'IPP et du DMAPP totalement différente (Rohmer, 1999). Cette voie a aussi été mise en évidence chez les plantes (Eisenreich *et al.*, 2004). L'élément central est le méthylérythritol phosphate (Figure 5). À la différence de la voie du mévalonate apparentée à la biosynthèse des lipides, cette voie alternative utilise des dérivés de glucides pour aboutir soit à l'IPP, soit au DMAPP.

En 2011, Hemmerlin a publié une revue (Hemmerlin *et al.*, 2011) très documentée essayant de démontrer la raison d'être de ces deux voies différentes de synthèse de l'IPP en donnant entre autre des indices liés à la distribution de ces voies dans l'ensemble du monde vivant et à l'évolution du vivant.

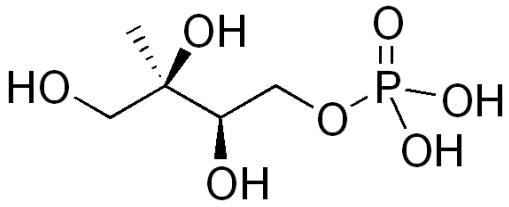


Figure 5 : Structure plane du méthylérythritol phosphate
(Hemmerlin *et al.*, 2011)

1.2.3 Formation des homologues supérieurs : prényl-transférases et terpènes synthases

Un nombre restreint de réactions enzymatiques est impliqué dans la formation des squelettes des terpénoïdes à partir des deux sous-unités en C_5, l'IPP et le DMAPP.

Un premier type de réactions correspond aux réactions catalysées par les prényl transférases (Ogura *et al.*, 1997). Elles utilisent le DMAPP pour obtenir les homologues supérieurs des isoprénoïdes acycliques, et l'IPP comme réactif d'élongation. Ces enzymes effectuent un couplage tête à queue des précurseurs et permettent d'obtenir tous les diphosphates de polyprényles avec des squelettes en C_{5n} à partir des deux sous-unités de base en C_5.

Un deuxième type d'enzymes est impliqué dans un couplage tête à tête de diphosphates d'alcools allyliques. Les produits de réaction sont le squalène ou le phytoène qui sont respectivement les précurseurs des triterpénoïdes et des caroténoïdes. Elles sont entre autre présentes dans les bactéries chez lesquelles elles fabriquent des triterpènes de type squalène (Abe *et al.*, 2002) et/ou hopane (Taylor, 1984). Ikuro Abe, est un des principaux auteurs travaillant sur ces enzymes (Abe, 2007 ; Abe, 2008 ; Abe *et al.*, 1993 ; Abe et Hoshino, 2005).

Finalement, la grande diversité des squelettes terpéniques est due aux terpènes synthases. Ces enzymes permettent de cycliser les substrats terpéniques acycliques caractérisés par des motifs polyéniques (Figure 6). Les structures de tous les isoprénoïdes peuvent ainsi être déduites à partir de concepts découlant directement des connaissances acquises sur les mécanismes réactionnels en chimie organique sur la chimie des carbocations.

Ces mécanismes constituent la base de la règle isoprénique biogénétique qui permet d'interpréter et de prévoir toutes les structures de terpénoïdes (Ruzicka, 1959). Les critères stéréo électroniques ont été clairement énoncés, en particulier à propos des cyclisations du squalène ou de l'époxyde de squalène conduisant aux squelettes triterpéniques (Eschenmoser *et al.*, 1955).

Les terpènes synthases travaillent toutes suivant un même schéma (Reinert *et al.*, 2004). Elles semblent par ailleurs voisines sur le plan phylogénétique et sont vraisemblablement construites sur des plans relativement similaires, du moins d'après les premières informations disponibles sur les quelques séquences de nucléotides et structures tridimensionnelles connues (Trapp et Croteau, 2001 ; Wendt *et al.*, 1997 ; Wendt et Schulz, 1998). La diversité des structures résulte uniquement des nombreuses conformations que peut adopter le substrat acyclique. Pour une réaction de cyclisation donnée, c'est l'enzyme qui impose cette conformation via les interactions enzyme/substrat au sein du site actif (Abe *et al.*, 1993 ; Eschenmoser *et al.*, 1955 ; Wendt et Schulz, 1998).

Des modifications du squelette carboné peuvent être apportées par la suite : oxydations permettant d'introduire des groupements fonctionnels oxygénés et pouvant aller jusqu'à la perte d'un ou plusieurs atomes de carbone, ou méthylations permettant d'ajouter un ou plusieurs atomes de carbone supplémentaires.

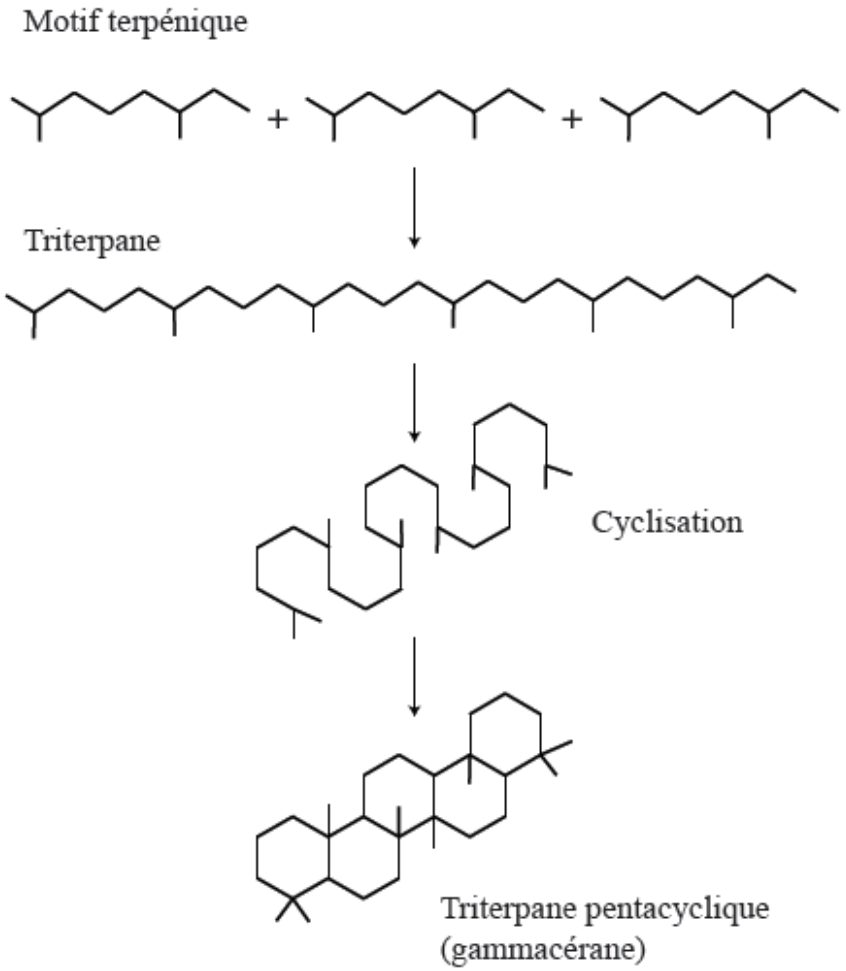


Figure 6 : Description schématique de l'activité d'un triterpène cyclase (Wendt *et al.*, 1997)

1.3 Structure des terpènes

Les triterpènes pentacycliques sont des molécules composées de trois motifs terpéniques (soit six motifs isopréniques) agencés, soit en cinq cycles à six carbones (Figure 6), soit en quatre cycles à six carbones et un cycle à cinq carbones.

Par extension, sont également apparentés à cette famille tous les composés issus des mêmes voies biosynthétiques (onocérane par exemple), ou qui en dérivent par dégradation.

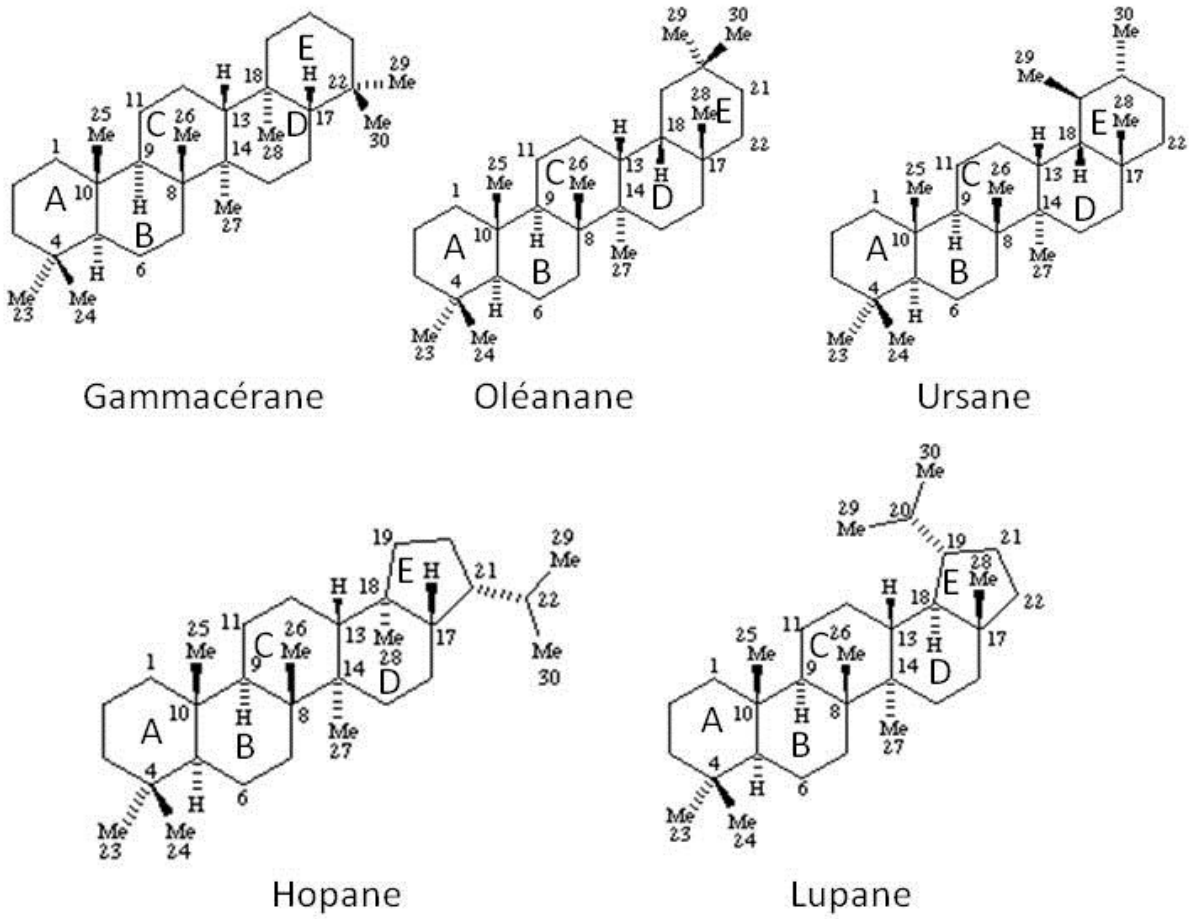


Figure 7 : Structures planes des squelettes carbonés de triterpènes pentacycliques
(règles de numérotation des carbones et dénomination des cycles des triterpènes pentacycliques d'après la section F des recommandations de nomenclature de l'IUPAC (Giles, 1999))

Plus de 50000 composés ont ainsi été recensés dans la famille des triterpènes pentacycliques. J.D. Connolly et R.A. Hill font régulièrement une revue des triterpénoïdes où l'ensemble des détails sur ces structures est mis à jour depuis 1985 (Connolly et Hill, 1989 ; Connolly et Hill, 2000 ; Connolly et Hill, 2001 ; Connolly et Hill, 2002 ; Connolly et Hill, 2003 ; Connolly et Hill, 2005 ; Connolly et Hill, 2007 ; Connolly et Hill, 2008 ; Connolly et Hill, 2010 ; Connolly *et al.*, 1994 ; Hill et Connolly, 2011).

Cette variété de composés est le résultat :

- de l'agencement des cycles ;
- de la position de groupements méthyles de substitution ;
- de la présence et de la localisation d'insaturations ;
- de possibles isoméries (configuration chaise/bateau, R ou S, α ou β…) ;
- de la présence de groupements fonctionnels (alcools, cétones, acides carboxyliques), voir d'autres entités moléculaires associées (sucres et phénols, par exemple) ;
- de modifications postérieures à leur synthèse propre.

Ainsi, il existe plus de 512 isomères possibles de l'isoarborinol du seul fait des 5 cycles et des 9 carbones asymétriques que comporte le squelette de ce composé. Ces possibilités de structures induisent la nécessité d'une nomenclature adaptée.

1.3.1 Règles et structures de base

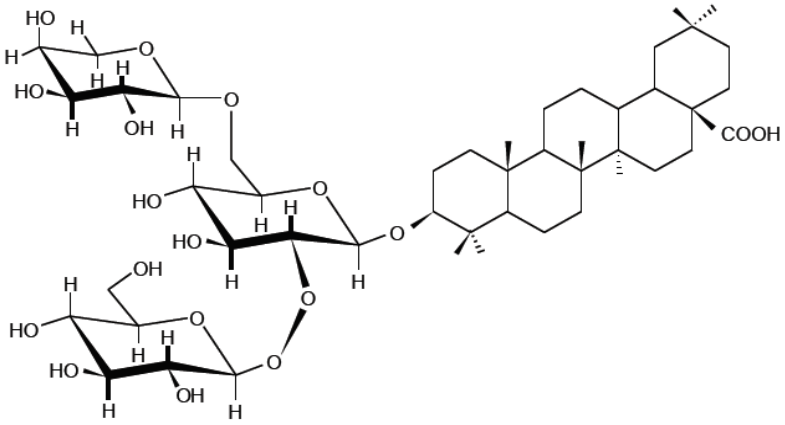
La nomenclature se fonde sur la structure de quelques constituants hydrocarbonés, ou triterpènes, de base. Tous les autres squelettes triterpéniques sont sensés dériver de ces composés fondamentaux par des modifications dont les modalités seront exposées. Les clés de cette nomenclature ont été formulées par Allard et Ourisson (Allard et Ourisson, 1957).

1.3.2 Règles de numérotation

La numérotation (Figure 7) des triterpènes pentacycliques commence par le cycle A et "remonte" vers le cycle E. Dans le cas des composés comportant un cycle E à cinq carbones supportant une chaîne alkyle, la numérotation continue sur le premier carbone de ce radical alkyl. La numérotation des groupements méthyls se fait ensuite depuis le cycle A vers le cycle E, puis se poursuit sur le reste de la chaîne alkyle. Pour les carbones gem-diméthylés, le numéro le plus bas est attribué au groupement en position α.

1.3.3 Saponines et sapogénines

Le terme saponine est appliqué à tout composé organique qui présente la particularité de mousser lorsqu'il est agité en présence d'eau. Chimiquement, ces molécules sont des glycosides qui produisent, lors d'une hydrolyse, des oses et un aglycone ou sapogénine. Les oses sont souvent fixés sur une fonction alcool de l'aglycone (Figure 8). L'aglycone peut avoir une structure de stéroïde ou de triterpène pentacyclique. Ainsi, la diversité des triterpènes pentacycliques est multipliée, dans les organismes, par le nombre et la variété des oses qui leur sont associés.



{3-O-β-D-glucopyranosyl(1→2)-[α-L-arabinopyranosyl(1→6)]-β-D-glucopyranosyl}-oléanolique acide

Figure 8 : Exemple de structure d'une sapogénine avec un aglycone de type oléanane

1.3.4 Les acides hydroxy pentacycliques triterpénoiques

Ce sont des triterpènes pentacycliques de formule brut $C_{30}H_{48}O_3$ (M=456,7 g/mol) pour les mono hydroxylés. Les trois terpènes utilisés dans ce travail appartiennent à cette famille particulière de composés. Ils se retrouvent dans de nombreux organismes vivants ; le plus souvent des végétaux. La liste de ces végétaux s'accroit pratiquement de jour en jour. Pour exemple nous pouvons citer :

- *Garcinia tetralata* (Guo *et al.*, 2011) de la famille du mangoustier,
- *Sedum lineare* (Niu *et al.*, 2011)
- *Gardenia obtusifolia* (Nuanyai *et al.*, 2011)
- *Terminalia ivorensis* (Ponou *et al.*, 2011)
- *Barringtonia asiatica* (Ragasa *et al.*, 2011)
- *Nannoglottis carpesioides* (Xue *et al.*, 2011)
- *Liquidambar formosana* (Yang *et al.*, 2011)

Mais aussi des végétaux plus communs :

- *Rosmarinus officinalis* (Brieskorn et Zweyrohn, 1970)
- Mentha piperita (Croteau et Loomis, 1973)
- *Lavandula angustifolia Origan* (Jäger *et al.*, 2009)
- *Thymus vulgaris* (Rowe *et al.*, 1949)

Leur particularité, outre de posséder un squelette carboné caractéristique de leur famille, est de porter une fonction carboxylique -COOH et une fonction alcool –OH. La fonction carboxylique est celle qui est le plus souvent décrite comme porteuse des activités biologiques de cette classe de molécules (Kashiwada *et al.*, 2000 ; Ma *et al.*, 2000 ; Mallavadhani *et al.*, 2004).

1.4 Propriétés physico-chimiques des acides hydroxy pentacycliques triterpénoiques

Les AHPTs ne sont ni volatils, ni entraînables par la vapeur d'eau. Ils ne deviennent solubles dans l'eau que lorsqu'ils sont combinés à des sucres (saponosides). Pratiquement insolubles dans l'eau (Jager *et al.*, 2007), ils sont extractibles par des solvants organiques (méthanol, chloroforme, éther, acétate d'éthyle, benzène). Certains se retrouvent dans l'insaponifiable des corps gras.

Ils présentent des réactions colorées dont beaucoup sont communes aux stérols :

- Réaction de Salkowski (addition d'acide sulfurique à la solution chloroformique : coloration jaune, puis rouge)
- Réaction de Liebermann (anhydride acétique, puis acide sulfurique : coloration verte, rouge ou bleu violacé)
- Réaction de Rosenthaler (vanilline chlorhydrique : coloration rose)
- Réaction de Hirschsohn (acide trichloracétique : coloration jaune puis rouge)
- Réaction de Brieskorn et Briner (acide chlorosulfurique : coloration rouge violacée), spécifique des triterpènes

L'isolement et l'identification de ces AHPTs se font principalement par extraction méthanolique ou chloroformique (Cowan, 1999). A ce jour, plus de 30 000 triterpènes pentacycliques sont connus (De Luca et St Pierre, 2000).

Parmi eux, les acides ursolique, oléanolique, bétulinique méritent une attention particulière.

1.4.1 L'acide ursolique

L'acide ursolique (AU) a été extrait pour la première fois par Trommsdorff (Trommsdorff, 1854) à partir de feuilles d'*Arctostaphylos uva ursi* (Busserole ou Raisin d'ours, arbuste de la famille des Éricacées); il lui donne le nom d'urson (Gintl, 1893). C'est Gintl qui en détermine la formule brute et propose un point de fusion compris entre 285 et 288°C. En 1910, Power et Moore (Power et Moore, 1910) le retrouve à nouveau chez *Prunus serotina* (Cerisier tardif, arbre de la famille des Rosacées) et le dénomme prunol pensant avoir à faire à un isomère de l'urson. En 1923, Sando l'isole d'épluchure de pommes et l'identifie sous le nom de malol, pensant à son tour avoir découvert un isomére de l'urson (Sando, 1931). En 1945, Ruzicka *et coll.* (Ruzicka *et al.*, 1945) déterminent la structure plane de l'acide ursolique et en 1992 Simon *et coll.* en établissent la structure cristallographique (Simon *et al.*, 1992).

Les dénominations suivantes sont aussi utilisées pour l'AU : micromerol, acide bungeolic, merotaine, NSC 167406, NSC 4060, et acide (3β)-3-hydroxyurs-12-en-28-oique acide.

L'AU est insoluble dans l'eau et l'éther de pétrole. Il possède une solubilité exprimée en ($^{m}/_{m}$) de 1/88 dans le méthanol, 1/178 dans l'éthanol (1/35 dans l'éthanol à ébullition (78°C)), 1/145 dans l'éther, 1/388 dans le chloroforme, 1/1675 dans le disulfure de carbone. Il est peu soluble dans l'acétone.

L'acide ursolique est très largement distribué dans la nature et principalement dans le règne végétal. Il serait illusoire de vouloir ici donner une liste des organismes en contenant. Notons toutefois que pour la majorité d'entre elles, il s'agit soit de plantes aromatiques, soit de plantes utilisées en ethnopharmacologie.

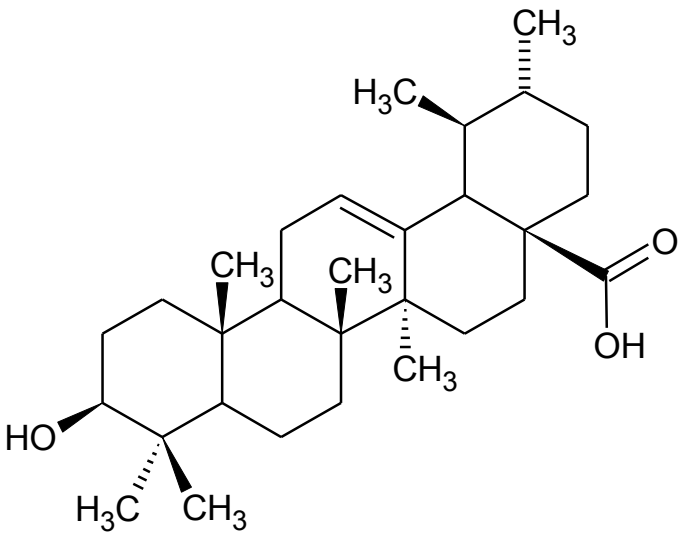


Figure 9 : Structure plane de l'acide ursolique

1.4.2 L'acide oléanolique

L'acide oléanolique (AO) est isolé à partir de *Syzygium aromaticum* (Girofle, clou de girofle, arbre de la famille des Myrtacées) depuis 1931. Par la suite, cette molécule a été retrouvée dans de nombreuses autres plantes dont *Olea europea* (Olivier, arbre de la famille des Oléacées) qui lui doit son nom. En 1945, Ruzicka *et coll.* déterminent sa structure plane (Ruzicka *et al.*, 1945).

Il peut être retrouvé sous les dénominations suivantes : astrantiagenine C, caryophylline, giganteumgenin C, oléanol, gledigenine 1, NSC 114945, virgaureagenine B et acide 3β-hydroxyolean-12-en-28-oique.

Le point de fusion de l'AO est de 310°C. Il est insoluble dans l'eau. Il a une solubilité exprimée en ($^{m}/_{m}$) de 1/65 dans l'éther, 1/106 dans l'éthanol 96% ($^{v}/_{v}$), 1/35 dans l'éthanol à ébullition, 1/118 dans le chloroforme, 1/180 dans l'acétone et 1/235 dans le méthanol.

Comme l'AU, sa distribution dans le monde vivant est très large et très étudiée, avec une présence majoritaire dans les plantes aromatiques et celles à usage thérapeutique traditionnel.

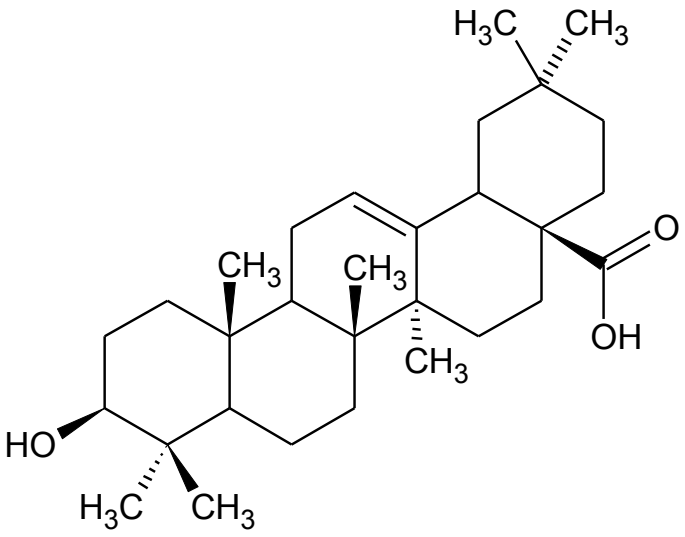


Figure 10 : Structure plane de l'acide oléanolique

1.4.3 L'acide bétulinique

L'acide bétulinique (AB) a été isolé en 1939 à partir de la plante de *Cornus florida L.* durant les travaux de thèse de Soliman. Il prend alors le nom d'acide cornolic. La même année les travaux de Robertson, Soliman et Owen montrent que cet acide cornolic n'est autre que la forme acide du 3 monoacétate de bétulin et lui donne alors son nom d'acide bétulinique (Robertson *et al.*, 1939).

L'AB est aussi connu sous les noms de mairin, 3aH-cyclopenta[a]chrysene, acide lup-20(29)-en-28-oique, acide lupatic; NSC 113090 et acide 3β-hydroxylup-20(29)-en-28-oique.

Le point de fusion de l'AB est à 316-318°C. Il est insoluble dans l'eau. Il a une solubilité exprimée en ($^{m}/_{m}$) de 1/65 dans l'éther, 1/106 dans l'éthanol 96% ($^{v}/_{v}$), 1/35 dans l'éthanol à ébullition, 1/118 dans le chloroforme, 1/180 dans l'acétone et 1/235 dans le méthanol.

Comme l'AU et l'AO, sa distribution dans le monde vivant est très large et très étudiée avec une présence majoritaire dans les plantes à usage aromatique et celles à usage thérapeutique traditionnel.

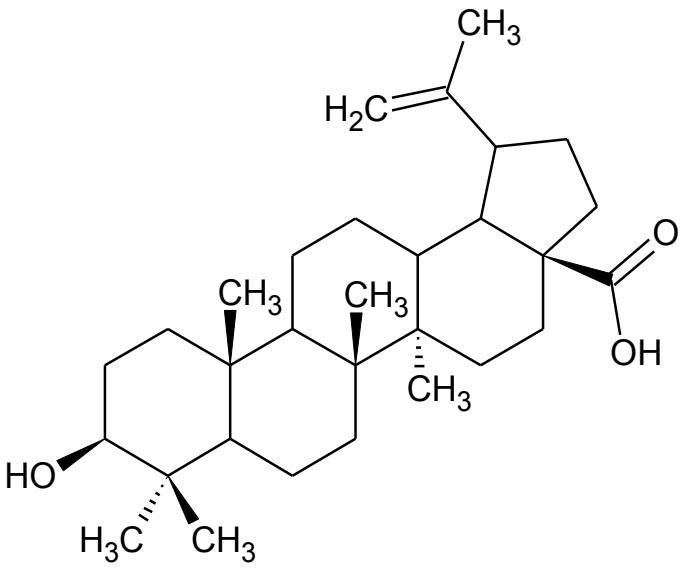


Figure 11 : Structure de l'acide bétulinique

1.5 Des intérêts écologiques aux intérêts en thérapeutique

De par leur surreprésentation dans le règne végétal et leur qualité de métabolite secondaire, les triterpènes ont su attirer l'attention du monde scientifique sur eux et sur leurs propriétés.

1.5.1 Rôle physiologique chez les végétaux et applications en parapharmacie

Les triterpènes pentacycliques ont été isolés des différents organes des plantes (Jager *et al.*, 2009 ; Kowalski, 2007). Par exemple, l'insaponifiable des graines d'oléagineux contient de l'α-amyrine, de la β-amyrine, du lupéol, des alcools libres et des esters d'acides gras. L'insaponifiable des latex renferme essentiellement des alcools : α-amyrine, β-amyrine, lupéol, taraxérol, taraxastérol et germanicol. Les triterpènes pentacycliques sont également présents dans les huiles et extraits de germes de céréales, résines, écorces, cires épicuticulaires, cires de fruits, fleurs, tubercules… (Boiteau *et al.*, 1964).

La fonction des triterpènes pentacycliques dans les plantes reste méconnue. L'origine de leur grande diversité dans le monde végétal est aussi étudiée à des fins taxonomiques (Xu *et al.*, 2004). Le rôle répulsif face à divers agents biologiques (bactéries, virus, fungi…) des triterpènes pentacycliques dans les cires cuticulaires, a attiré sur eux l'attention des tradi-practiciens principalement en Asie (Liu, 2005).

Cet intérêt a été renforcé par la découverte des saponines glycosylées de triterpènes. Le groupement glycosylé ainsi rapporté rend l'assimilation des triterpènes pentacycliques plus aisée. Cependant, ce gain en biodisponibilité est toujours contrebalancé par une augmentation importante de leur (cyto)toxicité (Hao *et al.*, 2011).

Les effets médicaux d'extraits de végétaux contenant des triterpènes pentacycliques, largement utilisés dans les médecines traditionnelles, semblent plus étudiés et mieux connus que la fonction effective de ces molécules dans les plantes.

Au contraire des mono- et sesquiterpénoïdes qui ont une fonction de signal (de par leur caractère volatil), les triterpénoïdes qui sont retenus à la surface des feuilles assurent des rôles multiples (répulsifs, antiparasitaires, antibactériens…) en modifiant les propriétés des feuilles face à divers agents écologiques.

Pour d'autres auteurs, les triterpènes pentacycliques auraient un rôle déterminant dans les phénomènes de perméabilité membranaire y compris chez les bactéries (Prades *et al.*, 2011 ; Taylor, 1984).

Il apparaît, toujours selon Boiteau *et coll.* (Boiteau *et al.*, 1964) que les triterpènes pentacycliques, au même titre que d'autres molécules (gibbérellines, auxines…), interviendraient dans le contrôle de la croissance des végétaux et de la morphogenèse, ainsi que dans la cicatrisation.

Par ailleurs, Lohmann (Lohmann, 1988) indique que l'acide oléanolique peut servir de transporteur de sucres (sous forme de saponine) depuis les feuilles jusqu'aux racines. En outre, aucune étude n'a été publiée sur les variations d'abondance de ces composés en réponse à d'autres stress environnementaux que les agents biologiques ou le stade de développement.

Les terpénoïdes de plantes sont très utilisés en raison de leurs qualités aromatiques. Ils jouent un rôle dans les remèdes en herboristerie traditionnelle et font l'objet de recherche pour découvrir des effets antibactériens, antinéoplasiques et autres effets pharmaceutiques et pharmacologiques.

Les terpénoïdes contribuent au parfum de l'eucalyptus, au goût de la cannelle, du clou de girofle et du gingembre, aux couleurs jaunes des fleurs. Parmi les terpénoïdes connus on peut citer le citral, le menthol, le camphre ou les cannabinoïdes trouvés dans la plante de *Cannabis*.

Il semblerait que certains microorganismes de type fungi soient capables de transformer des métabolites secondaires de plantes existant de façon abondante, en métabolites secondaires plus rares, notamment en acide ursolique (Ibrahim *et al.*, 2008).

La découverte de molécules de type lupane dans certaines membranes bactériennes souligne la potentialité de ces microorganismes à synthétiser ce type de composé. Actuellement des études sont menées afin de développer des milieux de culture permettant d'augmenter la synthèse de ces molécules par les champignons producteurs (Lu *et al.*, 2011).

1.5.2 Applications en santé humaine

Nous allons envisager plus précisément les applications thérapeutiques potentielles des trois triterpènes concernés par notre étude.

1.5.2.1 **L'Acide Ursolique**

Les effets de l'AU sur les systèmes biologiques sont très nombreux (Liu, 2005). Du fait de son origine végétale et des effets protecteurs qui lui furent accordés, de nombreux auteurs ont dirigé leurs études sur les effets anti-infectieux de cette molécule : antibactérien (Setzer *et al.*, 2006), antiviral (Xu *et al.*, 1996), antifongique et anti-parasitaire (Germonprez *et al.*, 2005).

Par la suite, les recherches scientifiques ont révélé et confirmé plusieurs effets pharmacologiques :

- anti-tumoral (Bishayee *et al.*, 2011 ; Kwon *et al.*, 2010 ; Laszczyk, 2009 ; Murakami *et al.*, 2004), hépato-protecteur (Saravanan *et al.*, 2006 ; Wu *et al.*, 2011), antioxydant (Ismaili *et al.*, 2004), anti-ulcéreux, anti- hypertenseur (Somova *et al.*, 2003), antidiabétique (Genet *et al.*, 2010 ; Ramirez-Espinosa *et al.*, 2011 ; Zhang *et al.*, 2006), hypolipémiant (Somova *et al.*, 2003), inhibiteur de biofilm (Hu *et al.*, 2006), anti-inflammatoire (Baricevic *et al.*, 2001)…

Récemment une activité potentielle thérapeutique contre la maladie d'Alzheimer a été décrite (Wilkinson *et al.*, 2011). Ces phénomènes biologiques sont certainement dus à la capacité de l'AU à interagir avec les systèmes enzymatiques (Ali *et al.*, 2006), les acides nucléiques ou les membranes biologiques (Han *et al.*, 1997).

1.5.2.2 **L'Acide Oléanolique**

C'est un agent biologiquement actif dans de :

- nombreux phénomènes, en tant que : anti-inflammatoire (Altinier *et al.*, 2007 ; Martin *et al.*, 2010), inducteur d'apoptose (Cipak *et al.*, 2006), hépato protecteur (Wu *et al.*, 2011) et antioxydant (Gao *et al.*, 2009) ;
- nombreuses pathologies, en tant que : antipaludéen (He *et al.*, 2005), anti-VIH (Kashiwada *et al.*, 1998), antidiabétique (Gao *et al.*, 2009 ; Genet *et al.*, 2010 ; Ramirez-Espinosa *et al.*, 2011), anticancéreux (Allouche *et al.*, 2010 ; Bishayee *et al.*, 2011 ; Laszczyk, 2009 ; Li *et al.*, 2002) et antibactérien (Liu, 2005).

1.5.2.3 **L'Acide Bétulinique**

Comme les deux autres triterpènes, c'est un agent biologiquement actif présentant de nombreux effets :

- anti-inflammatoires (Chowdhury *et al.*, 2002), inducteur d'apoptose (Thurnher *et al.*, 2003), immunomodulateur (Yi *et al.*, 2010 ; Yun *et al.*, 2003) ;
- antidiabétique (Genet *et al.*, 2010), antipaludéen (De Sa *et al.*, 2009 ; Dominguez-Carmona *et al.*, 2010), anti-VIH (Fujioka *et al.*, 1994), et surtout anticancéreux (Andre *et al.*, 2006 ; Bishayee *et al.*, 2011 ; Fulda, 2008 ; Fulda, 2009 ; Laszczyk, 2009 ; Tan *et al.*, 2003) ;

Cependant, les dérivés de la bétuline, y compris l'acide bétulinique, semblent avoir une activité antimicrobienne assez limitée (Alakurtti *et al.*, 2006). Nous pouvons toutefois citer l'activité anti-VIH du bevirimat, dérivé de l'acide bétulinique (Smith *et al.*, 2007). Cette molécule inhibe la maturation des protéines par clivage des précurseurs en ciblant le substrat protéique et non la protéase. Bien qu'ayant franchi les phases I et II d'études précliniques (sous le nom de PA-457), il fait actuellement face à l'apparition de nombreuses souches virales résistantes (Knapp *et al.*, 2011 ; Lu *et al.*, 2011). Les essais de phase IIb ont montré que cette molécule pouvait faire diminuer de 1,26 log la charge virale des patients traités. Ce médicament, ancienne propriété du groupe américain Panacos Pharmaceuticals Inc., appartient maintenant au groupe Myriad Pharmaceuticals Inc. qui l'a rebaptisé MPC-4326. Myriad a stoppé les essais cliniques sur l'ensemble de ce type de médicament afin de concentrer ses efforts de R&D sur des molécules anticancéreuses. Les essais de phase III n'auront peut-être jamais lieu.

Les études pharmacologiques ont montré que ces trois AHPTs sont actifs à la fois en usage externe (topique) et après administration orale. L'injection de telles substances reste bien sûr limitée du fait de leur non hydrosolubilité. Cela rend difficile son

absorption et sa diffusion dans l'organisme et donc entraine une faible biodisponibilité générale de ces molécules. De nombreuses études pointent ce fait comme la limitation principale à leur utilisation comme agents thérapeutiques (Gauthier *et al.*, 2006 ; Mullauer *et al.*, 2009).

2 Les méthodes d'hydro-solubilisation des acides hydroxy pentacycliques triterpénoiques

Pour augmenter la solubilité des AHPTs, il y a trois possibilités :

- soit les modifier chimiquement
- soit réaliser une cosolvation des AHPTs
- soit les vectoriser

2.1 Modifications chimiques

Trois cas sont à différencier ici,

- soit la molécule est modifiée afin d'obtenir une entité nouvelle, elle-même active à la façon de la molécule d'origine mais avec des propriétés physiques et chimiques différentes. Dans ce but, de nombreuses équipes ont greffé, sur les fonctions hydroxyle et carboxyle des AHPTs, des substituants divers. Parmi ces substituants, nous pouvons citer des fonctions alcool, sulfo, amino et amines accompagnées de chaines carbonées plus ou moins longues (Bai *et al.*, 2012). L'équipe de Baï K. *et coll.* a ainsi multiplié par 288 l'hydrosolubilité de l'AU par le greffage d'une simple fonction hydroxylamine sur le C_{28} de l'AU. La cytotoxicité – sur cellules cancéreuses (HT29 et HepG2) - quant à elle a été multipliée par 2,5. Dans certains cas cependant l'entité nouvelle perd l'activité biologique du composé d'origine, et/ou il y a accroissement de sa toxicité. Meng Y-K. en estérifiant les C_3 et/ou les C_5 a obtenu une augmentation de la cytotoxicité – mesurée lors de cette étude seulement sur des lignées de cellules cancéreuses (Meng *et al.*, 2009). Dans certains cas, l'augmentation de la toxicité sur des lignés cancéreuses pour accroitre l'activité anticancéreuse peut être un des objectifs recherchés.

- soit la molécule est utilisée sous forme de son sel. Ainsi l'AB sous 1a forme de cholinium de bétulinate ($OH\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}NH_4^+$) est 100 fois plus soluble que la molécule initiale dans une solution à 0,1% de DMSO. Son potentiel anticancéreux sur cellules MCF7 et A375 est multiplié par 5 (Gauthier, 2006 ; Suresh *et al.*, 2012).

- soit la molécule est transformée de façon à obtenir une forme transitoire appelée prodrogue dont la biotransformation après administration permet au composé initial d'exercer un effet pharmacologique. Dans cet objectif, la recherche porte sur la synthèse d'ester d'AHPTs. Ces esters seraient coupés par les nombreuses estérases de l'organisme et les AHPTs ainsi libérés auraient une meilleure biodisponibilité (Figure 12). C'est le cas par exemple d'un anti-tumoral basé sur l'AB qui devrait, selon les auteurs, réagir comme une prodrogue (Drag-Zalesinska *et al.*, 2009). Drag-Zalesinska *et coll.* ont greffé sur le $C_{28,}$ par estérification de la fonction acide, différents acides aminés (lysine, alanine, phénylalanine, acide 2 amino-butyrique…). Ils ont ainsi observé une augmentation significative de l'hydrosolubilité de l'AB avec ces 4 acides aminés. Cependant sa toxicité – sur cellules cancéreuse de pancréas – augmente lors du greffage de lysine ou d'acide 2 amino-butyrique et diminue dans les autres cas ce qui est très intéressant pour une application en thérapeutique anticancéreuse.

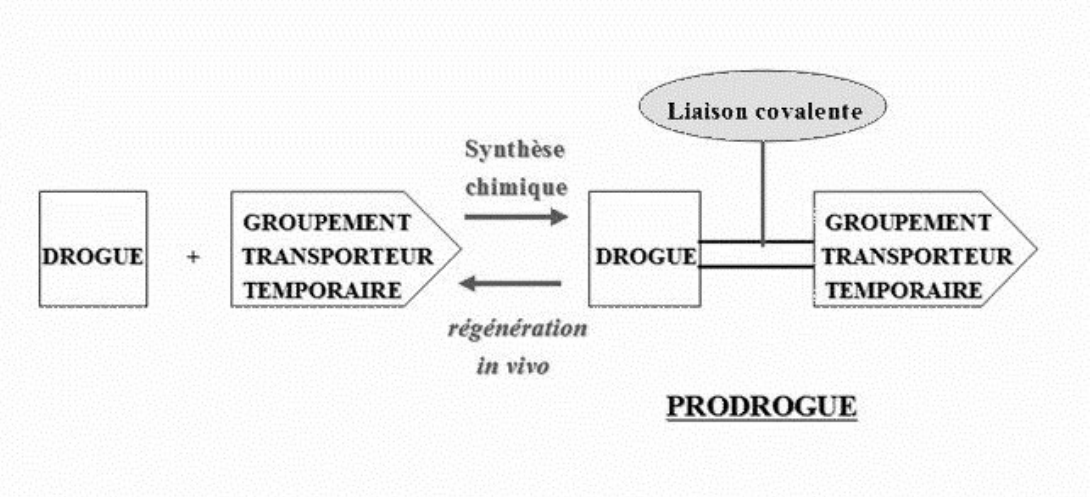


Figure 12 : Principe des prodrogues à transporteur

2.2 Co-solvatation

La solvatation est le phénomène physico-chimique observé lors de la dissolution d'un composé chimique dans un solvant.
Une espèce solvatée est entourée par un « bouclier » de molécules de solvant.

Dans le cas de la co-solvatation, un premier solvant (le co-solvant) forme ce « bouclier » de molécules de solvant. Ce sont les propriétés de l'entité formée par la

molécule à solubiliser et ce co-solvant qui permettront d'obtenir une solubilisation dans le solvant visé (« deuxième » solvant).

Dans le cas des AHPTs, ces co-solvants doivent être un solubilisant des AHPTs et solubles dans l'eau. R.G. Strickley cite en 2004 plusieurs molécules servant de co-solvant en thérapeutique humaine : le dimethylacetamide, le dimethylsulfoxyde, l'éthanol, la glycérine, le N-methyl-2-pyrrolidone, les PEG 300 & 400, le poloxamer 407, le propylène-glycol.

Le DMSO, largement utilisé avec les AHPTs pose de nombreux problèmes allant de sa « simple » toxicité (Bégin *et al.*, 2002) à des problèmes impactant l'interprétation et l'interprétabilité des résultats. En effet, le DMSO est capable d'induire la mise en place de phénomènes de « résistance » chez les cellules vivantes qui sont à son contact. Ces phénomènes permettent, par exemple, aux bactéries non seulement de survivre au DMSO et ce jusqu'à de fortes concentrations (Fedorka-Cray *et al.*, 1988) mais certainement aussi de voir modifier leur sensibilité aux principes actifs qui se trouvent dissous par le DMSO (Markarian *et al.*, 2002 ; Wood et Wood, 1975).

2.3 Vectorisation

La vectorisation met en jeu des vecteurs, de type soit particulaires (nano-sphères, microsphères, liposomes), soit moléculaires (virus, polymères, cyclodextrines, anticorps), soit vivants (bactéries, cellules), qui permettent de transporter des principes actifs.

Les cyclodextrines sont le plus souvent utilisées pour former des complexes supramoléculaires avec le principe actif à vectoriser. Leur utilisation pour former des nanoparticules, des liposomes ou des microsphères de cyclodextrine se développe de plus en plus.

Le greffage de molécules à des fins d'adressage de ces édifices supramoléculaires se développe aussi de plus en plus de façon à libérer le principe actif au plus près de sa cible (colon, cerveau) (Chinna Reddy *et al.*, 2012). Trois formes principales peuvent exister en vectorisation :

- Les liposomes, sont des systèmes principalement fondés sur les propriétés amphiphiles des molécules qui les composent. Ces assemblages forment des monocouches ou des bicouches capables d'emprisonner les principes actifs à transporter tout en restant solubles dans des phases principalement aqueuses.

Ces approches ont été utilisées pour vectoriser certains polyphénols comme le trans-resveratrol avec une visée de traitement anticancéreux (Bonechi *et al.*, 2012). Ces liposomes sont de plus en plus souvent stabilisés par incorporation de cyclodextrine dans leurs couches lipidiques (Skalko-Basnet *et al.*, 2000).

- Les nanoparticules, sont actuellement très utilisées dans de nombreuses formulations médicamenteuses ou cosmétiques. Les plus sûres sont les nanoparticules « métalliques » (TiO_2 – NiO_2…) alors que les nanoparticules à base de « silice » (SiO_2) semblent beaucoup plus cytotoxiques (Medina *et al.*, 2007 ; Napierska *et al.*, 2012). Les nanoparticules de cyclodextrines sont une piste pleine de promesse pour l'augmentation des capacités de transport des nanoparticules. Ceci tout en augmentant leur hydrosolubilité et en stabilisant les principes actifs transportés. (Boudad *et al.*, 2001). Pour exemple, ces nanoparticules à cyclodextrines peuvent aussi servir à vectoriser des anticancéreux comme le paclitaxel par exemple (Miao *et al.*, 2012).

- Les cyclodextrines, offrent quant à elles la possibilité de transporter le principe actif par l'inclusion de ce dernier dans des navettes moléculaires. Plusieurs cyclodextrines peuvent même être assemblées afin de vectoriser des molécules de taille supérieure à celle de leur cavité comme par exemple des siRNA (Kulkarni *et al.*, 2012).

3 Les cyclodextrines

En 1891, Villiers (Villiers, 1891) obtient à partir des produits de dégradation d'un kilogramme d'amidon par la bactérie *Bacillus macerans,* trois grammes de substance cristalline. Ce fut la première fois que des cyclodextrines furent isolées. Les cyclodextrines (CD) sont des oligosaccharides cycliques qui furent appelées crystalline dextrine, α-dextrine, β-dextrine, dextrines de Shardinger, cyclo-amyloses, cyclo-malto-oligosaccharides, cyclo-oligoglucanes... Actuellement, le terme cyclodextrine reste le plus utilisé.

3.1 Définition, structure et nomenclature

Les CDs sont composées de sous-unités glucopyranoses liées en α-(1,4). Trois familles de CD naturelles sont principalement utilisées ou étudiées les α-, β- et γ-CD formées de 6, 7 ou 8 sous-unités glucose respectivement (Figure 13) (des familles de plusieurs dizaines de sous-unités ont été synthétisées pour la recherche).

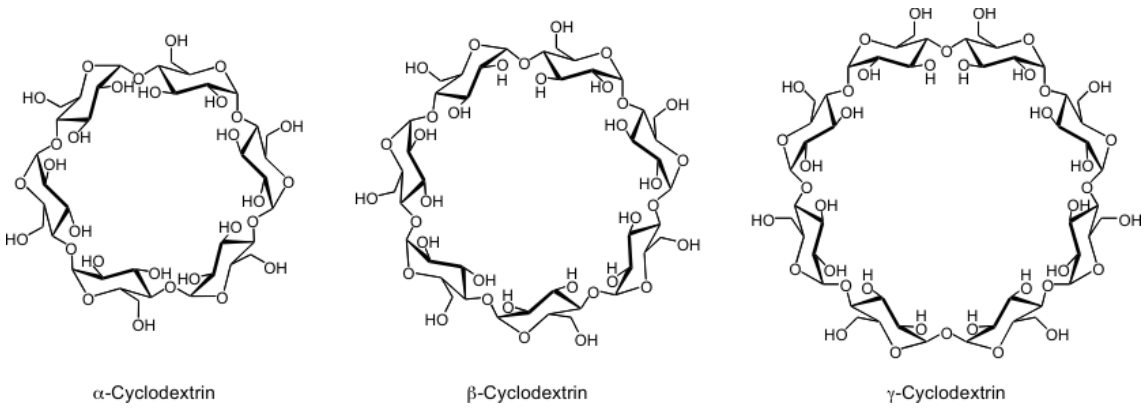


Figure 13 : Structure plane des trois principales cyclodextrines natives (Szejtli, 1988)

Elles possèdent une structure en tronc de cône, délimitant une cavité en leur centre (Figure 14). Les paires d'électrons non liés, des ponts glucosidiques de l'oxygène, sont orientés sur l'intérieur de la cavité, produisant une densité électronique élevée. Cela rend l'intérieur de la cavité hydrophobe, permettant la formation de complexes d'inclusion avec des composés apolaires ou polaires comportant un motif hydrophobe.
Les protons glucosidiques H_3 et H_5 sont situés à l'intérieur du cône, alors que les protons H_1, H_2 H_4 et H_6 sont dirigés vers l'extérieur.

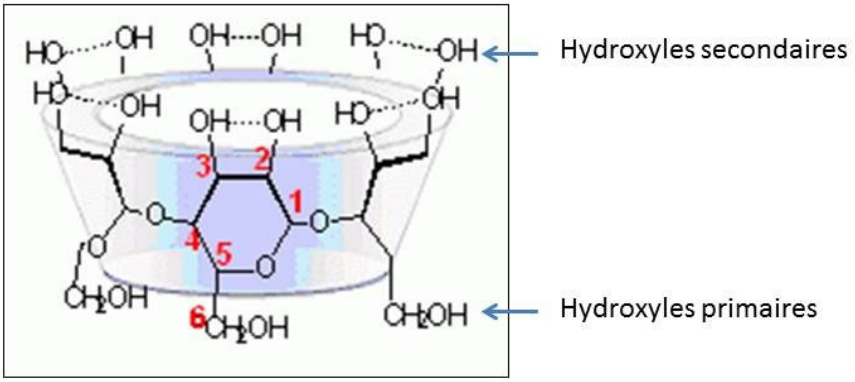


Figure 14 : Règle de numérotation des carbones sur une cyclodextrine (ici α-CD)

Grâce à la conformation de l'unité glucopyranose, tous les groupements hydroxyles secondaires sont situés sur un des deux bords du tronc de cône, ils bordent l'entrée de la cavité tandis que tous les hydroxyles primaires sont sur l'autre bord. Ils sont plus rapprochés et plus flexibles, ils obstruent partiellement cet accès à la cavité.
Les groupements hydroxyles des unités glucopyranoses peuvent être aminés, estérifiés ou éthérifiés et conduire à de nombreux dérivés. La synthèse de ces dérivés a souvent pour but d'améliorer la solubilité des CD naturelles.

Les molécules de CD chimiquement modifiées ont des masses molaires moyennes correspondant à des indices moyens de substitution (Tableau I).

Tableau I : Propriétés physicochimiques et monographies à la pharmacopée des cyclodextrines entrant dans la composition de produits pharmaceutiques commercialisés.

CD	Nombre de substituants par sous unité glucose	Masse Moléculaire (g/mol)	Solubilité dans l'eau (g/L)	Pharmacopée		
				Europe	USA	Japon
α-CD	-	972	145	Oui	Non	Oui
β-CD	-	1135	18,5	Oui	Oui	Oui
HP β-CD	0,65	1400	>600	Oui	Oui	Non
RAMEB	1,8	1312	>500	Non	Non	Non
SBE β-CD	0,9	2163	>500	Non	Non	Non
γ-CD		1297	232	En cours	Oui	Oui
HP γ-CD	0,6	1576	>500	Non	Non	Non

Parmi les cyclodextrines les plus étudiées on trouve la β-cyclodextrine (β-CD), l'hydroxypropyl-β-cyclodextrine (HP-β-CD) et la méthyl-β-cyclodextrine (M-β-CD).

3.2 Propriétés physico-chimiques des cyclodextrines

3.2.1 Cyclodextrines naturelles

Le Tableau I donne les caractéristiques des cyclodextrines α, β et γ.
Les groupements hydroxyles des CDs naturelles, conduisent à une bonne solubilité qui est cependant fortement variable selon les composés. Ainsi la β-CD est près de dix fois moins soluble que l'α-CD ou la γ-CD.
La formation de complexe suppose une bonne adéquation entre la taille de la molécule hôte et celle de la CD. L'intérieur de la cavité apporte un micro-environnement lipophile dans lequel peuvent se placer des molécules non polaires. La principale force provoquant la formation de ces complexes est la stabilisation énergétique du système par le remplacement dans la cavité de molécules d'eau à haute enthalpie, par des molécules hydrophobes qui créent des associations apolaires-apolaires. Ces molécules hôtes sont en équilibre dynamique entre leur état libre et complexé. La résultante de cette complexation est la solubilisation de molécules hydrophobes très insolubles dans la phase aqueuse (la polarité de la cavité est comparable à celle d'une solution aqueuse d'éthanol) (Hedges, 1998).

Ainsi les macrocycles polyfonctionnels biocompatibles et non immunogènes que sont les CDs sont d'un intérêt majeur car ils combinent les rôles de transporteur supramoléculaire et de support pour la présentation du ligand.

Afin de diminuer la toxicité, d'améliorer la solubilité et le coût de fabrication, et pour la recherche et le développement d'applications thérapeutiques plus ciblées, de nombreux dérivés de CDs ont été élaborés.

3.2.2 Cyclodextrines modifiées

Les modifications chimiques des CD naturelles concernent les groupements hydroxyles qui sont substitués en nombre variable selon le type de CDs natives. La quantité de positions substituables est égale au nombre d'unités glucose présentes dans la molécule

de CD (7 par exemple pour la β-CD) multiplié par 3 (soit le nombre d'hydroxyles par unité de glucose). Ainsi, pour la β-CD le nombre d'isomères possibles est de 50 388 après substitution de la moitié des hydroxyles.

Actuellement, la recherche pharmaceutique se focalise sur l'élaboration de CDs modifiées en vue du ciblage d'actifs thérapeutiques (Kulkarni *et al.*, 2012). Ainsi, les CDs de dernière génération sont plus particulièrement synthétisées pour s'adapter à la structure de l'hôte et à la reconnaissance cellulaire. L'importance des interactions sucre-protéine n'est plus à démontrer, et leurs implications dans de nombreux processus tant physiologiques (embryogénèse,…) que pathologiques, tels que les infections bactériennes et virales, l'inflammation ou les mécanismes métastasiques, sont bien connues.

Le greffage de ligands saccharidiques multivalents reconnus par des protéines membranaires permet le transport et l'adressage de molécules actives vers des récepteurs spécifiques et contrôle les interactions cellulaires. Les ligands saccharidiques greffés, pouvant reconnaître des motifs lectines membranaires, sont la concanavaline A et des glycodendrons mannosylés (Gomez-Garcia *et al.*, 2005 ; Oda *et al.*, 2008). Des ligands de même nature ont été greffés à des cyclodextrines dans le but de vectoriser des oligo-nucléotides antisens à visées antivirales (Abdou *et al.*, 1997).

Cependant, les interactions ligand glucidique-récepteur protéique sont trop faibles pour être efficaces. Des interactions identiques existent dans la nature, mais elles sont toujours multiples ce qui compense leur fragilité unitaire. Aussi la création de structures dendritiques permet d'optimiser l'interaction ligand-récepteur en augmentant leur nombre.

Le greffage de structures sulfatées ou fluorées permet aussi d'observer des phénomènes d'auto-organisation de cyclodextrines en nanoparticules capables d'encapsuler des molécules hydrophobes comme l'aciclovir ou la caféine par exemple (Parrot-Lopez *et al.*, 2010).

Il est à noter que dans le cas de cyclodextrines « branchées » (Figure 15), un complexe avec deux invités peut se former :

- un invité interagissant avec la cavité, et ;
- un invité interagissant avec les bras greffés sur la couronne de la cyclodextrine.

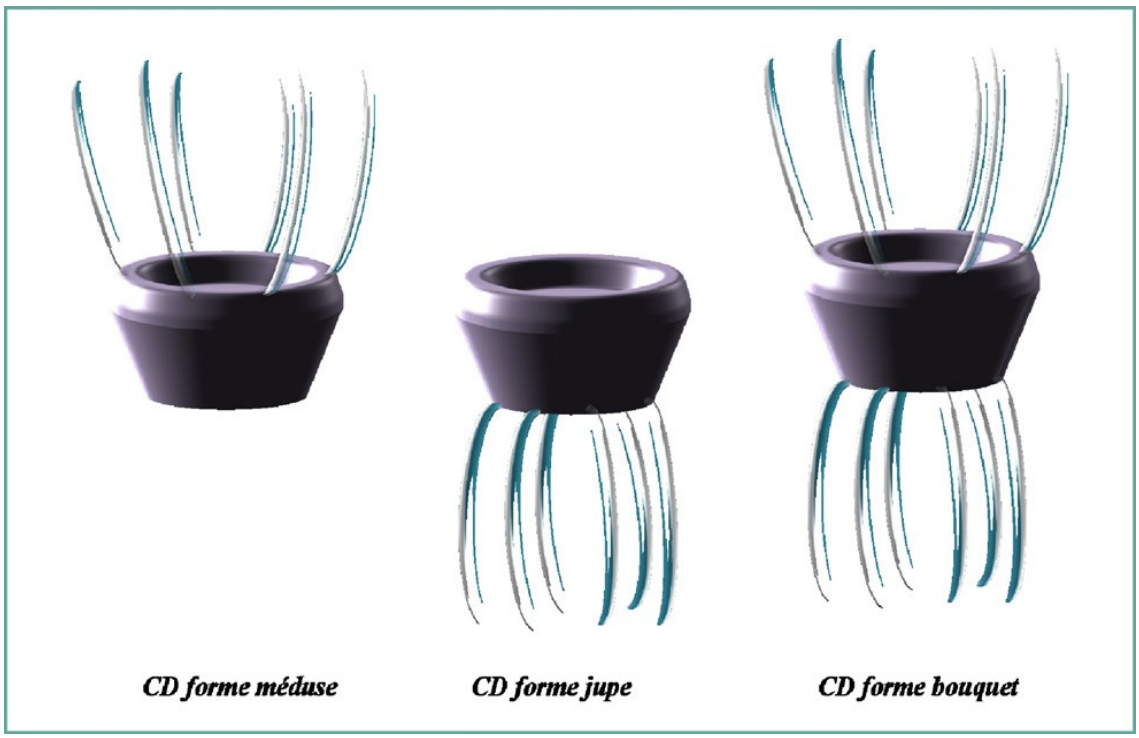


Figure 15 : différentes formes possibles de position de fonctionnalisation des cyclodextrines (Parrot-Lopez *et al.*, 2010)

Les CDs dendritiques sont des structures arborescentes construites à partir d'une unité centrale multifonctionnelle et se terminant par de multiples groupes réactifs périphériques, tels que des ligands D-galactose.

Le ciblage thérapeutique est particulièrement recherché dans le cas de molécules anticancéreuses dont les effets délétères sur les cellules saines sont difficilement contrôlables. Un exemple d'adressage utilisant la reconnaissance ligand-protéine membranaire: la complexation de la doxorubicine, molécule anticancéreuse avec une β-CD branchée avec un D-galactose est un modèle qui peut transporter spécifiquement cette molécule active aux cellules contenant des lectines se liant avec le D-galactose (Oda *et al.*, 2008).

Actuellement ce type d'adressage continue à se développer avec, par exemple, le cas de nanoparticules d'HP-β-CD mélangées à un polymère greffé avec un peptide cRGD (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys) capable de cibler spécifiquement les intégrines αvβ3 (intégrines responsables de la croissance tumorale et de l'angiogenèse qui lui est associée) (Miao *et al.*, 2012).

3.3 Toxicité des cyclodextrines

Les cyclodextrines natives et leurs dérivés hydrophiles traversent difficilement les barrières biologiques lipophiles. Les dérivés lipophiles de la bêta-cyclodextrine, même s'ils interagissent plus avec les membranes, ne les traversent pas plus (Del Valle, 2004).

Lors d'étude avec des molécules marquées au ^{14}C, il a été montré que le métabolisme humain dégradait les CD en maltose, glucose et CO_2 lors de l'absorption par voie orale mais qu'elles étaient rapidement excrétées dans les urines lors d'injection par voie intra-veineuse (Kondo *et al.*, 1990 ; Marshall et Miwa, 1981).

3.3.1 Toxicité cellulaire

La cytotoxicité des CDs est fortement liée à leurs interactions avec la membrane plasmique des cellules. Cela reste principalement en rapport avec la capacité des CDs à faire des trous dans les membranes biologiques par extraction des molécules de cholestérol (Irie *et al.*, 1982). Les CD sont connues pour induire des changements de forme dans la membrane des érythrocytes humains et, à plus forte concentration, une lyse. Si l'implication toxicologique *in vivo* des CDs natives reste négligeable (Stella et He, 2008), l'activité hémolytique induite par les cyclodextrines modifiées peut être classée ainsi : DM-β-CD> HP- β -CD > HP- γ-CD > HP- α-CD> S- β -CD (Stella et He, 2008 ; Uekama, 2004). Les dérivés méthylés augmentent l'hémolyse par diminution des effets de répulsion électrostatique avec la membrane porteuse de charges similaires.

Avec un modèle de culture cellulaire *in vitro*, des effets inflammatoires et cytotoxiques sont mesurables avec une concentration de RAMEB (Randomly Methylated β−CD) de 10% ($^{m}/_{v}$), alors que 2 et 5% ($^{m}/_{v}$) n'induisent aucune lésion tissulaire même après 5 jours d'expositions répétées (Boulmedarat *et al.*, 2005).

En revanche, Ulloth *et coll.* ont montré une toxicité significative (induction d'apoptose) à des doses moins importantes (0,25% ($^{m}/_{v}$) de β-CD méthylée) sur des cellules nerveuses différenciées (Ulloth *et al.*, 2007).

Enfin Hipler *et coll.* ont montré sur des cellules HaCaT que la β-CD et ses dérivés méthylés ne devraient pas, au vu de leur propriété antiproliférative, être utilisés pour des applications cutanées à des concentrations supérieures à 1% ($^{m}/_{v}$) (Hipler *et al.*, 2007).

Ces études *in vitro*, de lyse cellulaire, ne reflètent pas la toxicité *in vivo* mais permettent seulement de classer les CD selon leur potentiel de déstabilisation des membranes cellulaires.

3.3.2 Toxicité orale

Toutes les études ont montré que la toxicité orale des CDs est presque nulle car elles ne sont pas absorbées au niveau du tractus digestif. Seule une portion négligeable des CDs hydrophiles et des complexes molécule/cyclodextrine sont capables de traverser une membrane comme la muqueuse gastro-intestinale (Irie et Uekama, 1997). Après administration par voie orale, peu d'effets secondaires systémiques sont attribuables aux CDs elles-mêmes, en raison de leur faible diffusion dans la circulation générale. Ainsi, chez l'homme, la dose orale journalière tolérée de ces macrocycles est de : 1,4 g pour α-CD ; 0,35 g pour la β-CD ; 10 g pour la γ-CD (Stella et He, 2008).

3.3.2.1 **Alpha-cyclodextrine**

Des études, d'une durée de 13 jours, ont été menées chez le rat et chez le chien. Des doses de 13,9 g/Kg par jour ont pu être administrées à des rats femelles (12,6 g/Kg/J. chez le male) sans observer d'autres effets physiologiques que ceux provoqués habituellement par l'absorption de grandes quantités de carbohydrates non digestibles (Lina et Bär, 2004). La même équipe a montré que ces doses pouvaient être de 10,4 g/Kg/j. pour la chienne et de 9,8 g/Kg/j. pour le chien, avec l'observation des mêmes phénomènes physiologiques (Lina et Bär, 2004).

3.3.2.2 **Bêta-cyclodextrine**

Cette molécule ne diffuse quasiment pas à travers les membranes biologiques et n'est pas résorbée lors du transit intestinal (DL50 orale, rat 18 800 mg/kg), d'après la fiche de données de sécurité de Sigma. Ainsi dans un rapport, l'OMS (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting (40th : 1992 : Geneva Switzerland), 1993 ; Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting (44th : 1995 : Rome Italy) et Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives., 1995), donnait chez l'homme, une Dose Journalière Admissible de 5 mg par Kg de masse corporelle, fondée

sur une dose sans effet nocif (No Observed Effect Level /NOEL) de 1,25% ($^{m}/_{m}$) dans le régime alimentaire chez le chien.

La FDA (Food and Drug Agency – United Kingdom) autorise son utilisation comme additif alimentaire humain à hauteur de 0,5 à 2% ($^{m}/_{m}$) selon les produits. La β-CD est ainsi utilisée dans l'industrie agro-alimentaire comme additif alimentaire (E459).

Les CDs peuvent entraîner des effets secondaires systémiques, notamment la β-CD, par une augmentation de l'élimination de certains nutriments. En effet, en se complexant avec les nutriments, ceux-ci ne sont pas absorbés par la muqueuse intestinale et ne se retrouvent pas dans le sang. D'autre part, la complexation en tout ou partie des acides biliaires par la β-CD au niveau intestinal limite l'efficacité de ceux-ci et donc l'assimilation des nutriments (Stella et Rajewski, 1997).

3.3.2.3 **Gamma-cyclodextrine**

La tolérance, chez l'homme, est grande quand la γ-CD est administrée par voie orale (excepté les désagréments liés à l'absorption de substance peu digeste comme les flatulences).

3.3.2.4 **Hydroxy propyl bêta-cyclodextrine**

L'HP-β-CD est plus soluble et moins toxique que la molécule native. Elle est incluse dans de nombreuses spécialités commercialisées, à un dosage supérieur à 8 g HP-β-CD/j. par voie orale, (Gould et Scott, 2005). Elle est bien tolérée chez l'homme. Une diarrhée peut toutefois apparaître avec un traitement de 14 jours, à des doses de 16 à 24 g HP-β-CD/j. (Brewster *et al.*, 2007). La biodisponibilité orale de l'HP-β-CD est de 0,5 à 3,3% chez l'homme, avec 50 à 65% de la dose orale excrétée sans dégradation dans les selles, le restant étant métabolisé par la flore intestinale.

3.3.2.5 **Randomly Methylated bêta-cyclodextrine**

La biodisponibilité orale de la RAMEB (Randomly Methylated β−CD) est environ de 5% chez le rat, et plus de 90% de la molécule sont excrétés sans modification de structure dans les selles (Wacker, 2012) (pour Cavasol® W7 M pharma).

3.3.3 Toxicité par voie parentérale

La γ-CD, les HP-β-CDs, sulphobutylether-β-CD, maltosyl-β-CD et les β-CD sulfatées sont suffisamment sûres pour être administrées par voie parentérale (Del Valle, 2004).

Le principal effet secondaire des CDs administrées par voie parentérale est la néphrotoxicité sachant que le rein est le seul organe contribuant à l'élimination des CDs de la circulation systémique (Irie et Uekama, 1997).

La toxicité rénale observée avec la β-CD, en particulier après administration parentérale, a été un des moteurs du développement des CDs modifiées. Les CDs ont été greffées dans le but d'augmenter la solubilité dans l'eau et ainsi diminuer leur toxicité rénale.

3.3.3.1 **Gamma-cyclodextrine**

Pour la γ-CD, les études de toxicité sont assez nombreuses et variées. L'ensemble de ces résultats ont été repris en 2004 par I.C. Munro *et coll.* dans une revue (Munro *et al.*, 2004). Ces études concluent toutes à une absence de danger quel que soit le mode d'administration. Cependant, d'autres études sont moins affirmatives lorsque la γ-CD est administrée par voie injectable. Ohtani met en évidence un impact sur la stabilité des érythrocytes (Ohtani *et al.*, 1989), mais, malgré cette mise en évidence, ces effets secondaires n'ont pas été encore étudiés de façon approfondie chez l'homme.

3.3.3.2 **Hydroxy propyl bêta-cyclodextrine**

Après injection intra-veineuse, l'HP-β-CD est presque totalement éliminée par filtration glomérulaire rénale. Ainsi, l'administration de cette molécule doit être évitée pour les patients présentant une insuffisance rénale sévère (Gould et Scott, 2005).

3.3.3.3 **Hydroxy propyl gamma-cyclodextrine**

Les études toxicologiques concernant l'HP-γ-CD sont plus rares. L'HP-γ-CD est déjà incorporée dans un produit de diagnostic parentéral (Cardio Tec®, Tc-99 teoboroxime), cependant malgré cette utilisation en thérapeutique, il n'y a pas à notre connaissance de donnés sur la toxicité de l'HP- γ-CD par voie parentérale dans la littérature.

3.3.3.4 **Autres cyclodextrines**

Certaines CDs modifiées, comme la diméthyl-β-CD, sont plus toxiques que les CDs natives dont elles sont dérivées (Stella et Rajewski, 1997). Les dérivés alkylés de l'α- et la β-CD, utilisés par voie entérale présentent une toxicité rénale non négligeable (Stella *et al.*, 1999). L'HP-β-CD et la sulfobutylether-β-CD apparaissent comme étant les plus sûres et sont utilisées pour une administration tant entérale que parentérale (Stella *et al.*, 1999).

La carboxyl-thioéther γ-CD ou sugammadex® est commercialisée en solutions injectables à la concentration de 100 mg/mL et utilisée à des doses allant jusqu'à 16 mg / kg chez l'homme pour la dé-curarisation (Bridion®).

Les CDs méthylées induisent des effets toxiques après une administration par voie parentérale (Irie et Uekama, 1997).

La toxicologie de la SBE-β-CD est peu étudiée, cependant des études montrent qu'elle est non toxique à des doses intraveineuses et orales modérées (Irie et Uekama, 1997). Cette molécule est déjà utilisée dans la formulation de certains médicaments tels que le voriconazole (VFEND®, poudre pour solution ou pour perfusion). Le voriconazole (10 mg/mL) est solubilisé dans une solution contenant 16% (m/v) de SBE-β-CD. Une accumulation de SBE-β-CD est constatée chez des patients dialysés traités par voriconazole solution pour perfusion. Cependant, aucun effet toxique n'est observé et les doses accumulées atteignent des valeurs inférieures à celles observées dans des études de toxicité chez l'animal (von Mach *et al.*, 2006).

Grâce à leur cavité apolaire, les cyclodextrines sont capables de former des complexes d'inclusion en milieu aqueux avec une grande variété de molécules-hôtes hydrophobes. Une ou plusieurs molécules hôtes peuvent être incluses dans une, deux ou trois CDs.

3.4 Les complexes de CDs

La possibilité de formation d'un complexe entre une CD et une molécule invitée dépend principalement des interactions qui peuvent se former entre ces deux molécules. Aucune liaison covalente n'est formée ou rompue durant la complexation. Le complexe existe si

des liaisons de type : interactions électrostatiques, interactions de Van der Walls, interactions hydrophobes, interactions de transfert de charge ont lieu entre CD et molécule invitée.

Ces complexes peuvent être :

- soit des complexes d'association si des interactions existent entre la molécule et la face externe de la CD. Citons pour exemple la riboflavine et les β-CD ou HP-β-CD (De Jesus *et al.*, 2012) ;
- soit des complexes d'inclusion si l'invité prend place à l'intérieur de la cavité de la CD, comme c'est le cas pour l'amoxicilline et la β-CD (Bisson-Boutelliez *et al.*, 2010)

La taille, l'encombrement stérique, la charge, la polarité de l'invité sont autant de paramètres importants pour la formation de complexes d'inclusion. Il existe une corrélation directe entre le caractère hydrophobe de la molécule et la stabilité du complexe formé (Szejtli, 1988).

La principale force provoquant la formation des complexes est la stabilisation énergétique du système qui s'accompagne de l'exclusion des molécules de solvants de la cavité de la CD par les molécules invitées hydrophobes, plus apolaires que le solvant qui créent des associations apolaires-apolaires (Del Valle, 2004 ; Liu et Guo, 2002).

Le processus de complexation est réversible : les molécules complexées sont en équilibre avec les molécules libres en solution. Cette inclusion peut être quantifiée par une constante d'équilibre (Figure 16) appelée constante de stabilité ou constante de formation du complexe (Kc, Kf ou Kn:m) (Brewster et Loftsson, 2007 ; Loftsson *et al.*, 2005).

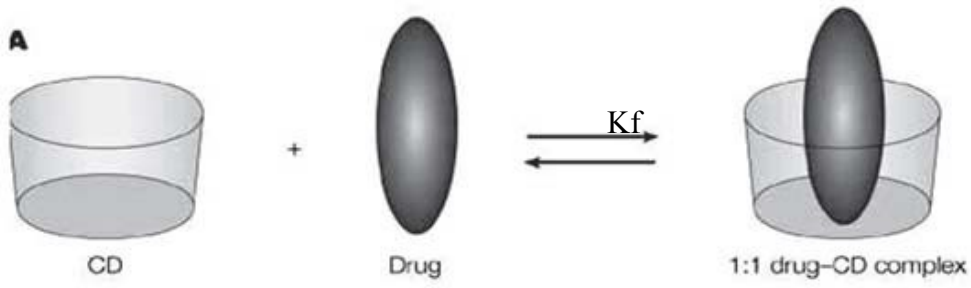


Figure 16 : Schématisation de l'équilibre de complexation (Palem *et al.*, 2009)

Le rapport moléculaire (nombre de molécule d'invité : nombre de molécule de CD) peut varier (Figure 17) et de nombreuses variations peuvent exister.

- Complexe 1 : 1 entre l'amoxicilline et la β-CD (Bisson-Boutelliez *et al.*, 2010)
- Complexe 1 : 2 entre le carvedilol et la β-CD (Wen *et al.*, 2004) ou un analogue de la curcumine et la β-CD (Dandawate *et al.*, 2012)
- Complexe 1 : 3 entre le 3H-indole et la β-CD (Shen *et al.*, 1998)
- Complexe 2 : 1entre le carmoful et l'α-CD (Kikuchi *et al.*, 1984)
- Complexe 2 : 2 entre la pyronine et la γ-CD (Schiller *et al.*, 1987)
- Complexe 3 : 2 entre l'ibuprofène et la β-CD (Chow et Karara, 1986)
- …

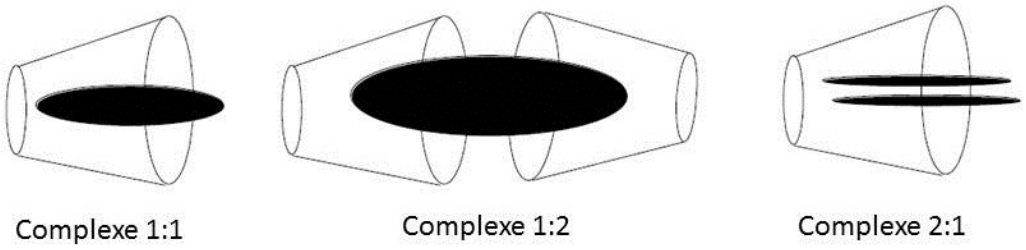


Figure 17 : Schématisation des différents types de complexe d'inclusion pouvant exister avec des CD d'après Bakkour (Bakkour, 2005)

3.5 Applications de la complexation en thérapeutiques

Les principes actifs contenus dans les médicaments sont souvent des molécules hydrophobes, ce qui peut poser des problèmes d'assimilation par différentes voies. (Loftsson *et al.*, 2007).

La solubilisation de principes actifs hydrophobes à l'échelle moléculaire par la formation de complexes d'inclusion dans la cavité des CDs est un bon moyen pour augmenter leur solubilité et leur biodisponibilité. De ce fait, les CDs sont utilisées comme excipient dans la formulation de médicaments (Brewster et Loftsson, 2007 ; Muppaneni *et al.*, 2012).

Les CDs permettent aussi de travailler sur la forme physique des médicaments en transformant des composés liquides en solides (poudres, comprimés). Ceci se fait soit en utilisant les CDs comme un simple excipient de mise en forme, soit par une vectorisation vraie et la précipitation de complexes d'inclusion.

La complexation des principes actifs photosensibles ou très réactifs permet souvent de les protéger ou de les stabiliser (Szejtli, 1997). Il est ainsi possible d'augmenter la stabilité d'une molécule vis-à-vis :

- de la lumière : l'avobenzone qui a la capacité de stopper les UV-A voit sa stabilité de filtration à ces UV-A augmentée lorsqu'il est complexé avec de l'HPβ-CD (Yang *et al.*, 2008) ;
- de la chaleur : la déshydrogénase complexée avec une α-CD présente une stabilité thermique améliorée et renforce sa stabilité structurale (Barzegar *et al.*, 2008) ;
- de l'oxygène et de l'hydrolyse alcaline et enzymatique : la doxorubicine complexée avec une HP-β-CD/ HP-γ-CD est plus résistante à la décomposition acide (Brewster *et al.*, 1992), du pH gastrique : la complexation avec une Sulfo-Butyl-Ester-bêta-cyclodextrine (SBE-β-CD) permet d'améliorer la stabilité de l'oméprazole (un inhibiteur de la pompe à proton) en pH acide (Agatonovic-Kustrin *et al.*, 2007).

La complexation d'actifs thérapeutiques a été appliquée à différentes voies d'administration.

3.5.1 Voie orale

La complexation avec HP-β-CD permet d'augmenter la solubilité du carvédilol (bêtabloquant) et de prolonger sa libération (Cappello *et al.*, 2006 ; Stuenkel *et al.*, 1991). C'est aussi le cas de nombreuses hormones dont l'androstenediol (Brown *et al.*, 2002).

3.5.2 Voie parentérale

Des drogues, dont les propriétés physico-chimiques contre indiquent l'injection parentérale, peuvent être délivrées par cette voie après association avec une CD modifiée hydrophile. Par exemple, la complexation de l'oméprazole avec HP-β-CD (40% m/v) permet de la rendre compatible avec une formulation parentérale (Holvoet *et al.*, 2007 ; Stevens, 1999).

3.5.3 Voie nasale

L'HP−β-CD multiplie par 3,5 la perméation de la buspirone (anxiolytique non benzodiazepinique) à travers la muqueuse nasale, sans entraîner de cytotoxicité (Khan *et al.*, 2008).

3.5.4 Voies locales

La complexation avec l'HP−β-CD de la puerarine, un agent bêtabloquant permet d'optimiser son absorption ophtalmique, en application topique (Wu *et al.*, 2007).

La complexation du meloxicam (anti-inflammatoire) avec la β-CD, dans une formulation liposomale, permet d'améliorer la libération transdermique de la molécule active (Jain *et al.*, 2008). C'est aussi le cas de l'hydroxy cortisone avec l'HP-β-CD (Loftson *et al.*, 2003)

La β-CD permet l'absorption de molécules peu hydrosolubles, et permet sa libération au niveau de la muqueuse sublinguale (Mannila *et al.*, 2007). Cette modification est la conséquence d'une meilleure perméabilité des muqueuses à la drogue dont la biodisponibilité est améliorée par complexation avec une CD.

3.5.5 Spécialités pharmaceutiques contenant des cyclodextrines

La liste des principes actifs dont la vectorisation par les CDs est ou a été envisagée s'accroit rapidement. Cependant, rares sont ceux qui passent du domaine de la recherche préclinique aux essais thérapeutiques. Nous pouvons citer quelques exemples comme :

- des peptides (Irie et Uekama, 1999)
- des antiviraux (Jeulin *et al.*, 2009)
- des anti-inflammatoires (Miro *et al.*, 2009 ; Nagarsenker *et al.*, 2008)
- des antibactériens (Bisson-Boutelliez *et al.*, 2010 ; Paulidou *et al.*, 2008 ; Tewes *et al.*, 2008)
- des oligo-nucléotides (Abdou *et al.*, 1997 ; Menuel *et al.*, 2007 ; Redenti *et al.*, 2001)
- des anticancéreux (Gil *et al.*, 2009).

La liste des spécialités pharmaceutiques contenant des CD, actuellement commercialisées en France reste limitée à une vingtaine de produits (
Tableau II).

Mais si l'on étend cette liste aux autres pays, elle s'accroit très rapidement (Tableau III) (Chinna Reddy *et al.*, 2012 ; Loftsson et Duchene, 2007 ; Szejtli, 2004).

Tableau II : Liste des spécialités pharmaceutiques contenant des CD et commercialisées en France.
(source banque Claude Bernard : http://www.resip.fr/login.asp?code=3)

Nom	Principe actif	Classe médicamenteuse	CD	Date d'AMM	Date de suppression
CAVERJECTDUAL Poudre pour solution injectable	Alprostadil	Stimulant de l'érection	α-CD	04/09/2001	
EDEX Poudre pour solution injectable	Alprostadil	Stimulant de l'érection	α-CD	16/04/1997	
TAKETIAM Comprimé pelliculé	Céfotiam	Antibactérien	α-CD	31/08/1992	
TEXODIL Comprimé pelliculé	Céfotiam	Antibactérien	α-CD	31/08/1992	
ALAIRGIX Comprimé à sucer	Cétirizine	Antihistaminiques	β-CD	14/03/2005	
BORIBEL N°13 Mélange de plantes pour tisane	Bourdaine, Séné, Guimauve, Mauve	Laxatifs	β-CD	05/02/1996	27/02/2008
BREXIN Comprimé effervescent	Piroxicam β-CD complexe	AINS	β-CD	25/11/1998	
CALPRIMUM 500 Comprimé croquer	Carbonate de calcium	Apport minéral	β-CD	22/12/1996	
CETIRIZINE EG Comprimé à sucer	Cétirizine	Antihistaminiques	β-CD	24/11/2005	
CYCLADOL Comprimé effervescent	Piroxicam β-CD complexe	AINS	β-CD	25/11/1998	
JASMINELLE Comprimé pelliculé	Ethinylestradiol β-CD complexe Drospirénone	Oestroprogestatif	β-CD	10/07/2006	
NICORETTE MICROTAB 2 mg Comprimé sublingual	Nicotine β-CD complexe	Désintoxication tabagique	β-CD	13/01/1999	26/09/2008
PRAMIPEXOLE EG Comprimé	Pramipexole	Antiperkinsonien	β-CD	01/04/2009	
RHINATHIOL TOUX SECHE Gel oral	Dextromethorphane	Antitussif	β-CD		01/02/2003

Nom	Principe actif	Classe médicamenteuse	CD	Date d'AMM	Date de suppression
TRUE TEST Dispositif transdermique ---------- Dispositif pour application cutanée	Amylcinnamaldéhyde alpha, Isoeugénol, Cinnamaldéhyde, Eugénol, Cinnamique alcool, Hydroxycitronellal, Géraniol, mousse de Chêne	Allergènes	β-CD	21/07/1995	---------- 07/04/2010
VITASEPTOL Collyre	Thiomersal	Antiseptique ophtalmique	β-CD	31/03/1992	04/07/2008
ALOPEXY 2 % Solution cutanée	Minoxidil	Anti alopécique	γ-CD	16/12/1987	16/11/2006
ALLERGIFLASH Collyre	Lévocabastine	Antiallergiques ophtalmiques	HP-β-CD	22/01/2010	
INDOBIOTIC Collyre	Indométacine Gentamicine	AINS et anti-infectieux	HP-β-CD	25/05/1999	
INDOCOLLYRE Collyre	Indométacine	AINS ophtalmiques	HP-β-CD	22/10/1996	
LEVOFREE Collyre	Lévocabastine	Autres antiallergique	HP-β-CD	18/03/2010	
PERINDOPRIL/INDAPAMIDE SANDOZ Comprimé	Périndopril Indapamide	IEC et diurétique	HP-β-CD	16/08/2010	
PERINDOPRIL SANDOZ Comprimé	Périndopril	IEC	HP-β-CD	07/04/2008	
SPORANOX Solution pour perfusion IV	Itraconazole	Antimycosique systémique	HP-β-CD	20/08/2004	08/08/2011
SPORANOX Solution buvable	Itraconazole	Antimycosique systémique	HP-β-CD	30/12/1997	
AERODIOL Solution nasale	Oestradiol		Méthyl β-CD		26/04/2007
VFEND Poudre pour solution pour perfusion IV	Voriconazole	Antimycosiques systémique	SBE - β-CD	19/03/2002	
ABILIFY Solution injectable	Aripiprazole	Antipsychotiques	SBE - β-CD	04/10/2006	
BRIDION Solution injectable	Sugammadex	Antidotes	Carboxyl-thioéther- γ-CD	25/07/2008	

Tableau III : Exemples de spécialités pharmaceutiques contenant des CD et commercialisées à l'étranger (Chinna Reddy *et al.*, 2012).

Nom	Principe actif	cyclodextrine	Pays
Prostavastin, Rigidur Injectable I.V.	Alprostadil (PGE1)	α-CD	Japan, Europe (hors France), USA
Opalmon Comprimé	OP-1206	α-CD	Japan
Pansporin T Comprimé	Cefotiamhexetil HCl	α-CD	Japan
Ulgut, Lonmiel Gélule	Benexate HCl	β-CD	Japan
Meiact Comprimé	Cephalosporin(ME1 207)	β-CD	Japan
Transillium Comprimé	Chlordiazepoxide	β-CD	Argentina
Glymesason Pommade	Dexamethasone	β-CD	Japan
Stada-Travel, Gomme à macher	Diphenhydramine HCl	β-CD	Europe (hors France)
Nicorette Nicogum Gomme à macher	Nicotine	β-CD	Europe (hors France)
Nimedex Comprimé	Nimesulide	β-CD	Europe (hors France)
Nitropen Comprimé à sucer	Nitroglycerine	β-CD	Japan (hors France)
Propulsid Suppositoire	Cisapride	HP-β CD	Europe (hors France)
Sporanox Solution orale et I.V.	Itraconazole	HP-β CD	Europe, USA
Mitozytrex Injectable I.V.	Mitomycine	HP-β CD	Europe (hors France), USA
Clorocil Collyre	Chloramphénicol	Methyl β-CD	
Aerodiol Spray nasal	17β-Estradiol	Methyl β-CD	Europe (hors France)
Vfend Injectable I.V.	Voriconazole	SBE-β-CD	Europe, USA
Geodon, Zeldox Injectable I.M.	Ziprasidone mesylate	SBE-β-CD	Europe, USA
Voltaren Collyre	Diclofenac sodium	HP-γ-CD	Europe
Cardiotec Injectable I.V.	Tc-99 Teoboroxime	HP-γ-CD	USA

3.6 Autres utilisations des cyclodextrines

3.6.1 Utilisation en agroalimentaire

L'industrie agroalimentaire se sert communément (et depuis plus de 20 ans au Japon) des CDs comme exhausteur de goût en permettant un ajout facile de composés gustatifs ou pour fixer des molécules trop volatiles et prolonger par exemple la durée gustative des chewing-gums (Szejtli et Szente, 2005). Elles sont aussi utilisées pour enlever certaines molécules indésirables, notamment pour réduire les quantités de cholestérol ou pour masquer le gout de composés amers des plats cuisinés. Les CD sont aussi employées pour stabiliser des émulsions comme la mayonnaise ou même les margarines (Szejtli, 2004). Elles sont aussi capables de modifier l'élasticité des pâtes alimentaires (Fujishima *et al.*, 2001), et permettent la production de dérivés laitiers sans graisse par extraction du cholestérol (Alonso *et al.*, 2009).

A noter que les CDs sont considérées comme des additifs. Elles ne possèdent pas de contre-indication ou de risque potentiellement dangereux dans ce contexte. L'α-CD a le numéro E-457, la β-CD le E-459 et la γ-CD le E-458. Aucun autre type de CD n'est mentionné dans le tableau des excipients alimentaires.

L'AFSSA, dans sa saisine en date du 23 novembre 2001(AFSSA, 23 novembre 2001) donne son appréciation de la mise sur le marché de γ-CD dans le cadre du règlement relatif aux nouveaux aliments. Ce texte stipule l'innocuité alimentaire de la γ-CD, établit que la consommation moyenne est de 4,3g/jour sur la base des habitudes alimentaires nord-américaines et que cette molécule est complétement métabolisée par l'organisme en maltose, glucose et CO_2. Quelques points d'attention sont soulignés quant à la vérification de l'innocuité du procédé de production (présence de cyclodextrine glycosyltransférase (CGTase) et de métaux lourds) et de la qualité microbiologique de cette production. Aucune dose journalière admissible (DJA) n'est établie.

La FDA (US), dans sa notice n° GRN 000046, datée du 22 septembre 2000, propose une bibliographie reprenant le catabolisme des CDs et les différents types de toxicités (cyto, géno etc…). De ces données de toxicité, cette notice définit pour différents types d'aliments le pourcentage maximum de CDs utilisable en fonction du type de CD et du type d'aliment (céréales, gomme à mâcher…).

3.6.2 Utilisation en chimie analytique

Les CDs sont de plus en plus utilisées en Chimie Analytique, notamment en CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance), comme greffe sur la phase stationnaire (silice en général). L'emploi de CDs permet de changer l'affinité des composés à analyser pour la phase stationnaire, et donc de modifier leur temps de rétention. Une application remarquable est liée à l'énantioséléctivité des systèmes chromatographiques greffés avec des CDs (Chen *et al.*, 2008).

Une autre propriété remarquable des CDs est qu'en complexant certaines molécules photosensibles, elles exaltent leur capacité de réponse à l'excitation notamment en fluorimétrie (Maragos *et al.*, 2008).

3.6.3 Utilisation pour la dépollution des sols

Les CDs présentent de bonnes caractéristiques pour être utilisées pour la dépollution des sols (Wan *et al.*, 2009). Ces molécules peuvent être considérées comme éco-compatibles et se dégradent dans le milieu naturel. Toutefois les CDs naturelles se dégradent plus facilement que les CDs modifiées : 82% de biodégradation de la β-CD en 28 jours mais seulement 9% pour l'HP-β-CD et 9% pour la M-β-CD et ce, dans le même laps de temps.

Elles permettent aussi le traitement des eaux par encapsulation et adsorption des contaminants (Allabashi *et al.*, 2007).

3.6.4 Utilisation diverses

- Désodorisant : les cyclodextrines sont utilisées comme agent masquant des mauvaises odeurs ou des saveurs désagréables (Szejtli et Szente, 2005).
- Agroalimentaire : elle stabilise des arômes comme la vanilline (Kayaci et Uyar, 2012)
- Cosmétique : elles permettent de stabiliser des émulsions et les molécules odorantes ou actives (Scalia *et al.*, 2007) ;
- Textiles spéciaux : elles sont utilisées pour fixer des molécules actives, dont des antibactériens, à des tissus (El Ghoul *et al.*, 2008 ; Rukmani et Sundrarajan, 2012).

- Prothèses : greffage de CDs afin d'y inclure un traitement antibactérien par la suite (Blanchemain *et al.*, 2008).
- Catalyseur de réactions chimiques : en Chimie Organique, elles permettent de contrôler la régio-sélectivité de certaines réactions tout en améliorant le rendement, et permettent de travailler avec des molécules hydrophobes en milieu aqueux. Elles sont aussi souvent utilisées pour l´élaboration d´enzymes artificielles ou plus précisément de mimes enzymatiques (Lanza et Vecchio, 2009).

3.7 Les complexes cyclodextriniques

3.7.1 Préparation des complexes

3.7.1.1 **En milieu liquide**

3.7.1.1.1 Co-précipitation

Cette méthode est la plus utilisée. Après dissolution de la CD dans de l'eau sous agitation, la molécule invitée est ajoutée. La concentration de la β-CD peut atteindre jusqu'à 20% (m/v) si l'invité tolère des températures élevées. Le précipité formé peut être collecté par décantation, centrifugation ou filtration. Le précipité peut être lavé avec un peu d'eau ou tout autre solvant miscible à l'eau tel que l'alcool éthylique, le méthanol et l'acétone. Le principal inconvénient de cette technique est lié au volume de liquide à utiliser. Du fait de la solubilité limitée de la CD en phase aqueuse, de grandes quantités d'eau sont nécessaires. La formation de complexe solide ou semi-solide peut être optimisée par l'utilisation d'additifs tels que l'éthanol, et pour les drogues basiques par l'adjonction d'ammonium. Les substances actives non ionisées forment des complexes avec les CD plus stables que leurs homologues ionisés. Selon la quantité d'eau utilisée pour former le complexe, on obtient un co-précipité, un « slurry » (pâte visqueuse) ou une pâte solide.

3.7.1.1.2 Extrusion

La CD, la molécule invitée et l'eau sont mélangés au fur et à mesure dans l'extrudeuse. Le degré de dispersion, la température de chauffe, la vitesse d'agitation et le temps peuvent être contrôlés dans la cuve de l'extruder. Selon la quantité d'eau initiale, le complexe extrudé peut sécher en refroidissant ou dans un four. Du fait de la température

générée, certaines molécules invitées labiles à la chaleur sont décomposées par cette méthode. Toutefois, cette technique présente l'intérêt d'être un processus continu et d'utiliser peu d'eau (Del Valle, 2004).

3.7.1.1.3 Séchage des complexes

Le séchage des complexes peut être effectué par plusieurs méthodes : par séchage dans un four, ou dans des dessiccateurs, en évitant de détruire le complexe, ou encore par lyophilisation (Asbahr *et al.*, 2009).

3.7.1.2 **En milieu solide**

Certaines molécules invitées peuvent être complexées par simple mélange des deux poudres ensembles. Le temps de mélange nécessaire dépend de l'invité. Généralement, ce protocole est réalisé à température ambiante. Son principal avantage est de ne pas utiliser d'eau, sauf pour le rinçage, et ses inconvénients sont le risque de formation de croûtes des poudres, et l'obtention d'un mélange incomplet conduisant à une complexation insuffisante (Del Valle, 2004).

3.7.2 Caractérisation des complexes

Les analyses effectuées afin de mettre en évidence l'existence d'un complexe d'inclusion en solution se fondent sur les modifications des caractéristiques physico-chimiques de la substance complexée ou de la CD. Toute méthode capable de mettre en évidence un changement : de solubilité, de la rétention en chromatographie, de l'absorbance, des déplacements chimiques des protons en RMN, des accidents thermiques en thermo-analyse peut être utilisée. Ne seront développées ici que les méthodes utilisées dans ce travail à savoir la CLHP, la RMN et l'ACD.

3.7.2.1 **En solution**

3.7.2.1.1 Chromatographie Liquide à Haute Performance

La chromatographie liquide haute performance (CLHP), outre qu'elle soit une méthode d'analyse très sensible permettant de doser une quantité infime de molécules chimiques en solution, peut être utilisée pour la détermination de la constante de stabilité (Kc) des complexes (De Melo *et al.*, 2008). En effet, Uekama *et coll.* ont observé que le temps de

rétention des acides et des bases faibles diminue significativement par addition d'α ou de β-CD dans la phase mobile (tampon phosphate), la phase stationnaire étant une phase échangeuse d'ions (Uekama *et al.*, 1978). La mesure des temps de rétention, eux-mêmes directement proportionnels aux rapports de distribution des concentrations entre la phase stationnaire et la phase mobile, permet d'accéder à la valeur de Kc. S'appuyant sur cette observation, Loftsson et Brewster ont montré l'intérêt de la CLHP pour déterminer la valeur de la constante de stabilité des complexes de CD (Loftsson et Brewster, 1996). Dans ce but, la CD est introduite dans la phase mobile, à différentes concentrations, et la molécule étudiée constitue le soluté de l'échantillon injecté. Les valeurs du facteur de rétention, obtenues pour ce soluté, permettent alors de déterminer s'il y a formation d'un complexe, de déterminer la stœchiométrie du complexe formé ainsi que la valeur de la constante de stabilité de ce complexe (Bielejewska *et al.*, 2002 ; De Melo *et al.*, 2008 ; Moeder *et al.*, 1996).

3.7.2.1.2 La Résonance Magnétique Nucléaire

La résonance magnétique nucléaire (RMN) permet de déterminer la structure tridimensionnelle de molécules organiques en solution. Cette technique est fondée sur l'absorption d'énergie par certains noyaux atomiques lorsqu'une molécule est placée dans un champ magnétique. Cette absorption se traduit par une rotation autour de l'axe nucléaire du noyau chargé ; ce spin nucléaire est à l'origine du signal RMN.

Les spectres de RMN sont indispensables pour affirmer l'inclusion d'une molécule dans une CD. Pour cela, il est possible de réaliser le spectre du proton (H^1 RMN) qui renseigne sur la direction de pénétration de la molécule invitée dans la cavité de la CD par identification de la position de ses protons.

Lorsqu'il y a un complexe, les variations de la densité électronique autour de certains noyaux causent leur blindage ou déblindage par rapport au champ magnétique externe. Un déplacement de certains pics est observé : les pics des atomes d'hydrogène intervenant dans des liaisons faibles révèlent alors un phénomène de blindage ou déblindage selon qu'ils se déplacent respectivement vers des champs faibles ou des champs forts. Ainsi, les hydrogènes H_3 et H_5, situés à l'intérieur de la cavité, subissent un phénomène de déblindage lors de l'interaction avec la molécule invitée, uniquement lorsqu'il y a formation d'un complexe d'inclusion.

Cette méthode permet donc de visualiser les déplacements des bandes de résonance des protons internes de la CD (H_3, H_5) en cas d'inclusion d'une molécule, alors que les

protons externes restent peu affectés (H_1, H_2, H_4, H_6). De même sont étudiées toutes les modifications de bandes de résonance des protons de la molécule invitée afin de déterminer les atomes interagissant avec la CD.

3.7.2.2 **En milieu solide**

3.7.2.2.1 Méthode thermo-analytique : analyse calorimétrique différentielle (ACD)

L'analyse calorimétrique différentielle permet d'observer des « accidents thermiques » (endo- ou exothermiques) caractéristiques d'un produit ou d'un mélange de produits en fonction de la température. Les spectres d'une molécule en calorimétrie différentielle présentent des accidents thermiques caractéristiques en fonction de la température représentant le passage vers différents états : état amorphe, état cristallin, état de fusion. Quand deux molécules s'associent pour former un complexe, on observe notamment un déplacement du point de fusion vers des températures supérieures pour la molécule invitée ou alors, sa disparition dans l'intervalle de température où la CD est décomposée. Toute modification structurale de la molécule invitée avant le début de la dégradation thermique et l'oxydation des CD peut être évaluée par ces techniques.

4 Méthode d'évaluation des propriétés biologiques des complexes

4.1 L'antibactérien

C'est en 1908 que Paul Ehrlich (1854 - 1915) donne la première définition de ce qu'est une substance chimiothérapeutique dans le traitement des maladies infectieuses. Ses recherches aboutiront à soigner la syphilis et lui vaudront le prix Nobel en 1908 (Ehrlich, 1908). Depuis quelques années, on observe avec une inquiétude certaine, qu'un certain nombre d'espèces bactériennes deviennent résistantes aux antibiotiques et aux antiseptiques disponibles. Cette conséquence est le résultat d'une utilisation abusive et de prescriptions inadaptées d'antibiotique (ATB).

Je n'entrerai pas ici dans le détail de ces très nombreux types de résistance et ne présenterai que succinctement ceux qui nous intéresseront en fonction des espèces étudiées le moment venu.

Les microorganismes les plus fréquemment rencontrés lors des infections sont les genres *Escherichia coli* (responsable de 22,6% des infections nosocomiales), *Staphylococcus aureus* (19,8%), *Pseudomonas aeruginosa* (11,1%) et *Enterococcus spp.* (6%) (RAISIN, juin 2006). De ce fait, au laboratoire, les activités antibactériennes des substances candidates sont étudiées de façon systématique sur ces souches.

De façon à effectuer des expérimentations qui soient interprétables et utilisables par le plus grand nombre, nous nous sommes efforcés de travailler selon les recommandations de deux grands organismes ; le Clinical and Laboratory Standards Insitute (CLSI) (Matthew A. Wikler *et al.*, 2009) et le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) (C.J. Soussy *et al.*, 2012) tout en tenant compte des normes éditées par l'AFNOR (ISO, NF et / ou EN).

Pour la bactériologie, les normes relatives aux antiseptiques désinfectants sont les suivantes :

- NF EN 14885 sur l' « Application des normes européennes relatives aux antiseptiques et désinfectants chimiques »
- NF EN 1040 sur les « Essais quantitatifs de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide de base des antiseptiques et des désinfectants chimiques »
- NF EN 1276 sur les « Essais quantitatifs de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide des antiseptiques et des désinfectants chimiques utilisés

dans le domaine de l'agroalimentaire, dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité »

Ces normes, bien que quelquefois imparfaites et/ou difficiles à mettre en œuvre ont le mérite de donner une base de travail pour la mise en place de mode opératoire.

4.2 La notion de cytotoxicité

Dans le cadre d'études de principes actifs **antibactériens** ou **antifongiques**, la notion de cytotoxicité permet d'évaluer un indice de sélectivité ; c'est-à-dire le rapport de la toxicité mesurée sur l'activité mesurée pour une même substance dans des conditions de concentration et de temps d'exposition identiques. Si ce rapport est supérieur ou très supérieur à 1, l'utilisation d'une telle substance se fait en faveur d'un avantage thérapeutique certain. *A contrario*, si ce rapport est inférieur à 1 ou très proche de 0, il conviendra de se résigner au fait que la toxicité désavantage de façon inéluctable l'utilisation de notre substance dans un contexte thérapeutique.

Dans le cadre d'une étude liée à un agent **anticancéreux**, le rapport de la toxicité mesurée avec des cellules non cancéreuses sur l'activité mesurée avec des cellules cancéreuses (*i.e.* l'efficacité anticancéreuse) d'une même substance dans des conditions de concentration et de temps d'exposition identiques sera à son tour déterminée. Cela permet de conclure quant à l'intérêt thérapeutique ou non de la substance.

En **virologie** l'aspect cytotoxique est primordial. En effet, les virus étant des parasites intracellulaires stricts, il convient de les cultiver sur un tapis de cellules. Lors de la recherche d'une activité antivirale, les cellules servant de *substratum* au virus sont appelées à être en contact avec des doses plus ou moins élevées de substances à tester. Afin de différencier l'activité propre du virus de l'activité toxique de la substance, il est impératif d'effectuer au préalable une étude de cytotoxicité de cette substance sur les cellules hôtes du virus étudié.

Le nombre de lignées cellulaires a littéralement explosé ces dernières années, depuis que la culture de cellule s'est répandue dans la communauté scientifique supplantant les études *in vivo*. Ces études de toxicité *in vitro* nécessitent toutefois quelques points d'attention.

Il faut choisir, des lignées cellulaires non cancéreuses et adaptées à l'utilisation souhaitée du produit à tester. Ainsi, même s'il est possible de tester la toxicité sur des cellules de foie ou d'intestin d'un principe actif dont l'utilisation est envisagée comme

antiseptique/désinfectant (mains, instruments, surfaces…), il sera plus pertinent de le tester sur des cellules de la peau.
Il convient, de façon à être au plus près de la réalité et surtout de pouvoir comparer ces études à celles menées sur des bactéries, champignons ou virus, de travailler sans agent antibactérien ou antifongique de protection dans les milieux de culture.

De surcroit, les tests de cytotoxicité sont nombreux (MTT, bleu trypan, rouge neutre, LDH….) et leur interprétation peut rapidement se trouver erronée par un mécanisme pharmacodynamique défavorable à l'étude. Par exemple, certaines drogues, même si elles sont toxiques peuvent être métabolisées en substances dopantes pour les cellules considérées et ainsi entrainer de graves erreurs d'interprétation. Il est souvent préférable, quand cela est possible d'utiliser des tests de toxicité de différentes natures :

- test de vitalité (MTT (Mosmann, 1983) , XTT…), outre le MTT, le réactif utilisé est un sel de tétrazolium qui est réduit, par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, en sel de formazan et qui forme un précipité de couleur violette. La quantité de précipité formé est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes (mais avant tout à l'activité métabolique de chaque cellule).
- test de viabilité ou la coloration au bleu de trypan (Tennant, 1964) ; est une méthode de coloration des cellules mortes. Le bleu de trypan a tendance à entrer par diffusion dans les cellules. Une fois dans la cellule, ce colorant induit un mécanisme d'exclusion qui va l'éjecter dans le milieu extérieur. Ce mécanisme nécessitant de l'énergie, seules les cellules produisant de l'ATP peuvent le mettre en place. Ainsi, une cellule vivante expulsera la molécule et restera incolore au microscope, à l'inverse, une cellule morte n'aura pas la capacité d'expulser le colorant et deviendra bleue.
- test de toxicité ou test au rouge neutre (Borenfreund et Puerner, 1985) utilise un colorant cationique faible qui pénètre facilement dans les membranes cellulaires par diffusion, et s'accumule au niveau intracellulaire dans les lysosomes des cellules vivantes.
- test de prolifération par cytométrie de flux, dosage de marqueur de prolifération, incorporation de précurseur radioactif…

La norme ISO10993-5 :2009 de juin 2009 relative à l'« évaluation biologique des dispositifs médicaux » et plus particulièrement sa partie 5 « Essais concernant la

cytotoxicité *in vitro* » permet de se donner une base de départ à la mise en place de ce type de tests. En effet, on trouve en annexe de cette publication des protocoles relatifs au test rouge neutre et MTT.

Dans la pratique habituelle de notre laboratoire, les cellules MRC5 (Jacobs *et al.*, 1970) sont le plus souvent utilisées comme lignée de référence dans les tests de cytotoxicité *in vitro*.

4.3 L'antiviral

Les infections d'origine virale semblent beaucoup moins nombreuses en nombre de cas que les infections associées aux soins d'origine bactérienne. En milieu hospitalier, elles représenteraient 5% de l'ensemble des infections nosocomiales mais en fait ce chiffre semble très variable et sous-estimé (jusqu'à 30% des infections dans des services pédiatriques l'hiver…). Cela est dû en grande partie aux différences notables qui existent entre infections bactériennes ou fongiques et infections virales.

Tableau IV : Différences entre IN virales et IN bactériennes et fongiques.

	IN bactériennes et fongiques	**IN virales**
Incubation	habituellement < 48-72H	très variable selon les agents (quelques heures à quelques mois)
Principales manifestations cliniques (en termes de fréquence)	infections urinaires infections du site opératoire infections sur cathéters bactériémies pneumonies	infections gastro-intestinales infections du tractus respiratoire hépatites infections cutanéomuqueuses
Populations à risque	patients soumis à des traitements invasifs (intubation-ventilation, sondages, explorations endoscopiques, implantation de matériel étranger...) opérés immunodéprimés sujets âgés	nouveaux-nés et jeunes enfants sujets hospitalisés en service de long séjour immunodéprimés transplantés hémodialysés hémophiles hémodialysés personnel soignant
Prise en compte dans les enquêtes de surveillance	très correcte	fortement sous-estimée

Principaux éléments de prévention et de traitements spécifiques	antibioprophylaxie antibiothérapie curative traitements antifongiques	vaccination traitements antiviraux

Nous pouvons citer pour mémoire les principaux virus responsables des infections du précédent tableau :

Gastro entérite aigue : Rotavirus, calicivirus, adénovirus…

Respiratoires : VRS, influenza, parainfluenza, métapneumovirus, entérovirus

Hépatiques : Hépatites B, C et moins fréquemment A

Immunitaires : HIV et HTLV

Cutanés/muqueux : Varicella-Zoster Virus (VZV), Herpès Simplex Virus (HSV), Measles Virus (MV), Rubella Virus (RV), Myxovirus parotidis (MP), entérovirus, adénovirus

Hématologiques : hCMV, parvovirus

Plus rarement fièvres hémorragiques et entéroviroses du Système Nerveux Central (SNC).

De la même façon que pour les bactéries, il est à noter que les virus sont capables de subir des mutations génétiques entrainant des phénomènes de résistance aux traitements actuels.

En ce qui concerne l'existence de normes et recommandations pour l'évaluation de propriétés antivirales de molécules, celles-ci sont des plus sommaires. Citons ici les normes :

- NF EN 14675 « Essai quantitatif en suspension pour l'évaluation de l'activité virucide des antiseptiques et des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine vétérinaire »
- NF EN 14476+A1 « Essai virucide quantitatif de suspension pour les antiseptiques et désinfectants chimiques utilisés en médecine humaine ».

Le développement de nouvelles stratégies anti-infectieuses en pathologie humaine est un des axes de recherche de l'équipe où ce travail a été réallisé. En virologie, l'élaboration de modèles et la mise en place de protocoles permettant de valider et de caractériser les propriétés antivirales de différents produits est un des objectifs. Dans ce cadre, j'ai été amené à mettre en place un protocole permettant d'évaluer les propriétés « antivirales » des AHPTs. La norme NF EN 14476+A1 (AFNOR, 2007); seule norme

actuellement en vigueur concernant les activités antivirales en Europe a servi de base de travail.

Selon cette norme, l'évaluation de l'activité antivirale repose sur des essais réalisés *in-vitro* sur cultures de cellules eucaryotes. Ces essais consistent à mettre en contact pendant un temps déterminé le virus testé et la drogue, puis à stopper l'activité du produit testé soit :

- par neutralisation chimique, procédé qui consiste à neutraliser l'action de la drogue en inactivant les fonctions chimiques actives présentes au niveau de celle-ci et responsablent de son activité (Fleurette *et al.*, 1995).
- par filtration, procédé qui consiste à faire passer le mélange virus/drogue sur une colonne chromatographique retenant uniquement la drogue et laissant passer le virus. Des colonnes chromatographiques de type Séphadex® ou Microspin® ou des colonnes « home made » peuvent être utilisées (Geller *et al.*, 2009)
- par dilution, procédé qui consiste à réaliser des dilutions successives du mélange virus/drogue afin de diminuer la concentration en drogue ce qui la rendra inactive car suffisamment diluée. A noter qu'une dilution au 100ème est le minimum nécessaire pour satisfaire au cadre de la norme.

Les titres viraux avant et après contact avec la drogue sont ensuite comparés. Une diminution de ce titre permet de mettre en évidence une activité antivirale. Si, de plus, cette réduction de titre viral atteint 4 log alors la drogue est réputée, selon la norme AFNOR NF EN 14476+A1, posséder une activité « antiseptique antivirale ». Si cette diminution est limitée entre 0,5 et 4 log alors le terme d'activité « antivirale » lui sera accordé.

Parmi les 3 procédés utilisables pour stopper l'activité du désinfectant, la technique par dilution a été utilisée**.** Elle est simple à mettre en œuvre et ne nécessite pas une connaissance approfondie de toutes les drogues étudiées, contrairement soit

- à la technique de filtration où (i) les masses molaires des drogues susceptibles d'interagir avec la colonne doivent être connues et (ii) les molécules de référence et la drogue étudiée doivent avoir des propriétés physicochimiques similaires afin d'être retenues par le même type de colonne chromatographique (Geller *et al.*, 2009).

- à la technique par neutralisation chimique, où la formule chimique de la drogue doit être connue et le produit ou les produits de la réaction de neutralisation ne doivent pas interférer dans l'étude (toxicité cellulaire ou activité antivirale).

Cependant trois problèmes se posent :

- la nécessité d'une charge virale initiale infectieuse (titre) suffisamment élevée afin de pouvoir
  - mettre en évidence une perte de titre jusqu'à 4 log
  - supporter une dilution au $100^{ème}$ lors de la neutralisation de la molécule à tester
- la cytotoxicité du produit à tester peut être confondue avec l'action du virus (ECP). Ainsi des tests de toxicité cellulaire devront être réalisés avec les différentes dilutions de drogue utilisées. Cela permettra de s'assurer de l'absence de biais de manipulations liés à une toxicité de ces dilutions de drogue sur les cellules.
- l'impossibilité de cultiver *in vitro* certains virus. Ce point est abordé dans la norme qui propose ainsi que les essais de virucidie soient réalisés sur 3 virus pour que la substance soit homologuée « virucide ». Ces trois virus sont des virus nus considérés comme « les plus résistants » et représentatifs des virus rencontrés :
  - deux sont des virus à ADN :
    - le parvovirus bovin (souche Haden, ATCC VR-767)
    - et l'adénovirus de type 5 (souche adénoïde 75, ATCC VR-5)
  - le dernier est un virus à ARN :
    - le poliovirus Lsc-2ab de type 1

Le choix de ces virus pour réaliser ces essais réside dans le fait qu'ils possèdent une faible sensibilité à la plupart des désinfectants, une bonne maniabilité, une absence de pathogénicité pour le manipulateur et une bonne stabilité dans le temps (Fleurette *et al.*, 1995).

4.4 L'antifongique

Les mycoses, ou infections fongiques sont des maladies provoquées par des champignons microscopiques. Les fungi sont aisément cultivables en laboratoire, mais une partie d'entre eux, très opportunistes et donc assez rares échappe aux études à

grande échelle et sont plus difficiles à étudier. De plus, depuis la découverte de l'amphotéricine B en 1955, de la 5-fluorocytosine en 1963 et le développement des dérivés azolés de 1957 aux années 1990 ; la recherche de nouveaux antifongiques s'est principalement cantonnée à la modification d'agents azolés et au développement de formes galéniques afin d'améliorer la biodisponibilité et de diminuer la toxicité de l'amphotéricine B. Il est à noter que l'échinocandine, découverte dans les années 70, fait depuis 2003, un grand retour parmi les antifongiques (Lacroix *et al.*, 2003).

La thérapeutique antifongique reste donc cantonnée à un petit nombre de principes actifs. L'amphotéricine B par voie intraveineuse, reste le chef de file des antifongiques et reste souvent le plus efficace. Il en va cependant de même pour les champignons que pour les bactéries, chacun de ces traitements entraine l'apparition de phénomènes de résistance par transport (AmphB), altération de la cible (Azolés), augmentation du nombre de cible (Azolés), absence de cible (AmphB), réduction ou absence de métabolites toxiques (5FC).

De façon identique, il existe des recommandations et des normes relatives à la détermination d'activité antifongique. Ces dernières sont beaucoup plus hétérogènes que celles concernant les antibactériens, notamment en ce qui concerne le choix du milieu de culture.

Il convient de citer entre autre les recommandations du CLSI, de l' European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) et du CA-SFM ainsi que les normes :

- NF EN 1275 sur l' « Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité fongicide ou levuricide de base des antiseptiques et des désinfectants chimiques »
- NF EN 1650 sur l' « Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité fongicide des antiseptiques et désinfectants chimiques utilisés dans le domaine de l'agroalimentaire, dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité ».

Ces normes mettent l'accent sur deux espèces particulières de fungi : *Candida albicans* et *Aspergillus niger*.

Nous avons donc décidé de choisir comme modèles ces deux espèces pour la réalisation des études sur l'évaluation des activités antifongiques.

4.5 L'anticancéreux

Le mot cancérologie recouvre de nombreuses réalités qui ne seront pas toutes représentées ici. Les cancers sont tous dus à des dérèglements du cycle cellulaire et à une prolifération incontrôlée des cellules.

Les cancers sont des pathologies génétiques c'est-à-dire qu'ils ont pour origine une modification quantitative et/ou qualitative de nos gènes. Comme il s'agit d'altérations génétiques somatiques qui ne sont présentes que dans le tissu malade, la plupart des cancers ne sont donc pas héréditaires. Seul un terrain plus ou moins favorable pouvant l'être.

Lors d'une chimiothérapie le traitement touche toutes les cellules qui ont la capacité de se multiplier rapidement, qu'il s'agisse en particulier de cellules cancéreuses ou de cellules saines. Cependant les cellules saines ne sont pas épargnées car la plupart des agents indifféremment utilisés s'attaquent à toutes les cellules de l'organisme en cours de division. Cela provoque des effets souvent indésirables, variables et inconstants (chute des cheveux, cils, sourcils...).

Pour des raisons mal comprises certains médicaments sont plus ou moins actifs et efficaces selon les personnes. Dans certains cas, l'explication est connue. Des facteurs cellulaires liés à la cellule tumorale elle-même et qui font intervenir plusieurs mécanismes se trouvent modifiés. Les principaux mécanismes (Bonnal et Calvo, 1996) impliqués dans la résistance multidrogue des cellules cancéreuses sont :

- la modification de la pénétration du médicament dans la cellule tumorale où il doit se maintenir suffisamment longtemps pour être actif,
- la modification du métabolisme des drogues (activation, inactivation),
- la modification des cibles cellulaires et des processus de réparation de l'ADN.
- la modification d'enzymes clés (topoisomérases II, protéine kinase C, glutathion S transférase, la O6 alkylguanine-ADN alkyltransférase…)
- la modification de certaines protéines (heat shock protein, métallothionéines…)

Pour cette partie, l'absence de recommandation et de norme laisse une grande liberté. Cependant il nous a semblé judicieux de s'appuyer sur le type de méthode proposée par les normes en cytotoxicité.

Afin d'effectuer un premier point sur l'activité anticancéreuse des AHPTs étudiés, un test MTT a été entrepris sur des cellules IgrOV1, K562 et K562 doxoR dont les caractéristiques sont décrites par la suite.

Matériel et méthodes

1 Etudes biologiques

Cette partie a pour but de présenter les entités biologiques utilisées lors de cette étude. Elle fait aussi le point sur les méthodes mises en place afin de répondre à nos objectifs de détermination d'activité biologique des AHPTs.

1.1 Matériel biologique

Sont listées ici l'ensemble des cellules : bactériennes, fongiques, animales et des virus utilisés au cours de notre étude.

1.1.1 Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées dans ce travail sont des souches de référence (Tableau V) ou des souches résistantes aux antibiotiques (Tableau VI).

Les souches de référence ont été choisies parmi celles figurant dans les recommandations du CA-SFM, du CLSI et de l' EUCAST.

Les espèces bactériennes testées ont aussi été retenues car ce sont celles qui sont le plus fréquemment retrouvées lors d'infections chez l'homme (RAISIN, juin 2006).

Tableau V : Souches bactériennes de référence utilisées.

Souches bactériennes		ATCC	Recommandées par
Escherichia coli	EC	25922	CA-SFM, EUCAST, CLSI
Staphylococcus aureus	SA	25923	CA-SFM
	SA2	29213	EUCAST, CLSI
Enterococcus faecalis	EF	29212	CA-SFM, EUCAST, CLSI
Pseudomonas aeruginosa	PA	27853	CA-SFM, EUCAST, CLSI

1.1.1.1 ***Escherichia coli* ATCC 25922.**

Escherichia coli (*E. coli*), est une bactérie intestinale des mammifères très commune chez l'être humain. Cependant, certaines souches d'*E.coli* peuvent être pathogènes entraînant alors des gastroentérites, infections urinaires, méningites, ou septicémies. Il

existe des résistances naturelles (principalement aux glycopeptides et à la pénicilline G pour *E. coli*) aux antibiotiques : *E. coli* est sensible aux bêta-lactamines malgré la production d'une céphalosporinase chromosomique non inductible de type AmpC qui peut entraîner chez certaines souches une réduction de la sensibilité aux aminopénicillines, à leurs associations au clavulanate et/ou au Céphalosporines de 1er Génération (C1G).

Ont été trouvés différents types de résistances acquises aux β-lactames :

- Pénicillinase de haut niveau chez 50% des *E. coli*.
- Hyperproduction de céphalosporinase chez 5% des *E. coli*.
- Bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) chez 1% des *E. coli*.

(Jehl *et al.*, 2003)

1.1.1.2 ***Enterococcus faecalis* ATCC 29212.**

Bactérie saprophyte de l'intestin de l'homme, et en moindre part de sa gorge et de sa peau, elle est responsable d'infections diverses survenant le plus souvent dans le milieu hospitalier. Il existe une dizaine d'espèces principales d'entérocoque : *E. faecium, E. faecalis, E. durans, E. casseliflavus, E. flavescens, E. avium, E. gallinuraum, E. liquifaciens* et *E. zymogenes.* Ces bactéries sont des pathogènes opportunistes responsables essentiellement de septicémies, et d'endocardites. Avec l'espèce *faecium,* elles sont à l'origine d'infections (infection des voies urinaires, septicémie, diarrhée, éruptions cutanées, arthralgies, abcès, infections des plaies secondaires à des interventions chirurgicales, plaies et ulcères survenant sur les pieds des diabétiques, endocardite) principalement chez les patients âgés et/ou fragilisés.

Il existe des résistances naturelles aux antibiotiques : tous les entérocoques possèdent une résistance naturelle de bas niveau aux aminosides. *E. faecalis* est naturellement résistant aux macrolides.

Ont été trouvés différents types de résistances acquises aux antibiotiques suivants :

- Bêta lactames par production de bêtalactamase et modification des Protéines Liants les Pénicillines (PLP).
- Aminosides par mutation entraînant l'altération de la cible ribosomale, plus rarement modification de transporteur.

- Glycopeptides par modification de la structure de la cible de la paroi bactérienne (Système *Van*).

(Jehl *et al.*, 2003)

1.1.1.3 ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et 29213.**

S. aureus est un saprophyte de l'environnement extérieur (eau, sol, air) et est commensal de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux. Il peut être responsable d'infections locales telles que des infections cutanées, ou généralisées comme des septicémies. Habituellement, la pénicilline G et les aminopénicillines ne sont plus actives sur les staphylocoques. Ces bactéries sont de plus en plus nombreuses à présenter des phénomènes de résistance aux antibiotiques. Parmi les plus connues nous pouvons citer :

- la résistance aux β-lactamines
- la résistance aux glycopeptides (Système *mecA*).

(Jehl *et al.*, 2003)

1.1.1.4 ***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.**

P.aeruginosa est largement répandu dans l'environnement, il vit en saprophyte dans le sol et l'eau. Il peut se rencontrer chez l'homme, au niveau des flores commensales. *P.aeruginosa* intervient fréquemment comme pathogène opportuniste. Il entraîne dans les organismes affaiblis des infections diverses, voire une septicémie. *P. aeruginosa* est naturellement résistant aux aminopénicillines, à l'association amoxicilline – acide clavulanique et aux céphalosporines de 1° et 2° générations. Cependant, de nombreux phénotypes de résistances sont en train d'apparaitre :

- résistance aux bêta lactamines (pénicillinase, BLSE, céphalosporinase de haut niveau, carbapénémase, pompe d'efflux ou déficit en porines)
- résistance aux aminoglycosides (imperméabilité, efflux, inactivation enzymatique, mutants respiratoires, combinaison de plusieurs de ces mécanismes)
- résistance aux quinolones (efflux actif, modification de l'ADN gyrase ou de la topoisomérase, modification des porines ou du Lipo Poly Saccharide (LPS))

(Jehl *et al.*, 2003)

Tableau VI : Souches bactériennes résistantes aux antibiotiques utilisés dans cette étude.

Souches bactériennes	Mécanisme de résistance	Source
Escherichia coli	Producteur de pénicillinase	ABC Platform® Bugs Bank
Staphylococcus aureus	MecA (MRSA)	ABC Platform® Bugs Bank
Enterococcus faecium	VanB	ABC Platform® Bugs Bank
Enterococcus faecium	VanA	ABC Platform® Bugs Bank
Pseudomonas aeruginosa	Surexpression de pompe à efflux	ABC Platform® Bugs Bank

MRSA : *Staphylococcus aureus* résistant à la Méticilline

1.1.2 Souches virales

Deux souches virales appartenant aux familles *Herpesviridae* et *Picornaviridae* ont été utilisées au cours de cette étude,

Le cytomégalovirus humain (hCMV) est un virus strictement humain, qui infecte plus de 70% des habitants de la planète avec une prévalence de 50% en France et de presque 100% dans certains pays d'Afrique. Il appartient à la famille des *Herpesviridae* dont certains sont bien connus, y compris par le grand public : l'herpès simplex virus (HSV), le virus de la varicelle/zona (VZV) et de la mononucléose infectieuse (virus d'Epstein Barr : EBV).

Le CMV fait partie de la sous-famille des *Betaherpesvirinae* isolé en 1956 (Theodoridis, 1985). Cette sous-famille de virus est caractérisée par sa capacité à produire des infections latentes et persistantes. Le risque qu'il représente pour la santé humaine est largement sous-évalué, en particulier parce que son pouvoir pathogène est discret la plus part du temps. Chez les personnes immunocompétentes, ce virus n'aura aucune répercussion.

L'effet cytopathogène (ECP) met en œuvre une déformation cellulaire comme c'est le cas pour le hCMV une coloration au May-Grünwald et Giemsa (MGG) est nécessaire. Les plaques colorées au MGG sont alors observées au microscope inversé au grossissement x200, voire x400 si nécessaire.

Le poliovirus de type 1, responsable de la poliomyélite, est un entérovirus spécifique des primates appartenant au même taxon que celui des échovirus (exanthème), coxsackievirus (éruptions cutanées, péricardite…), paréchovirus (pneumonie -

gastroentérites), rhinovirus (bronchiolites), hepatovirus (hépatite A), cardiovirus (encéphalomyélite) et kobuvirus (gastroentérites). Le genre entérovirus auquel appartient le poliovirus a fait l'objet de nombreux travaux du fait de la gravité des conséquences de l'infection dans l'espèce humaine par les poliovirus. Cela a permis d'obtenir des agents viraux atténués permettant d'une part la vaccination des personnes ainsi qu'une manipulation plus aisée en laboratoire de recherche. Parmi ces agents, citons le virus Lsc2ab encore appelé souche Sabin (Sabin, 1957) (souche vaccinale) que nous avons utilisé au cours de cette étude.
Le seul réservoir naturel connu pour les poliovirus est l'homme.

L'effet cytopathogène du poliovirus est mis en évidence par une coloration au cristal violet. L'ECP se traduit par la destruction totale du tapis cellulaire. Les plaques colorées au cristal violet sont observées à l'œil nu, les puits infectés ne prennent pas de coloration violette, les puits non infectés prennent cette couleur. Là encore les puits infectés sont comptabilisés.

1.1.3 Souches fongiques

Trois fungi ont été testés. L'un est représentatif des infections à levures (*C. albicans*) et les deux autres sont représentatifs des infections à champignons filamenteux (*A. niger* et *A. fumigatus*).

Candida albicans est une levure, commensale de la muqueuse intestinale qui devient pathogène en cas de rupture de l'équilibre naturel de l'organisme (pathogène opportuniste) (Linas, 2007 ; Persat et Gangneux, 2008). *Candida albicans* est responsable d'un cas de candidose sur deux (Persat et Gangneux, 2008). Les candidoses sont favorisées par des facteurs locaux (transpiration, humidité, macération, traumatismes, irritations chroniques, pH acide,…) et généraux (immunodépression, diabète, cancer, grossesse, antibiothérapie au long cours, corticothérapie, la prise d'œstro-progestatifs,…).

Les *Aspergillus* sont des champignons filamenteux cosmopolites, ubiquitaires et pathogènes opportunistes. *Aspergillus fumigatus* est l'espèce prédominante dans les pays tempérés, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* sont plus fréquents dans les pays tropicaux. La contamination se fait essentiellement par inhalation de spores, leur faible

diamètre (2 à 3 µm) permet leur pénétration jusqu'au niveau broncho-alvéolaire. Plus rarement, une contamination directe peut être responsable d'infections superficielles telles que les otomycoses du conduit auditif externe ou les surinfections des lésions cutanées (brûlures) (Linas, 2007). Plusieurs facteurs peuvent favoriser les infections, le nombre de spores inhalées, la diminution des défenses immunitaires (corticoïdes, neutropénie, immunosuppresseurs, antibiothérapie, perte d'intégrité des épithéliums cutanés ou muqueux).

1.1.4 Cellules animales

Cinq lignées cellulaires ont été utilisées au cours de ce travail ; deux ont été plus particulièrement utilisées afin d'étudier la toxicité cellulaire des AHPTs (MRC5 et HaCaT), deux afin de tester l'activité anticancéreuse (K562 et IgROV1) et deux ont été utilisées pour cultiver les virus (MRC5 et VERO).

1.1.4.1 **Cellules MRC5 ATCC CCL 171**

Il s'agit de cellules fibroblastiques pulmonaires d'embryons humains. Cette lignée cellulaire a été isolée à partir de tissu pulmonaire normal d'un fœtus mâle de 14 semaines par J.P. Jacobs en Septembre de 1966 (Jacobs *et al.*, 1970). Ces cellules sont capables de subir de 42 à 46 mitoses avant de passer en sénescence. Ces cellules ne sont ni cancéreuses, ni transformées. Elles sont permissives à l'infection au hCMV.

1.1.4.2 **Cellules K562 ATCC CCL 243**

La lignée K562 a été isolée en 1971 par Lozzio et Lozzio à partir du liquide pleural d'une patiente atteinte de leucémie myéloïde chronique (Lozzio et Lozzio, 1975). Le caryotype de ces cellules tumorales humaines montre la présence du chromosome Philadelphie. Ces cellules se sont révélées indifférenciées, non adhérentes et multipotentes. Il s'agit en fait d'un défaut complexe puisque la partie ainsi amputée est retrouvée sur un autre chromosome, le plus souvent sur le chromosome 9 (translocation 22-9). Ceci résulte de la fusion d'une partie du gène BCR ("Breakpoint Cluster Region") du chromosome 22 avec une partie du gène ABL ("Abelson") du chromosome 9. La protéine issue de ce gène bcr-abl est une protéine de 185 ou 210 kDa ayant une activité de tyrosine kinase et stimulant en permanence la division des cellules.

Il est à noter l'existence d'une lignée K562 doxoR qui est une lignée de K562 résistante à la doxorubicine. La doxorubicine est un inhibiteur des topoisomérases de type II, enzymes impliquées dans le maintien de la structure tridimensionnelle de l'ADN lors des phénomènes de transcription-réplication. Les complexes brins d'ADN/Topoisomérase seront stabilisés empêchant ainsi la réplication de l'ADN. Le phénomène de résistance, dit phénomène MDR (Multi Drug Resistance), est lié à l'expression de glycoprotéine P (un membre de la superfamille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) au niveau de l'enveloppe nucléaire (Chen *et al.*, 2007)

Cette lignée ainsi que sa variante résistante à la doxorubicine nous ont été fournies par Mme Ramachi du Centre de Lutte Contre le Cancer de Lorraine Alexis Vautrin (Nancy, France).

1.1.4.3 **Cellules HaCaT**

Les cellules de la lignée HaCaT sont des kératinocytes humains immortalisés (Boukamp *et al.*, 1988 ; Fusenig et Boukamp, 1998). L'immortalisation des kératinocytes qui a servi à établir la lignée de cellules HaCaT a été réalisée par l'intermédiaire du virus SV40. La lignée ainsi transformée a donné naissance à une lignée immortalisée, mutée sur P53 (Henseleit *et al.*, 1997) mais encore capable de différenciation épidermique spontanée. Cette lignée cellulaire HaCaT est évidemment immortelle (> 140 passages), mais non tumorigène. Certains auteurs proposent cette lignée cellulaire comme modèle pour l'évaluation de la cytotoxicité des antibiotiques et/ou des antiseptiques (Damour *et al.*, 1992 ; Wilson *et al.*, 2005).
Elle nous a été aimablement fournie par l'Institut Pierre Fabre (Toulouse, France).

1.1.4.4 **Cellules IgROV1**

Ces cellules sont issues d'un adénocarcinome ovarien humain d'une patiente de 47 ans. Leur temps de génération est de 20 heures. Elles sont hautement tumorigènes : en injection sous cutanée elles forment chez la souris « nude » des carcinomes péritonéaux qui conduisent les souris à la mort en moins de 2 mois. Elles forment en culture des tapis cellulaires monocouches. Deux marqueurs génétiques permettent de les identifier : une inversion paracentrique (deux cassures sur le même bras chromosomique et

recollement après inversion du fragment, cette anomalie ne peut être détectée que par la modification des bandes chromosomiques) sur le chromosome 3 et une translocation entre les chromosomes 2 et 5. Cela fait de cette lignée un modèle expérimental intéressant pour l'étude biologique des tumeurs solides humaines (Benard *et al.*, 1985). Elles nous ont été fournies par l'EA 1772 - GRECAN de Caen.

1.1.4.5 **Les cellules Vero ATCC CCL-81**

Les cellules Vero sont des cellules épithéliales cancéreuses de rein de singe vert (Rhim *et al.*, 1969). Il s'agit d'une lignée continue, provenant de la transformation spontanée ou viro-induite de cultures primaires ou secondaires de cellules de rein de singe et ayant une capacité de prolifération infinie et une croissance plus rapide que les cellules diploïdes. Leur nombre de passages est théoriquement illimité. Mais des propriétés nouvelles peuvent être acquises par les cellules à l'occasion de passages répétés. Les cellules Vero sont permissives au poliovirus de type 1 Lsc-2ab (Wutzler et Sauerbrei, 2004).

1.2 Evaluation de l'activité antibactérienne

1.2.1 Matériel et réactifs

Le matériel nécessaire aux expérimentations biologiques est listé dans le Tableau VII, les réactifs dans le Tableau VIII.

Tableau VII : Matériel utilisé pour les expérimentations bactériennes.

Matériel	Références	Fournisseurs
PSMII	Européenne	Fluxfrance
PSMII	TC120	Gelaire
Balance de précision (d=0,01mg de 0 à 10 g / d=0,05mg de 10 à 100g)	BP211D	Sartorius
Centrifugeuse de paillasse réfrigérée	5804R	Eppendorff
Incubateur	Stabilitherme	Thermo
Filtre seringue, membrane PES, 0,22 µm, 33 mm type millex-GP	SLGP033RS	Millipore
Microplaque 96 puits pour culture fonds en U	83.1835.300	Sarstedt
Microtube, 2 mL, polypropyléne, stérile, bouchon vissé, fond conique à jupe	72.694.406	Sarstedt
Pipetboy accu	155015	Integra bio sciences
Réservoir à réactif à fond en V, capacité de 60 mL	613.2671	Thermo Scientific
Réservoir à réactif, 8 compartiments, 10 mL par compartiment	613.2672	Thermo Scientific
Seringue 10 mL, 3 pièces, stérile	302188	BD bioscience
Seringue 20 mL, 3 pièces, stérile	300629	BD bioscience

Tableau VIII : Réactifs utilisés pour les expérimentations bactériennes.

Réactifs	Références	Fournisseurs
Mueller Hinton bouillon	275730	Difco
Mueller Hinton gélosé	225250	Difco

1.2.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice

La détermination de la concentration inhibitrice minimale (CMI) a été effectuée selon les recommandations du CA-SFM, de l'EUCAST et du CLSI.

L'activité antibactérienne des molécules (AHPTs, γ-CD et complexes), a été évaluée par la détermination de leur CMI, qui correspond à la plus faible concentration de substance inhibant toute croissance bactérienne. Pour réaliser ces déterminations, a été utilisée une technique dite en micro méthode en milieu liquide, en plaques 96 puits à fonds en U.

Cette méthode, dans ce contexte d'essais sur des molécules d'origine naturelle, a plusieurs aspects originaux :

- elle se place dans un contexte d'étude avec une finalité thérapeutique, lié entre autre aux thématiques du laboratoire.
- elle répond à un cadre méthodologique strict lié aux différentes recommandations des organismes de recommandations nationales, européens ou américains (CA-SFM, EUCAST et CLSI). Ainsi, même si cela lui permet de garder une certaine latitude dans la mise en place de conditions expérimentales, certains points ne peuvent être discutés. Dans la plupart des études antibactériennes, le milieu de culture utilisé varie sans justification (MH, BHI (Cunha *et al.*, 2010), TS (Nyila *et al.*, 2012), Columbia-Sang, Luria-Bertani (Gutierrez-Lugo *et al.*, 2002 ; Watson, 2006)...). Dans le cadre méthodologique lié à ces organismes, le choix du milieu Mueller-Hinton (MH) est unanime. De la même façon, un bon nombre d'études font état de l'utilisation de souches bactériennes mal définies et/ou non adaptées à une thématique liée à la thérapeutique. Dans la plupart des cas, ce sont des souches isolées de l'environnement et dont l'identification et le profil de résistance aux antibiotiques ne sont pas toujours bien définis. Ici encore, nous avons souhaité nous inscrire dans le cadre méthodologique strict et nous avons utilisé des souches ATCC. Pour les souches résistantes, l'antibiogramme a été effectué sur Vitek® 2 (BioMérieux, France).
- elle utilise des AHPTs commerciaux et non pas des AHPTs extraits de plantes, c'est-à-dire des molécules qui ne sont pas potentiellement contaminées par d'autres isoprénoïdes, triterpénoïdes ou d'autres molécules d'origine végétale et qui pourraient amener un biais sur les résultats biologiques.

1.2.2.1 **Préparation des suspensions bactériennes**

La souche bactérienne est ensemencée sur milieu MH gélosé et incubée 24 h à 35°C. À partir de cet ensemencement, une colonie bactérienne est reprise dans un bouillon MH et incubée 18-24 h à 35°C. Après centrifugation (10 min., 4500g), le culot bactérien est remis en suspension dans 1 mL d'eau distillée. Des dilutions appropriées (selon la souche bactérienne) en eau distillée stérile sont effectuées afin d'obtenir des suspensions contenant environ 2.10^5 Unités Formant Colonie par mL (UFC/mL). Les

facteurs de dilutions utilisés sont : 100 pour *E.faecalis* et *E.faecium*, 1000 pour *S.aureus* et *P. aeruginosa* et 6000 pour *E.coli*.

1.2.2.2 **Préparation des dilutions de DMSO**

L'utilisation de DMSO comme co-solvant est nécessaire pour l'obtention des concentrations voulues (1024 µg/mL) en AHPTs lorsqu'ils sont évalués seuls ou complexés. Ces concentrations sont très élevées par rapport au seuil de solubilité des AHPTs dans l'eau, mais ces valeurs ont été choisies de façon à se placer dans des concentrations similaires à celles proposées dans les recommandations et celles testées dans la littérature.

Après avoir testé ce co-solvant à des taux de 50% à 0,125% dans du MH nous avons montré que, utilisé en faible quantité, il n'a pas d'impact sur les cultures bactériennes. Le DMSO est aussi ajouté aux témoins de croissance bactérienne.

1.2.2.3 **Préparation des dilutions de triterpènes seuls ou complexés**

Les principes actifs sont testés à la concentration de 512 à 1 µg/mL. La solution de départ est préparée à une concentration de 1024 µg/mL. Afin d'obtenir une telle solution, et à titre d'exemple, cela revient à peser 6,14mg AHPT ou équivalent, de dissoudre cette masse avec 75 µL de DMSO et d'ajouter 5,92 mL de MH.

La solution est ensuite stérilisée par filtration sur une membrane 0,22 µm.

1.2.2.4 **Préparation des microplaques**

Les tests sont réalisés en microplaques selon le schéma présenté en Figure 18 :

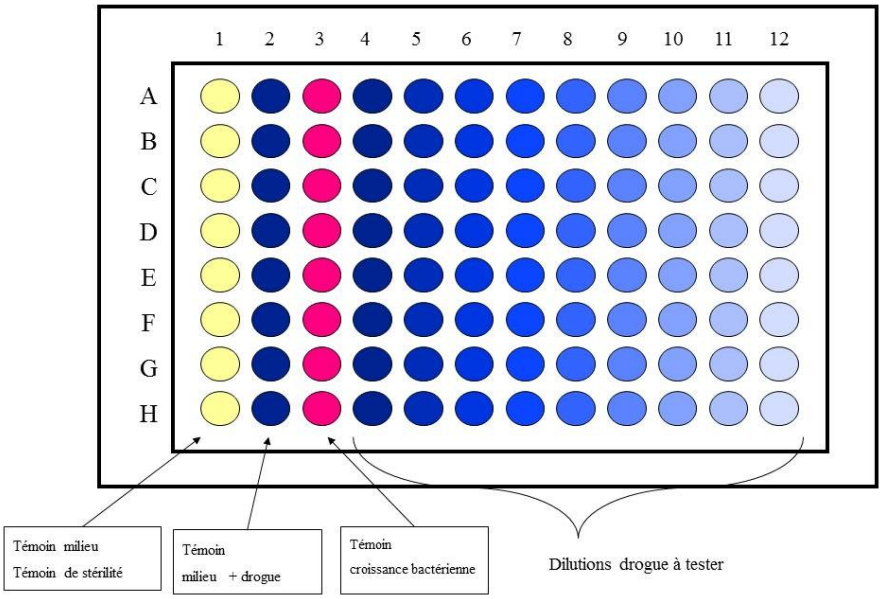


Figure 18 : Schéma de micro plaque pour la réalisation des CMI

La colonne 1 correspond à du milieu de culture seul. Ce témoin permet de confirmer la stérilité des opérations.

La colonne 2 contient du milieu MH et la substance à tester à sa plus forte concentration (habituellement 512 où 256 µg/mL). Ce témoin permet de mettre en évidence une interaction éventuelle entre un ou des composants du MH et la substance testée. Si l'absorbance est modifiée dans ce témoin, il faudra en tenir compte dans la détermination de la CMI.

La colonne 3 contient seulement du MH et l'inoculum et permet de vérifier que l'absence de croissance dans les autres colonnes n'est pas due à de mauvaises conditions de culture mais bien à une action de la substance testée sur les bactéries.

Les colonnes 4 à 12 correspondent à des concentrations de la substance à tester de 512 à 2 µg/mL (où de 256 à 1µg/mL) suite à la réalisation d'une gamme de dilution d'ordre 2 et ce pour un volume final de 50 µL.

Il s'en suit l'ajout de la suspension bactérienne sous un volume de 50 µL dans les colonnes 3 à 12. Cela porte le volume réactionnel final à 100µL dans l'ensemble des puits et aboutit à tester une gamme de concentrations finales allant de 512 à 2 µg/mL (où de 256 à 1µg/mL).

Les microplaques sont alors incubées à 35°C pendant 18 à 24 h.

1.2.2.5 **Lecture et interprétation des résultats**

Les résultats sont obtenus par lecture de la turbidité au spectrophotomètre à 540 nm après homogénéisation du contenu des puits grâce à un agitateur de microplaque.

Les données sont collectées à l'aide du logiciel Multiskan, puis exportées vers une feuille Excel pour traitement. Les CMI sont déterminées trois fois à partir de trois inocula indépendants.

1.3 Evaluation de la cytotoxicité

1.3.1 Matériel et réactifs

Tableau IX : Matériel spécifique pour la culture de cellules eucaryotes de vertébrés.

Matériel	Références	Fournisseurs
Balance de précision (d=0,01 mg de 0 à 10 g / d=0,05 mg de 10 à 100 g)	BP211D	Sartorius
Cellule de Malassez double, grille de 5 mm²	720.0149	VWR
Centrifugeuse de paillasse réfrigérée	5804R	Eppendorff
Filtre seringue, membrane PES, 0,22 µm, 33 mm type Millex-GP	SLGP033RS	Millipore
Microtube, 2 mL, polypropylène, stérile, bouchon vissé, fond conique à jupe	72.694.406	Sarstedt
Réservoir à réactif à fond en V, capacité de 60 mL	613.2671	Thermo Scientific
Réservoir à réactif, 8 compartiments, 10 mL par compartiment	613.2672	Thermo Scientific
Seringue 10 mL, 3 pièces, stérile	302188	BD bioscience
Microscope droit visible et fluorescence	Axioscop	Zeiss
Camèra	Axiocam	Zeiss
Lecteur de microplaques	Multiskan EX	Thermo Scientific
PSMII	Heraeus H515	Thermo
Boite de congélation avec réservoir pour isopropanol	479-3200	Nalgene
Incubateur thermostaté avec CO_2	MCO-15AC	Sanyo
Flacon de culture pour cellules, gamme rouge, 25 – 75 et 175 cm²	83.181X	Sarstedt
Flacon de culture pour cellules, gamme verte 25 et 75 cm²	83.181X.XXX	Sarstedt
Microplaque 96 puits pour culture pour cellules, gamme rouge	83.1835.300	Sarstedt
Microplaque 96 puits pour culture pour cellules, gamme verte	83.1837.500	Sarstedt
Slide Flask en polystyrène	734-2107	Nunc
Microscope inversé à contraste de phase	Olympus IM	Olympus

Tableau X : Réactifs spécifiques pour la culture de cellules eucaryotes animales.

Matériel	Références	Fournisseurs
Sérum de veau fœtal	CVSVF00-0U	eurobio
Trypsine EDTA	25300	Gibco
Bleu Trypan	15250-061	Invitrogen
MEM Glutamax	41090	Gibco
DMEM 1 g/L glucose	31885	Gibco
DMEM 4,5 g/L glucose	61965	Gibco
RPMI 1640	72400	Gibco

La mesure de la cytotoxicité des molécules est effectuée en microplaques de 96 puits à fond plat pour les cellules adhérentes et pour les cellules en suspension.

1.3.2 Méthode d'évaluation de la cytotoxicité

Nous avons souhaité pouvoir comparer les valeurs d'activités biologiques obtenues à des valeurs de cytotoxicité. Pour cela nous avons décidé de mesurer les concentrations inhibitrices 50% (CI_{50}) des différentes substances. La CI_{50} est la concentration de substance nécessaire pour observer une diminution de 50% de la viabilité cellulaire. Ces valeurs ont été déterminées sur les lignées cellulaires MRC5 et HaCaT.

Nous avons aussi mesuré des concentrations cytotoxiques 50% (CC_{50}) pour les différentes substances. La CC_{50} est la concentration de substance nécessaire pour observer la mort de 50% des cellules mises en culture.

1.3.2.1 **Culture cellulaire et préparation des plaques-test**

Les cellules sont mises en culture dans des flacons de culture de 25, 75 ou 150 cm^3 en fonction de leur densité, et de la quantité de cellules désirée, en incubateur à 37°C sous 5% de CO_2. Le milieu utilisé varie en fonction de la lignée cellulaire.

Les milieux utilisés en culture cellulaire sont :

- le milieu essentiel minimum (MEM) pour les MRC5,
- le milieu minimum essentiel de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) pour les HaCaT.

1.3.2.1.1 Congélation, mise en culture, récolte et entretien des cellules animales

1.3.2.1.1.1 Congélation des cellules

Les cellules d'un flacon de culture de 175 cm^2 sont récoltées dans un tube de 15 mL puis centrifugées 15 min. à 300g afin d'éliminer toute trace de débris cellulaires. Elles sont ensuite remises en suspension avec un mélange 90/10 ($^v/_v$) milieu de culture/DMSO.

Lors de leur congélation, afin d'éviter une chute trop brutale de température, les cellules sont placées dans des boîtes de congélation contenant de l'isopropanol permettant une

vitesse de refroidissement régulière de 1°C/min, et dans un congélateur à -80°C pendant 24 h avant d'être transférées dans la bonbonne d'azote liquide.

1.3.2.1.1.2 Mise en culture des cellules

Après une décongélation rapide, les cellules sont placées dans des flacons de culture cellulaire de 25 cm² contenant 8 mL du milieu de culture approprié à la lignée, additionné de 1 mL de sérum de veau fœtal (10% ($^{v}/_{v}$) final) (SVF), préalablement décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 45 min. Dès que les cellules ont repris une croissance normale, le DMSO, cytotoxique à température ambiante, est éliminé des flacons de culture par changement du milieu.

1.3.2.1.1.3 Récolte des cellules

Une fois à confluence les cellules cessent de se multiplier. Il convient alors de les récolter afin de pouvoir les utiliser. Pour cela, nous effectuons trois lavages avec un tampon phosphate (PBS) afin d'éliminer le SVF et les débris cellulaires qui pourraient interférer avec l'action de la trypsine. Un pré-contact avec 1 mL de trypsine –EDTA suivi d'une incubation de 5 minutes à 37°C et sous 5% de CO_2 avec là encore 1 mL de trypsine–EDTA permet la dissociation des cellules du tapis par digestion enzymatique partielle des protéines d'adhésion des cellules.

L'étape d'utilisation de la trypsine sur les lignées adhérentes et remplacée par une étape de centrifugation sur les lignées de cellules en suspension (K562).

Cinq mL de SVF sont ajoutés pour procéder à la dissociation cellulaire par pipetages successifs à l'aide d'une pipette de 5 mL. La dissociation et l'individualisation des cellules sont vérifiées au microscope inversé. L'ajout de 32 mL de milieu de culture approprié permet d'obtenir une suspension cellulaire en milieu de culture supplémenté à 10% de SVF au final.

La suspension cellulaire est alors prête à être utilisée pour :

- le maintien de la culture en flacon de culture de 75 ou 175 cm²
- l'ensemencement de plaques de culture 96 puits

Les cellules nécessitent, *a minima*, un entretien hebdomadaire. Cet entretien est réalisé dans des boîtes de culture de 175 cm² arrivées à confluence. Après obtention d'une suspension cellulaire (Récolte des cellules p. 81) le nouveau flacon de culture est

ensemencé à $2,5.10^4$ cellules par cm² en milieu de culture adapté et complémenté à 10% de SVF.

1.3.2.1.2 Ensemencement des microplaques 96 puits avec la suspension cellulaire

Après obtention d'une suspension cellulaire (Récolte des cellules p. 81), les cellules sont dénombrées en cellule de Malassez après coloration en bleu trypan.

Pour cette coloration sont introduits dans un tube Eppendorf stérile :

- 500 µL de bleu trypan.
- 400 µL de PBS.
- 100 µL de suspension cellulaire.

La suspension cellulaire est ajustée à 100 cellules/µL de façon à pouvoir ensemencer chaque microplaque à raison de 10^4 cellules / puits.

1.3.2.1.3 Mise en contact des cellules avec la substance à tester

Les volumes suivants (Cf. Figure 19) de suspension cellulaire, milieu de culture et solution à tester sont déposés comme suit :

- 100 µL de suspension cellulaire dans les puits des colonnes 3 à 12
- 100 µL de milieu de culture dans ces mêmes puits (on complète à 200 µL)
- 200 µL de milieu de culture SVF dans les puits des colonnes 1 et 2

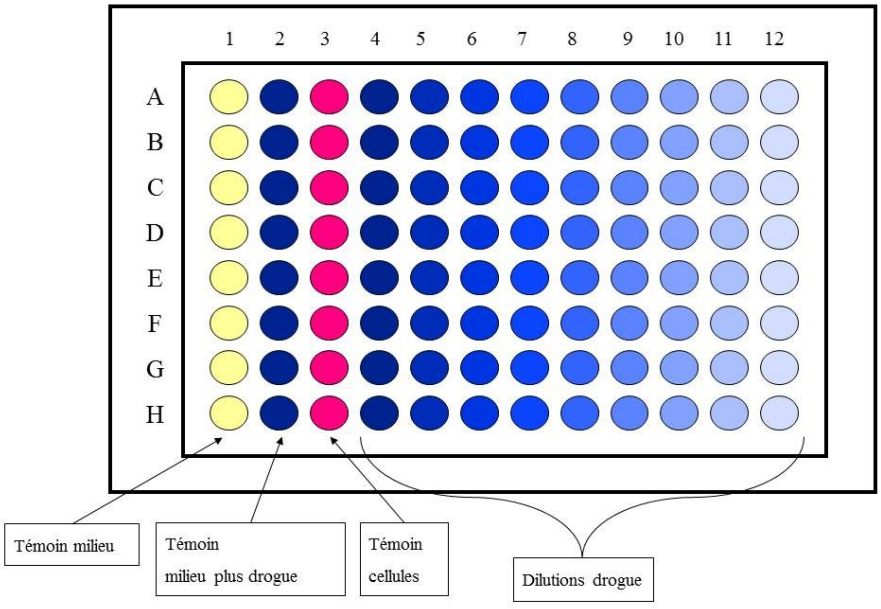


Figure 19 : Schéma de plaque pour la réalisation du test de viabilité et/ou de toxicité cellulaire

Les plaques sont incubées ensuite 48 h à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO_2 puis les dilutions en milieu et SVF à 2% de la drogue à tester, stérilisées par filtration, sont ajoutées soit selon une gamme allant de 256 µg/mL à 1 µg/mL, soit selon une gamme allant de 10^{-3} M à 10^{-11} M.

Remarques :

- les AHPTs sont préalablement dissous dans du DMSO mais sans jamais que ce dernier ne se retrouve à une concentration finale supérieur à 1% pour la plus forte concentration testée.
- l'étape d'ensemencement se déroule à une concentration de 10% de SVF alors que la suite des opérations se déroule à 2% de SVF. En effet, afin d'optimiser la réponse des cellules aux différentes substances, celles-ci sont placées en condition de survie par rapport à la quantité de SVF disponible.

Les plaques sont alors incubées 24 h à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO_2.

1.3.2.2 **Test de vitalité au dimethylthiazolyl diphenyl tetrazolium**

Le test au bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) est une méthode rapide de quantification des cellules vivantes (Mosmann, 1983). Ce test ne nécessitant que des étapes d'ajout de réactifs, il peut être utilisé quel que soit le type de lignée cellulaire (adhérentes ou en suspension).

Il nécessite 1 plaque 96 puits pour chaque temps testé et pour chaque gamme de dilution de la drogue à tester.

Le réactif utilisé est le sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium). Le cycle tétrazolium qu'il contient est réduit, (principalement par la succinate déshydrogénase et d'autres déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes actives) en cristaux de formazan violets. La couleur du milieu change du jaune au bleu-violacé. L'intensité de cette coloration bleue est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes pour un temps donné et une concentration donnée, mais dépend aussi de leur activité métabolique.

Concrètement, à un temps voulu :

- ajout de 10 µL de MTT à 5 mg/mL dans chaque puits,
- incubation 4 h à 37°C sous 5% de CO_2,

- ajout de 100 µL de SDS pour solubiliser les cristaux de formazan,
- lecture de l'absorbance à 550 nm et à de 690 nm (mesure de référence).

Ce test permet de mettre en évidence la viabilité plus ou moins importante des cellules et calculer une CI_{50}. Pour ce calcul :

$$\%_{viab} = \frac{(A_{550} - A_{690}) - (A_{550\ mil+drug} - A_{690\ mil+drug})}{(A_{550\ cell} - A_{690\ cell}) - (A_{550\ mil} - A_{690\ mil})}\ X\ 100$$

Équation 1 : calcul du pourcentage de viabilité cellulaire.

$\%_{viab}$: pourcentage de viabilité cellulaire à une concentration donnée en substance pour un temps donné

A_{550} et A_{690} : moyenne des absorbances mesurées à 550 et 690 nm à une concentration donnée en substance sur une même colonne d'une plaque de culture

$A_{550\ mil + drug}$ et $A_{690\ mil + drug}$: moyenne des absorbances mesurées à 550 et 690 nm pour les témoins « milieu plus drogue » sur une même plaque de culture (colonne 2)

$A_{550cell}$ et $A_{690cell}$: moyenne des absorbances mesurées à 550 et 690 nm pour les témoins « cellules » sur une même plaque de culture (colonne 3)

$A_{550\ mil}$ et $A_{690\ mil}$: moyenne des absorbances mesurées à 550 et 690 nm pour les témoins « milieu » sur une même plaque de culture (colonne 1)

Une fois ces calculs de viabilité effectués, les concentrations en substance et les valeurs de viabilité encadrant la CI_{50} servent, via le logiciel Excel® et sa fonction « TENDANCE » à déterminer la valeur de la CI_{50} en prenant comme valeur cible un pourcentage de viabilité de 50 %.

1.3.2.3 **Test de cytotoxicité au Rouge Neutre**

Le test au rouge neutre (RN) est une méthode rapide de quantification des cellules vivantes (Borenfreund et Puerner, 1985). Ce test nécessitant des étapes d'ajout de réactifs mais aussi des étapes de lavage, il ne peut être utilisé que sur des lignées cellulaires adhérentes. En outre, toutes les lignées cellulaires ne répondent pas efficacement à ce test ; ainsi seules les lignées MRC5 et IGROV1 ont donné des résultats interprétables.

Il nécessite 1 plaque 96 puits pour chaque temps et chaque gamme de dilution de la drogue à tester.

Contrairement au test MTT, le test au RN ne permet pas d'évaluer la viabilité des cellules mais la cytotoxicité des substances testées. Le RN est un colorant vital, c'est-à-dire qu'il va pénétrer dans les cellules vivantes par un mécanisme actif ou passif. Il sera concentré dans les lysosomes des cellules vivantes alors que les cellules mortes resteront incolores. Ainsi une faible coloration rouge sera le signe d'un fort taux de mort cellulaire. Les réactifs utilisés pour ce test sont dans un premier temps une solution « use » de rouge neutre, préparée à partir d'une solution mère. On utilise pour sa préparation du milieu MEM sans rouge de phénol, de sorte que le rouge neutre, habituellement présent dans les milieux de culture, n'interfère pas lors de la lecture spectrophotomètrique. Dans un deuxième temps on utilise une solution d'extraction composée d'acide acétique, d'éthanol absolu et d'eau distillée.

Ainsi, à un temps voulu, il faut procéder comme suit :

- élimination du surnageant de culture,
- rinçage au PBS,
- ajout de 200 µL de solution « use » de Rouge Neutre,
- incubation 3 h à 37°C, sous 5% CO_2,
- trois rinçages au PBS,
- ajout de 200 µL de solution d'extraction.
- incubation 20 min. à 37°C, sous 5% CO_2.

Lecture de l'absorbance à 540 nm après agitation de la plaque.

$$\%_{cytotox} = 100 - \left(\left(\frac{(A_{540}) - (A_{540\ mil+drug})}{(A_{540\ cell}) - (A_{540\ mil})} \right) X\ 100 \right)$$

Équation 2 : calcul du pourcentage de cytotoxicité.

$\%_{cytotox}$: pourcentage de toxicité cellulaire à une concentration donnée en substance pour un temps donné

A_{540} : moyenne des absorbances mesurées à 540 nm à une concentration donnée en substance sur une même colonne d'une plaque de culture

$A_{540\ mil + drug}$: moyenne des absorbances mesurées à 540 nm pour les témoins « milieu plus drogue » sur une même plaque de culture (colonne 2)

$A_{540\ cell}$: moyenne des absorbances mesurées à 540 nm pour les témoins « cellules » sur une même plaque de culture (colonne 3)

$A_{540\ mil}$: moyenne des absorbances mesurées à 540 nm pour les témoins « milieu » sur une même plaque de culture (colonne 1)

Une fois ces calculs de toxicité effectués, les concentrations en substance et les valeurs de viabilité encadrant la CC_{50} servent, via le logiciel Excel® et sa fonction « TENDANCE » à déterminer la valeur de la CC_{50} en prenant comme valeur cible un pourcentage de toxicité de 50 %.

1.4 Evaluation de l'activité antivirale

1.4.1 Matériel et réactifs

Ils sont identiques à ceux utilisés pour la cytotoxicité (Tableau IX et Tableau X)

1.4.2 Détermination de l'activité antivirale

Cette évaluation consiste à mesurer la diminution du titre infectieux d'une suspension virale avant et après contact avec la substance à tester. Pour cela nous devons disposer d'une suspension de virus avec un titre viral le plus élevé possible. Il est donc intéressant de savoir quelle méthode de production virale permet d'obtenir les titres infectieux les plus élevés.

1.4.2.1 **Production des « pools » de virus**

1.4.2.1.1 Poliovirus

Nous avons essayé de déterminer le mode de production virale optimum permettant d'obtenir le titre viral le plus élevé.

- La méthode 1 ne conserve que les étapes indispensables des deux méthodes sélectionnées dans la littérature et qui sont présentées à sa suite. Cette méthode consiste à inoculer sur tapis monocouche à 90% de confluence de cellules VERO d'une flasque de 175 cm^2, 1 mL de suspension virale placée dans 15 mL

de MEM à 2%. Cet inoculum peut être jeté et remplacé après 5 min. de contact, et cela jusqu'à 4 fois de suite. Le flacon de culture est ensuite placé, avec son dernier inoculum, dans un incubateur à 37°C sous 5% de CO_2 durant 2 à 3 j. Le surnageant est alors récupéré dans un tube de 50 mL, centrifugé à 3645 G durant 5 min. afin d'éliminer les débris cellulaires.

- La méthode 2 est établie d'après la thèse de Geller (Geller, 2011). Cette méthode est similaire à la méthode 1 sauf que le surnageant viral obtenu après 2 ou 3 j d'incubation, subit 3 congélations/décongélations successives à -20°C afin de lyser les cellules et de libérer les particules virales, puis le surnageant est centrifugé à 3645 G durant 5 min afin d'éliminer les débris cellulaires.
- Selon la méthode 3 établie d'après la thèse de Julien Simonet (Simonet, 2007), 1 mL d'inoculât viral est laissé en contact avec la monocouche de cellules Vero durant 1 h (dans un incubateur à 5% de CO_2 et à 37°C) ce qui permet la fixation du virus sur les récepteurs cellulaires. Après addition de 30 mL de MEM à 2% de SVF, la boîte de culture est incubée 2 à 3 j à 37°C, sous atmosphère à 5% de CO_2. Le surnageant subit ensuite 3 congélations /décongélations successives à -20°C avant d'être centrifugé à 10 000 G durant 60 min afin d'éliminer les débris cellulaires.

Dans tous les cas, la suspension virale sera aliquotée et congelée dans des cryotubes à -80°C. Afin de conserver les caractéristiques biologiques de la souche virale (dont l'aspect de souche « atténuée »), seuls 10 passages de la souche d'origine sont permis pour la souche vaccinale du poliovirus (AFNOR, 2007).

1.4.2.1.2 Cytomégalovirus humain

- Lors d'une première tentative de production virale, le virus a été inoculé lorsque les cellules MRC5 étaient à plus de 90% de confluence. Un effet cytopathogène (ECP) et une lyse du tapis cellulaire ont été constatés respectivement à J17 et J19 ; soit après plus de 3 semaines d'inoculation. Afin d'augmenter la surface de contact virus/cellule et l'infectiosité, une telle confluence des cellules ne doit pas être obtenue avant inoculation.
- Le hCMV est inoculé sur une boîte de culture de 175 cm^2 présentant 70% de confluence, de la façon suivante. Tout d'abord, le milieu de culture est éliminé par retournement. Puis un lavage avec 10 mL de PBS est réalisé. Une suspension virale de 2 mL est incubée pendant 1 h à 37°C afin de permettre la fixation du

virus aux cellules. Ensuite 15 mL de MEM à 2% de SVF sont ajoutés ce qui permet de recueillir les virions produits.

- Trois récoltes successives sont réalisées à des états de lyse différents du tapis cellulaire. Le premier ECP est observé dès 4 jours après inoculation, la lyse à 8 jours après inoculation. Le surnageant est prélevé en totalité les $4^{éme}$, $6^{éme}$ et $8^{éme}$ jour. Il est remplacé par du milieu de culture frais lors des deux premiers prélèvements. Chaque surnageant est centrifugé à 3645 G durant 5 min en tube de 50 mL afin d'éliminer les débris cellulaires. Ils sont ensuite aliquotés en cryotube et congelés à -80°C.

1.4.2.2 **Molécules de référence**

Avant de commencer les essais sur les terpènes, la manipulation doit être validée par l'utilisation de molécules dont l'activité virucide est connue. La norme NF EN 14476+A1 mentionne uniquement le formaldéhyde 1,4% comme molécule de référence mais elle autorise l'utilisation d'autres produits « adéquats ».

Afin de définir une molécule de référence pour notre modèle, nous avons donc choisi de tester :

- le formaldéhyde (proposé par la norme),
- l'éthanol,
- le glutaraldéhyde.

Les concentrations testées seront choisies selon les résultats des tests de viabilité au MTT.

1.4.2.3 **Titrages viraux**

L'infectiosité virale est la capacité de multiplication d'un virus dans une lignée de cellules permissives (AFNOR, 2007 ; Agut *et al.*, 2003). Le titre du virus représente le nombre de particules virales infectieuses par unité de volume d'un surnageant de culture cellulaire ; il s'agit d'une évaluation chiffrée de l'efficacité infectieuse de la suspension virale.

Le poliovirus possède un ECP précoce et une lyse cellulaire visible dès 96 h Par contre, le délai d'attente de la lyse du tapis cellulaire infecté par le hCMV pouvant atteindre 1 mois, il sera nécessaire de procéder à une coloration et à une lecture au microscope inversé pour évaluer l'ECP et donc identifier et comptabiliser les puits infectés ou non.

En outre, la lyse cellulaire ne sera pas atteinte car les cellules MRC5 ne survivront pas aussi longtemps (1 mois) en microplaque.

Deux grands types de tests permettent la détermination du titre viral et de définir 2 grandeurs différentes :

- $DICC_{50}$: c'est la Dose Infectieuse en Culture de Cellules permettant la destruction de 50% des cellules en culture. Il s'agit donc de l'inverse de la dilution de la suspension virale testée permettant la lyse de 50% des cellules en culture rapportée à 1 mL de suspension virale.
- UFP : Unités Formant Plages. Il s'agit donc du nombre de plages formées dans un test de culture en milieu semi-solide rapporté à 1 mL de suspension virale (AFNOR, 2007).

Pour comparaison, les deux tests ont été mis en œuvre. Cependant le test $DICC_{50}$, plus aisé à mettre en œuvre, est le seul que nous avons utilisé pour l'évaluation de nos AHPTs.

1.4.2.3.1 Détermination du titre viral en microplaque

Pour ce titrage, après récolte des cellules, les étapes sont :

- ensemencement des colonnes 2 à 12 d'une plaque 96 puits à 10^4 cellules par puits,
- incubation 48h à 37°C sous 5% de CO_2,
- dilution sériée d'ordre 10 du virus (de 10^{-2} à 10^{-11}),
- incubation 4 jours (polio) ou 7 jours (hCMV) à 37°C sous 5% de CO_2,
- coloration des puits au cristal violet (polio) ou MGG (hCMV),
- lecture à l'œil nu pour le poliovirus et au microscope pour le hCMV.

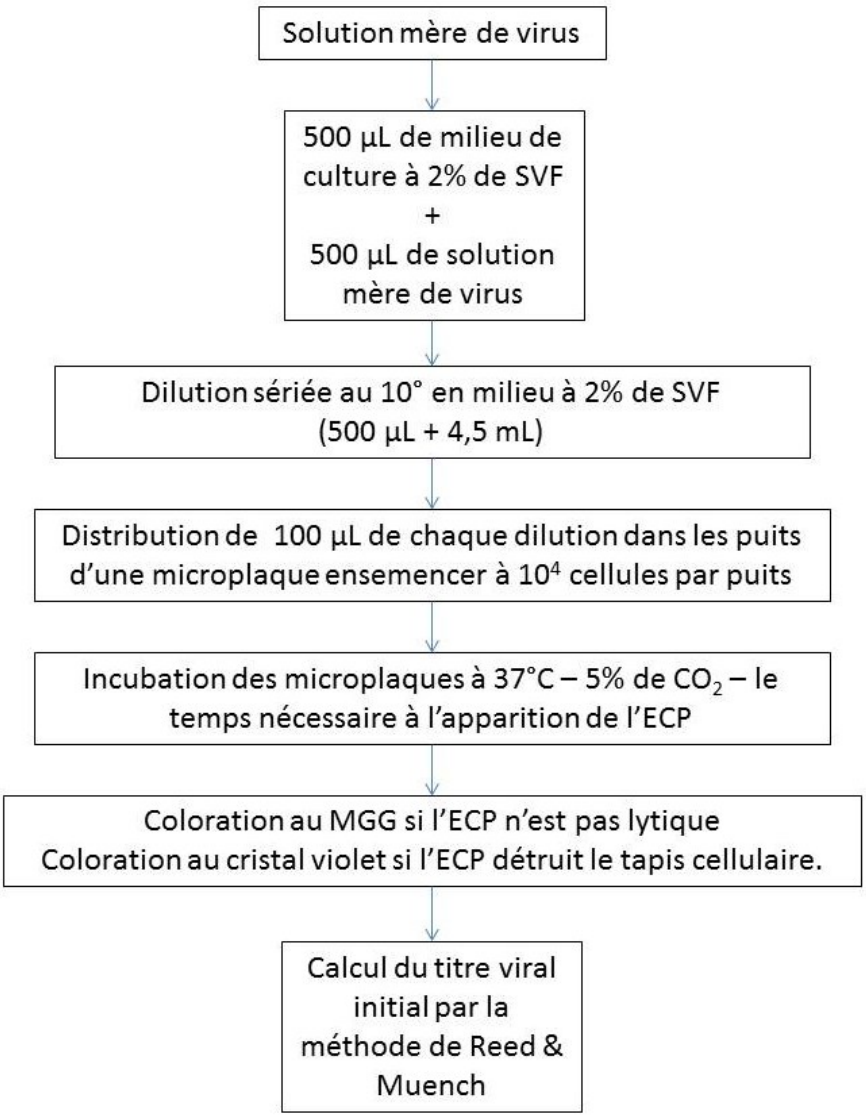


Figure 20 : Schéma du mode opératoire pour la détermination du titre viral selon la méthode de Reed & Muench (Reed et Muench, 1938)

La méthode de Reed et Muench (Reed et Muench, 1938) est employée pour évaluer le titre viral ou $DICC_{50}$ (Dose infectant 50% des cellules en culture) exprimé en particules virales infectieuses/mL. La limite inférieure de détection de la méthode par dilutions limites est théoriquement de 50 particules infectieuses/mL, sans dilution préalable de la suspension virale. En diluant cette dernière au $1/10^{ème}$ comme cela a été fait dans le cadre du titrage, la limite inférieure de détection est de 500 particules infectieuses/mL.

1.4.2.3.2 Titrage viral par la méthode plage de lyse

La norme NF EN 14476+A1 détaille cette technique uniquement pour le poliovirus (AFNOR, 2007). Des plaques en plastique stériles à 6 puits d'un diamètre de 35 mm

sont utilisées. Cette méthode est une alternative au titrage du virus sur un tapis monocellulaire préétabli en microplaques et des résultats similaires doivent être trouvés. Le même mode opératoire est utilisé pour déterminer le titre viral du poliovirus et du hCMV.

Succinctement :

- ensemencement d'une plaque 6 puits à 2.10^4 cellules par puits,
- incubation 48 h à 37°C sous 5% de CO_2, afin d'obtenir une confluence de 90%
- rinçage des cellules avec 1 mL de PBS,
- dilution sériée d'ordre 10 du virus (de 10^{-2} à 10^{-11}),
- dépôts, sous agitation lente de 400 µL par puits des différentes dilutions,
- vidage des puits,
- dépôt de 4 mL d'un mélange d'agarose fondu à 2% (2 mL) et de MEM 2X à 4% de SFV (2 mL),
- incubation 4 jours à 37°C sous 5% de CO_2,
- fixation des cellules par injection de 2 mL de formaldéhyde à 37% sous la couche de gélose,
- vidage des puits après 2 heures
- coloration des puits au cristal violet,
- comptage des plages de lyses.

L'agitation lente sert à maintenir l'humidité des cellules en monocouche pour éviter la mort des cellules sur les bords des puits et la formation d'un « croissant de séchage ».

Une formule permet de déterminer l'Unité Formant Plage :

$$\frac{UFP}{t} = \frac{\sum(c1 + c2 + c3 + \cdots + cn)}{[\sum(n1 + n2\ X\ v2 + n3\ X\ v3 + \cdots + nn\ X\ vn)\ X\ d]}$$

Équation 3 : formule permettant de déterminer l'Unité Formant Plage.

Où :

t est le volume d'essai ajouté par étape de dilution à chaque unité de culture cellulaire.
cn est le nombre d'UFP de chaque étape de dilution avec des plages de lyse non confluentes.
nn est le nombre de toutes les unités de culture cellulaire de chaque dilution pour laquelle les UFP sont comptées.
vn est le facteur de dilution entre n1 / nn.
d est l'étape de dilution de c1.

Son logarithme décimal peut être calculé. Le volume de dilution virale ajouté par puits est 0,4 mL, ce qui permet de déterminer le nombre d'unité formant plage par mL (UFP/mL).

1.4.2.3.3 Détermination d'activité antivirale : mode opératoire

Les titres viraux utilisés sont de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-7} pour le poliovirus et de 10^{-7} à 10^{-9} pour le hCMV.
Par choix, le titrage viral est réalisé en plaques de culture cellulaire de 96 puits à fond plat quelque soit le virus considéré. Les plaques de culture sont inoculées avec un nombre de 10^4 cellules/puits. Le titre viral est évalué par la méthode de Reed & Muench.

Cela revient à effectuer 2 déterminations de titre viraux en parallèle (Figure 21) (trois si l'on utilise un co-solvant) l'une avec et l'autre sans étape préalable de contact avec une substance à tester. Le temps de contact étant une donnée influençant l'activité, celui-ci doit être identique pour l'ensemble des molécules testées si l'on souhaite pouvoir comparer les résultats entre eux.

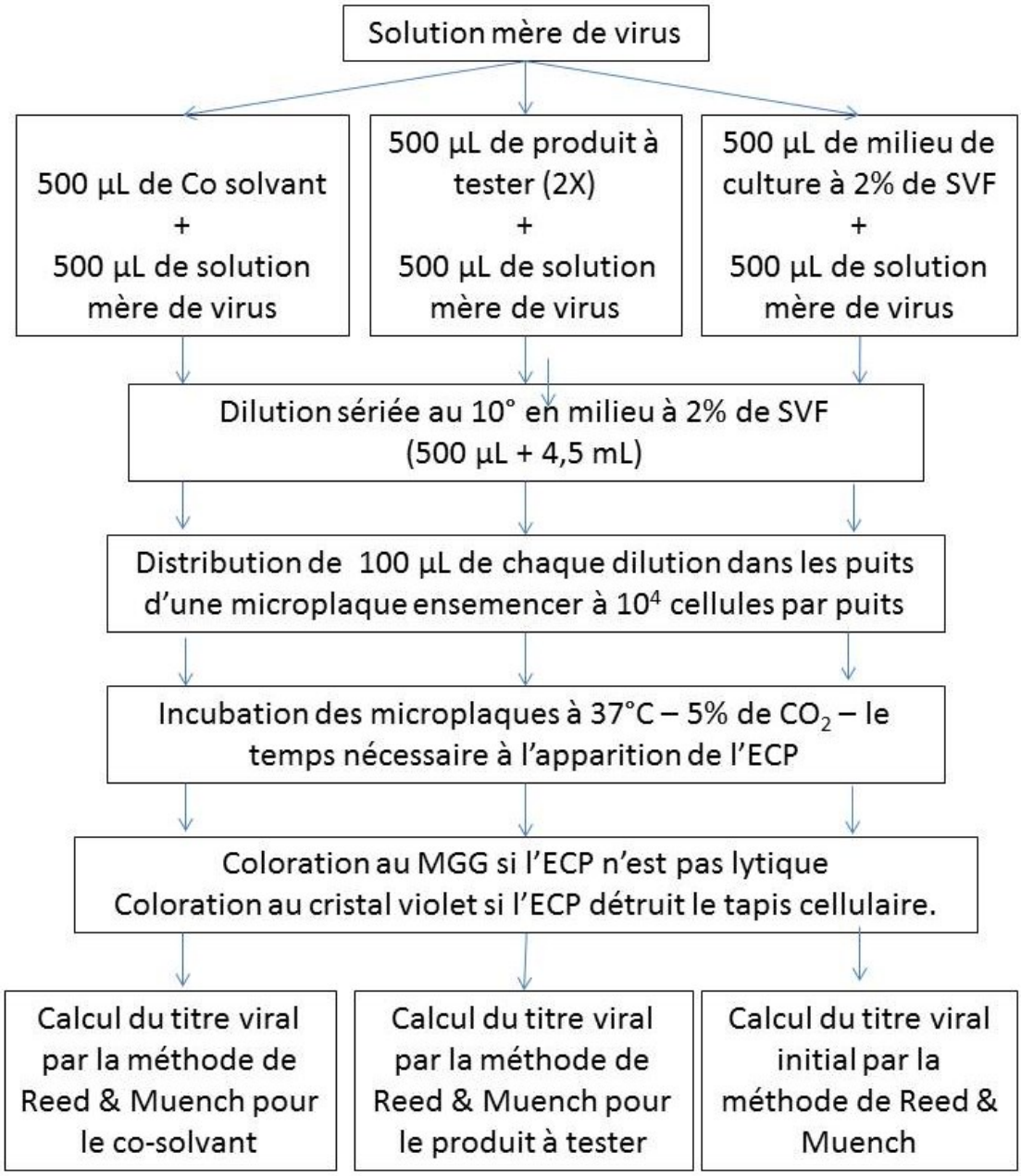


Figure 21 : Schéma du mode opératoire pour la détermination de l'activité antivirale du produit à tester.

1.5 Expérimentation antifongique

1.5.1 Matériel et réactifs

Tableau XI : Matériel spécifique à la culture de champignons.

Matériel	Références	Fournisseurs
Balance de précision	BP211D	Sartorius
Cellule de Malassez double, grille de 5 mm²	720.0149	VWR
Centrifugeuse de paillasse réfrigérée	5804R	Eppendorff
Filtre seringue, membrane PES, 0,22 µm, 33 mm	SLGP033RS	Millipore
Microtube, 2 mL, polypropylène, stérile	72.694.406	Sarstedt
Réservoir à réactif à fond en V	613.2671	Thermo Scientific
Réservoir à réactif, 8 compartiments	613.2672	Thermo Scientific
Seringue 10 mL, 3 pièces, stérile	302188	BD bioscience
Microscope droit visible et fluorescence	Axiscop	Zeiss
Camera	Axiocam	Zeiss
Lecteur de microplaques	Multiskan EX	Thermo Scientific
PSMII	PSM1200	Fisher
Microplaque 96 puits pour culture fonds en U	83.1835.300	Sarstedt

Tableau XII : Réactifs spécifique à la culture de champignons.

Réactifs	Références	Fournisseurs
Sabouraud bouillon	238230	Difco
Sabouraud gélosé	210950	Difco
Milieu RPMI 1640	51800-043	Invitrogen
DMSO	BP231-100	Fisher
PBS		
Amphotéricine B (250 µg/mL).	A2942-50mL	Sigma-Aldrich
Itraconazole (98 %)	I6657-100mg	Sigma-Aldrich
Bleu de trypan	15250-061	Gibco
Tween 20	P1379	Sigma-Aldrich

1.5.2 Détermination de la concentration minimum inhibitrice

1.5.2.1 **Préparation des suspensions « fongiques »**

Le milieu Sabouraud est le milieu habituellement utilisé pour la culture, l'isolement et l'identification des levures et des moisissures saprophytes ou pathogènes (Sautour *et al.*, 2008) et même si le CLSI lui préfère le RPMI1640, il continue de proposer ce milieu pour les « sub'culture » dans sa section M44A ! (Mathur *et al.*, 2011).

Le milieu RPMI 1640 est un milieu synthétique liquide sans bicarbonate contenant de la L-Glutamine et tamponné à pH 7,0 par le MOPS (acide N-morpholino-3-propane

sulfonique) et supplémenté avec du glucose jusqu'à une concentration finale de 2% ($^{m}/_{v}$).

Le RPMI 1640 modifié (sans bicarbonate) est le milieu de référence préconisé par le CLSI et l'EUCAST pour la détermination des CMI.

C'est pourquoi nous avons décidé de tester ces deux milieux de culture lors de la mise en place des tests d'activité antifongique au laboratoire.

1.5.2.1.1 Préparation de l'inoculum en milieu Sabouraud

1.5.2.1.1.1 Candida albicans

Candida albicans est mis en culture sur gélose Sabouraud puis incubé 24 h à 35°C. Une colonie du jour antérieur est ensemencée dans 5 mL de bouillon Sabouraud puis incubée 24 h à 35°C afin de former la suspension qui servira à l'inoculation.

Le mode opératoire est le suivant :

- mise en culture de 5 mL de bouillon Sabouraud,
- incubation 24 h à 35°C,
- coloration au bleu trypan et comptage en cellule de Malassez,
- ajustement de la suspension fongique entre 1 et 5 x 10^5 UFC/mL,
- inoculation avec 50 µL par puit afin d'obtenir 0,5 à 2,5 x 10^5 UFC/mL final.

1.5.2.1.1.2 Aspergillus niger

Aspergillus niger est mis en culture sur gélose inclinée Sabouraud, jusqu'à sporulation (3 à 5 jours).

Le mode opératoire est le suivant :

- récolte des spores avec 5 mL de Sabouraud liquide ou 5 mL d'eau,
- comptage des spores en cellule de Malassez,
- ajustement de la suspension fongique entre 1 et 5 x 10^5 spores/mL,
- inoculation avec 50 µL par puit afin d'obtenir 0,5 à 2,5 x 10^5 spores/mL final.

1.5.2.1.2 Préparation de l'inoculum selon les recommandations de l'EUCAST

1.5.2.1.2.1 Candida albicans

Candida albicans est mis en culture sur gélose Sabouraud puis incubé 24 h à 35°C.

Le jour de la manipulation le mode opératoire est le suivant :

- prélever 5 colonies sur la gélose du jour précédent,
- disperser ces colonies dans 5 mL d'eau distillée,
- colorer au bleu trypan et compter en cellule de Malassez,
- diluer afin d'obtenir une suspension fongique entre 1 et 5 x 10^5 UFC/mL.
- inoculer avec 50 µL par puit afin d'obtenir 0,5 à 2,5 x 10^5 UFC/mL final.

1.5.2.1.2.2 Aspergillus niger

Aspergillus niger est mis en culture sur gélose inclinée Sabouraud, jusqu'à sporulation (3 à 5 jours).

Le jour de la manipulation :

- récolter les spores avec 5 mL d'eau supplémentée avec du Tween 20 à 0,1 %,
- compter les spores en cellule de Malassez,
- ajustement de la suspension fongique entre 1 et 5 x 10^5 spores/mL,
- inoculation avec 50 µL par puit afin d'obtenir 0,5 à 2,5 x 10^5 spores/mL final.

1.5.2.2 **Préparation des dilutions de drogues**

Les différentes recommandations en termes d'étude des CMI sur des champignons laissent une grande liberté à l'expérimentateur. Il est ainsi possible de préparer les solutions de molécules à tester dans le milieu de culture utilisé, dans de l'eau, dans une solution saline comme le PBS et ceci en présence ou en absence de co-solvant comme par exemple du DMSO.

Nous avons ainsi voulu déterminer entre l'eau et le PBS quel était le meilleur solvant de préparation. Compte tenu de notre expérience en bactériologie, les milieux de culture ont été éliminés d'office. En effet leur forte charge en sels et leur pH tamponné sont deux facteurs des plus limitants quand les molécules à tester ont une hydrosolubilité limitée. Dans un deuxième temps, et suite à certaines observations lors de la

détermination des CMI, nous avons souhaité faire le point sur l'influence du PBS et du DMSO sur la croissance fongique dans les conditions opératoires.

- Préparation de la solution d'amphotéricine B

A partir d'une solution commerciale stérile d'amphotéricine B à 250 µg/mL, on prépare une solution de travail à 8 µg/mL utilisant comme solvant le PBS ou l'eau afin d'obtenir une gamme de concentrations de 2 à 0,0075 µg/mL.

- Préparation de la solution d'itraconazole

Une solution mère d'itraconazole est préparée à partir de la poudre commerciale à 98%, diluée en DMSO 0,5%. A partir de cette solution mère, une solution de travail à 64 µg/mL est obtenue en utilisant comme solvant de l'eau, et ce afin d'obtenir une gamme de concentrations de 16 à 0,06 µg/mL.

- Préparation de la solution du DMSO

Le DMSO est préparé à 20% ($^{v}/_{v}$) en eau puis utilisé afin d'obtenir une gamme de concentrations de 5 à 0,019 %.

- Préparation de la solution du PBS

Le PBS est préparé à une concentration 4 fois supérieure afin de pouvoir tester une gamme de concentrations de 50 à 0,39 % ($^{v}/_{v}$) dans les plaques.

- Préparation des solutions d'AHPTs

Les solutions d'AHPTs ont été préparées en milieu Sabouraud. L'utilisation de DMSO comme co-solvant est nécessaire pour l'obtention des concentrations voulues (1024 µg/mL) en AHPTs. Ces concentrations sont très élevées par rapport au seuil de solubilité des AHPTs dans l'eau, mais ces valeurs ont été choisies de façon à se placer dans des concentrations similaires à celles proposées dans les recommandations et celles testées dans la littérature. Les gammes choisies de 256 à 1 µg/mL sont les mêmes que lors de la détermination de CMI avec les bactéries.

1.5.2.3 **Dépôt des microplaques**

La préparation des plaques est commune à chaque manipulation et identique à celle des tests bactériologiques (Figure 18 p. 77).

- Distribution du milieu :
  - 100 µL dans chacun des puits de la colonne 1.
  - 150 µL dans chacun des puits de la colonne 2.

- 50 µL dans chacun des puits des colonnes 3 à 12.

- Distribution de la drogue à tester
  - 50 µL dans chacun des puits de la colonne 2, puis après aspirations/refoulements, élimination de 100 µL, dans l'eau de javel.
  - 50 µL dans chacun des puits de la colonne 4, puis réaliser les dilutions en reportant 50 µL dans les puits suivants après aspiration/refoulements, élimination des 50 µL de chacun des puits de la colonne 12 dans eau de javel.
- Distribution de l'inoculum
  - 50 µL dans chacun des puits des colonnes 3 puis 12 à 4.
  - la concentration finale de l'inoculum dans chacun des puits est 0,5 à 2,5 105 UFC/mL.
  - volume final de chaque puits: 100 µL.

De la façon identique au protocole de détermination d'activité antibactérienne, nous avons réservé 3 colonnes de puits à la réalisation de témoins :

- colonne 1 : témoin milieu,
- colonne 2 : témoin milieu + drogue, dans ce contrôle on peut observer les possibles interactions entre la drogue et le milieu utilisé,
- colonne 3 : témoin milieu + fungi, ce contrôle permet de comparer la bonne croissance des microorganismes,

Les colonnes 4 à 12, contenant la gamme de concentrations à tester.

- Lecture et interprétation des résultats

Les plaques ainsi ensemencées sont placées dans une étuve à 28°C ou 37°C pendant 24 ou 48 h La lecture se fait à 24 et 48 heures par turbidimétrie à 540 nm après agitation à 1020 rpm pendant 30 secondes dans un lecteur des microplaques.

1.6 Expérimentation anticancéreuse

Les milieux utilisés lors des cultures ont été les suivants :

- MEM pour les cellules MRC5 et IGR-OV1,
- Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI1640) pour les cellules K562.

1.6.1 Matériel et réactifs

Ce matériel et ces réactifs sont identiques à ceux utilisés pour les tests de cytotoxicité ; Tableau IX pour le matériel et Tableau X pour les réactifs.

1.6.2 Etudes d'efficacité

Il s'agit ici de déterminer l'efficacité des molécules à tuer des cellules cancéreuses. Il convient donc de tester leur pouvoir cytotoxique. Les expériences menées ici seront donc identiques à celles menées en 1.3.2.2. (Test de vitalité au dimethylthiazolyl diphenyl tetrazolium p. 83).

Cependant, nous avons utilisé ici non plus des lignées cellulaires « saines » mais des lignées de cellules cancéreuses. Les valeurs de CI_{50} obtenues sur ces lignées cancéreuses sont ensuite mises en comparaison avec les CI_{50} obtenues sur lignée cellulaire saine, ici les MRC5.

De la même façon que pour la bactériologie les index de sélectivité sont calculés : (IS= $CI_{50\ \text{lignée cellulaire saine}}$ / $CI_{50\ \text{lignée cellulaire cancéreuse}}$).

2 Etudes physico-chimiques

2.1 Caractérisation de la complexation des acides hydroxy pentacycliques triterpénoiques par chromatographie liquide haute performance

2.1.1 Matériel et réactifs

Tableau XIII : Matériel utilisé pour la caractérisation de la complexation des AHPTs.

Matériel	Références	Fournisseurs
Système "choix de la cyclodextrine"		
Pompe	P100 Spectraseries	Thermo (Waltham, Massachusetts)
Injecteur automatique avec four	AS 1000XR	Thermo (Waltham, Massachusetts)
Colonne 1	Hypersil GOLD C18 (5 µm, 150X4,6 mm)	Thermo (Waltham, Massachusetts)
Colonne 2	Nucleosil C18 (5 µm, 150X4,6 mm)	Macherey-Nagel (Hoerdt, France)
Détecteur UV	UV100 Spectraseries	Thermo (Waltham, Massachusetts)
Système "Kf-thermodynamique"		
Dégazeur	Spectrasystem SCM1000	Thermo (Waltham, Massachusetts)
Pompe	Spectrasystem P1000XR	Thermo (Waltham, Massachusetts)
Vanne d'injection	Model 8125	Rheodyne (Middleborough, Massachusetts)
Colonne 3	C18 silica Lichrospher® 100 RP-18 column (5 µm, 125X4 mm)	Merck (Darmstadt, Allemagne)
Four	560CIL	Cluzeau (Courbevoie, France)
Détecteur UV	UV1000	Thermo (Waltham, Massachusetts)
Système "Higuchi-Connors"		
Pompe	L7100	Merck Hitachi (Darmstadt, Allemagne)
Injecteur automatique	L7200	Merck Hitachi (Darmstadt, Allemagne)
Colonne 2	Nucleosil C18 (5 µm, 150X4,6 mm)	Macherey-Nagel (Hoerdt, France)
Four	T6300	Merck Hitachi (Darmstadt, Allemagne)
Détecteur UV	L7450	Merck Hitachi (Darmstadt, Allemagne)
Logiciel d'acquisition	AZUR	Datalys, France
Aerotron		Infors HT (Bottmingen, Suisse)
Filtre nylon 0,45 µM		Macherey-Nagel (Düren, Allemagne)

Tableau XIV : Réactifs utilisés pour la caractérisation de la complexation des AHPTs.

Réactifs	Références	Fournisseurs
Acétonitrile	HPLC grade	Carlo Erba (Limito, Italie)
AB	85,505-7	Aldrich (Saint Louis, Missouri)
AO	O5504	Sigma (Saint Louis, Missouri)
AU	290182500	Acros organics (Geel, Belgique)
D-glucose		Merck (Darmstadt, Allemagne)
Eau ultra-pure 18 mΩ	Milli-Q, Water Purification System	Millipore (Molsheim, France)
H_3PO_4		Sigma (Saint Louis, Missouri)
HP-β-CD		Wacker (Munich, Allemagne)
HP-γ-CD		Wacker (Munich, Allemagne)
Méthanol	HPLC grade	Chromanorm
Na_2HPO_4, $2H_2O$		Merck (Darmstadt, Allemagne)
β-CD		Wacker (Munich, Allemagne)
γ-CD		Wacker (Munich, Allemagne)

2.1.2 Méthodes

2.1.2.1 **Choix de la cyclodextrine**

Le choix de la CD a été réalisé par CLHP. Pour cela, nous avons utilisé initialement la colonne 1 et les conditions opératoires décrites par Claude (Claude *et al.*, 2004) soit :

- une phase mobile variant dans un rapport de 55/45 $^{v}/_{v}$ à 70/30 $^{v}/_{v}$ acétonitrile/tampon phosphate (acide phosphorique 20 mM – hydroxyde de sodium 18,9 mM – pH 3,5)
- une concentration en cyclodextrine variant de 2 à 12 mM,
- un débit de 1 mL/min,
- une température de 25°C

Les masses de cyclodextrines sont pesées exactement puis dissoutes dans 500 mL de solution tampon à l'aide d'un bain à ultrasons. Les 500 mL d'acétonitrile sont ajoutés à cette solution et la phase mobile totale est mélangée et filtrée.

Ces conditions opératoires de CLHP ne se sont pas montrées optimales et la méthodologie de CLHP a dû être optimisée selon les conditions opératoires suivantes :

- une phase 50% acétonitrile, 50% tampon phosphate ($^{v}/_{v}$). La solution tampon est composée de Na_2HPO_4, $2H_2O$ à la concentration de 3,56g/L. Son pH est ajusté à 3,0 avec H_3PO_4. Cette solution tampon est filtrée sur membrane nylon 0,45 µm avant utilisation.
- la colonne 2
- différentes concentrations (0, 1, 2, 3, 4 mM) en CDs (β-CD, HP-β-CD, γ-CD, HP-γ-CD)
- un débit de 3 mL/min,
- une température de 50°C

Les solutions échantillons de triterpènes sont préparées à 1 mg/mL dans le méthanol, puis diluées au 10ème dans de la phase mobile sans CD. Elles sont injectées grâce à une boucle de 20 µL.

Chaque soluté a été injecté trois fois et l'acquisition et l'enregistrement des données sont réalisés à l'aide d'un logiciel spécifique.

Les facteurs de capacité correspondants ont été calculés (k' ± SD). k' est une grandeur indépendante du débit comme le montre l'Équation 4.

$$k' = \frac{t - t_0}{t_0}$$

Équation 4 : Définition du facteur de rétention en CLHP.

Avec k' facteur de capacité
t : temps de rétention du composé étudié
t_0 : temps de rétention d'un composé non retenu (ou encore temps mort).

En supposant que chaque molécule de AHPT forme un complexe 1/1 avec la CD (Claude *et al.*, 2004), l'équilibre suivant peut être envisagé :

$$AHPT + CD \Leftrightarrow APHT\text{-}CD$$

Équation 5 : équilibre AHPT / CD.

Lorsque la CD est ajoutée à la phase mobile, le facteur de capacité des solutés, est affecté tel que décrit par l'équation 6 pour un complexe 1:1 (Mosheni et Hurtubise, 1990 ; Uekama *et al.*, 1978).

$$\frac{1}{k'} = \frac{1}{k'_0} + \frac{K_f\,[(CD)]}{k'_0}$$

Équation 6 : relation entre k', k'_0 et K_f.

Où :

k'_0 est le facteur de capacité sans CD,

[(CD)] est la concentration en CD dans la phase mobile,

et K_f est la constante de formation apparente du complexe.

Selon l'Équation 6, le tracé de 1/k' en fonction [(CD)] est une relation linéaire et reflète un complexe AHPT-CD avec une stœchiométrie 1:1. Le rapport (pente / ordonnée à l'origine) permet :

- la détermination de Kf,
- le choix de la cyclodextrine.

2.1.2.2 Détermination des constantes de complexation et des paramètres thermodynamiques de formation des complexes acides hydroxy pentacycliques triterpénoiques – gamma-cyclodextrine

Les conditions opératoires précédemment utilisées pour injecter les AHPTs dans différentes conditions de phase liquide, ont été modifiées afin de pouvoir étudier l'influence de la variation de température sur la formation des complexes. En effet, la γ-CD n'étant plus soluble dans la phase mobile acétonitrile/tampon à des températures inférieures à 50°C, l'acétonitrile a dû être remplacé par le méthanol.

Dans ce but, l'appareillage utilisé a permis de faire varier la composition de la phase mobile grâce à une pompe ternaire qui réalise le mélange des trois composants suivants :

- Solution tampon phosphate (même composition que précédemment)
- Méthanol
- Solution tampon phosphate de γ-CD à la concentration de 35,6 mM.

Le mélange de ces trois composants a permis d'obtenir une phase mobile composée de 88% de méthanol et 12% de tampon phosphate avec une concentration variable de 0 à 4 mM en γ-CD (0, 1, 2, 3, et 4 mM).

Afin de vérifier qu'une variation du facteur de rétention des AHPTs est liée à un phénomène de complexation avec la γ-CD et non à l'augmentation de la viscosité de la solution du fait de l'ajout de γ-CD, la γ-CD a été remplacée par l'α D-glucose. Cette vérification n'a été réalisée que pour la plus forte concentration en γ-CD qui correspond à une concentration de 32,0 mM en α D-glucose.

Le débit de la phase mobile est de 1 mL/min et a été systématiquement contrôlé lors des expérimentations.

Pour étudier l'effet de la température sur le processus de complexation des AHPTs par la γ-CD, la température de la phase stationnaire a varié de 25 +/-1°C à 45 +/-1°C (25, 30, 35, 40, 45°C) à l'aide d'un four à colonne. La colonne est équilibrée avant chaque utilisation et la pression stabilisée est inférieure à 150 bars. Le temps mort de la colonne t_0 a été déterminé à l'aide d'une solution de sulfate de cuivre (0,01 mg/mL) comme décrit par Clarot *et coll.* (Clarot *et al.*, 2001).

Chaque soluté a été injecté trois fois et les facteurs de capacité correspondants (k') ont été calculés ainsi que les constantes de formation K_f des complexes formés.

Le tracé de k' en fonction de la température permet d'obtenir des droites dont les pentes et ordonnées à l'origine sont utilisées pour calculer les paramètres thermodynamiques (ΔH_0, ΔS_0) du phénomène de complexation.
La relation thermodynamique représentée dans l'équation 7 (Mosheni et Hurtubise, 1990) a été employée pour déterminer la variation d'enthalpie standard (ΔH_0) et la variation d'entropie standard (ΔS_0) qui caractérisent le transfert de l'AHPT de la phase mobile à la cavité de la γ-CD (Clarot *et al.*, 2001).

$$Ln\ K_f = -\frac{\Delta H_0}{RT} + \frac{\Delta S_0}{R}$$

Équation 7 : relation de Van't Hoff.

Où :

K_f est la constante de formation apparente du complexe d'inclusion,

R est la constante des gaz parfaits

et T la température exprimée en kelvin (K).

Si l'on trace $Ln(K_f)$ en fonction de 1/T (relation de Van't Hoff), la pente et l'ordonnée à l'origine sont respectivement - $\Delta H_0/R$ et $\Delta S_0/R$.

Pour la détermination de la différence d'énergie libre de Gibbs, qui a lieu pendant le processus d'inclusion, l'équation 8 est utilisée.

$$\Delta G_0 = \Delta H_0 - T\Delta S_0$$

Équation 8 : second principe de la thermodynamique.

ΔG_0 : variation d'énergie libre

ΔH_0 : variation d'enthalpie

ΔS_0 : variation d'entropie

T : température.

2.1.2.3 Détermination de la solubilité des complexes acides hydroxy pentacycliques triterpénoiques – gamma-cyclodextrine par la méthode de Higuchi-Connors

La méthode de Higuchi et Connors (Higuchi et Connors, 1965) permet de déterminer quel type de complexe est obtenu en fonction de sa solubilité soit :

- des complexes d'inclusion solubles : complexe que l'on peut dissoudre avec une dissociation minimum dans un solvant considéré,
- des complexes d'inclusion avec une faible solubilité : complexe que l'on peut difficilement dissoudre sans dissociation dans un solvant considéré,
- des complexes de solubilité limitée : complexe que l'on ne peut pas dissoudre sans dissociation dans un solvant considéré,
- des complexes insolubles : complexe que l'on ne peut pas dissoudre même en les dissociant dans un solvant considéré.

Pour l'étude de solubilité des complexes AHPTs :γ-CD selon cette méthode, le système chromatographique (Tableau XIII) a bénéficié d'un passeur d'échantillons automatique.

La formation des complexes AHPTs : γ-CD a été la suivante :

Étant donné l'insolubilité des AHPTs étudiés en phase aqueuse, ces derniers ont été apportés sous forme solide. Pour ce faire, une masse de 1 mg d'AHPT a été introduite dans chaque tube afin que sa concentration molaire finale soit en excès, ou en équivalence à celle de la γ-CD.

La γ-CD a été apportée en solution aqueuse à différentes concentrations (de 0 à 8 mM). Tous les tubes ont été complétés avec de l'eau ultra pure afin d'avoir des concentrations toutes identiques en AHPT (2 mM).

Ces suspensions ont été agitées à 30°C pendant 7 jours à l'aide de l'Aerotron à 420 rpm. Une fois l'équilibre atteint, les tubes ont été centrifugés et la concentration en AHPT du surnageant a été déterminée par analyse CLHP. Chaque expérience a été réalisée trois fois (écart type <5%).

Le mode opératoire schématique de cette formation est présenté dans la figure suivante :

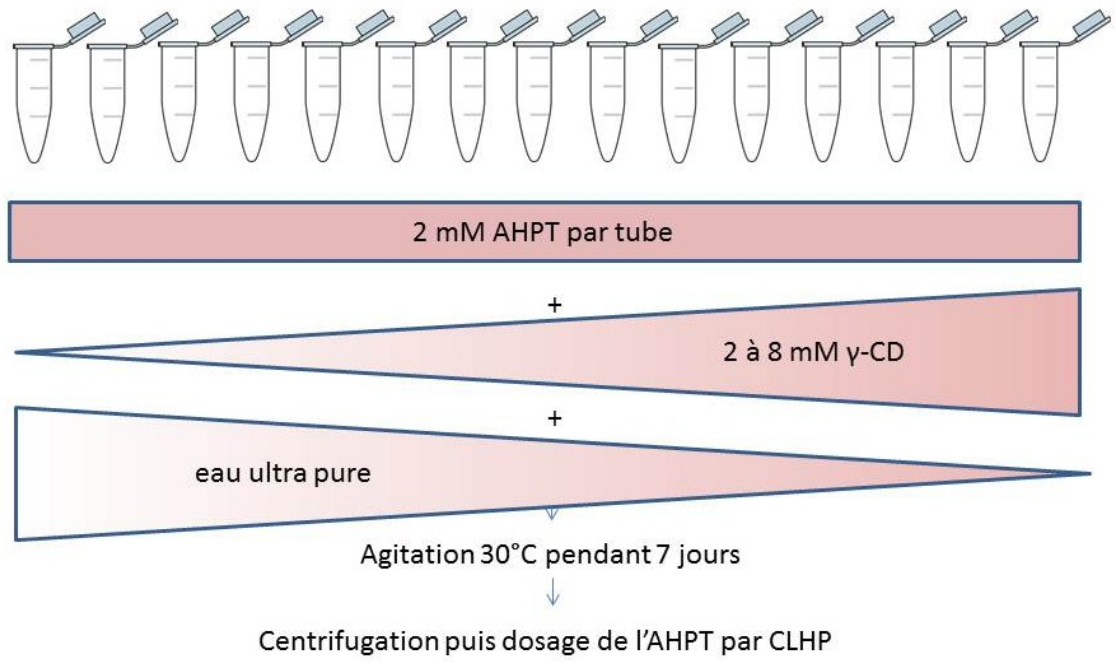


Figure 22 : Mode opératoire schématique de la formation en phase aqueuse des complexes en fonction de la concentration en γ-CD

Ensuite, la courbe représentant la concentration en AHPT en solution en fonction de la concentration en γ-CD dans la phase aqueuse est tracée. Selon Higuchi et Connors, le type de courbe obtenue donne la solubilité du complexe (Figure 23).

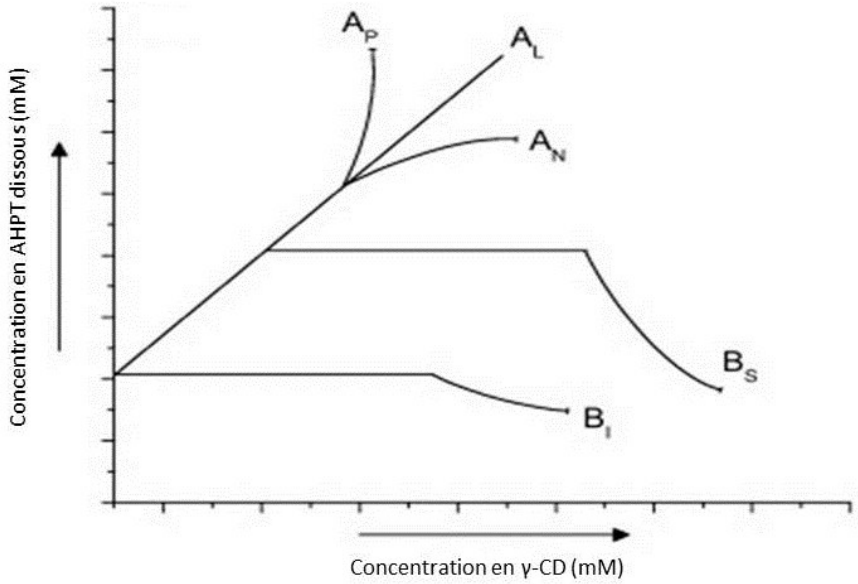


Figure 23 : Les différents types de complexe possibles (Higuchi et Connors, 1965)

Les courbes de type «A» indiquent la formation de complexes d'inclusion solubles.

Les courbes de type «A» peuvent se subdiviser en trois catégories :

A_L (augmentation linéaire de la solubilité des invités en fonction de la concentration en CD)

A_P (augmentation positive de la solubilité des invités en fonction de la concentration en CD)

A_N (augmentation négative de la solubilité des invités en fonction de la concentration en CD).

Les courbes de type «B» indiquent la formation de complexes d'inclusion avec une faible solubilité.

Les courbes de type «B_S» indiquent la formation de complexes de solubilité limitée

Les courbes de type « B_I » indiquent la formation de complexes insolubles.

2.2 Préparation des complexes et des mélanges témoins acides hydroxy pentacycliques triterpénoiques / gamma-cyclodextrine

La technique du mélange des triterpènes avec la γ-CD est liée à diverses contraintes dues aux propriétés physico-chimiques des molécules utilisées. Un mélange physique des deux poudres avec une trituration au mortier aurait été possible. Cependant, cette technique de mélange en milieu sec reste difficile à contrôler et donc n'est pas techniquement le meilleur choix. Le mélange de deux solutions avec des solvants

miscibles demeure plus facilement homogénéisable et contrôlable, c'est donc la voie qui a été choisie.

La γ-CD est soluble dans l'eau et les AHPTs le sont principalement dans le méthanol et le chloroforme. Le risque chimique (contrôle de l'évaporation, vaporisation, explosion…) et biologique (toxicité) lié à l'utilisation du chloroforme étant supérieur à celui lié à l'utilisation du méthanol, ce dernier a été retenu.

2.2.1 Préparation des complexes en milieu liquide

Les complexes ont été préparés en mélangeant, dans un rapport molaire 1:1, chaque AHPT à la γ-CD (Figure 24).

- Pour ce faire, une masse de 100,00 mg de chacun des AHPTs a été dissoute dans un volume de 160 µL de méthanol auxquels sont ajoutés 3 mL d'eau ultra pure,
- Une deuxième solution contenant 283,88 mg de γ-CD dans 3 mL d'eau ultra pure a été ajoutée,
- Les deux solutions ont été mélangées manuellement puis laissées 1 h à 37°C dans l'obscurité sous agitation à 420 rotations/min (rpm) à l'aide d'un Aerotron.

Après mélange, les complexes obtenus par précipitation ont été séparés par filtration sur filtre nylon 0,45 µm et séchés à l'air libre.

Selon les mêmes conditions, le rapport molaire 1 : 2 AHPTs : γ-CD a également été préparé.

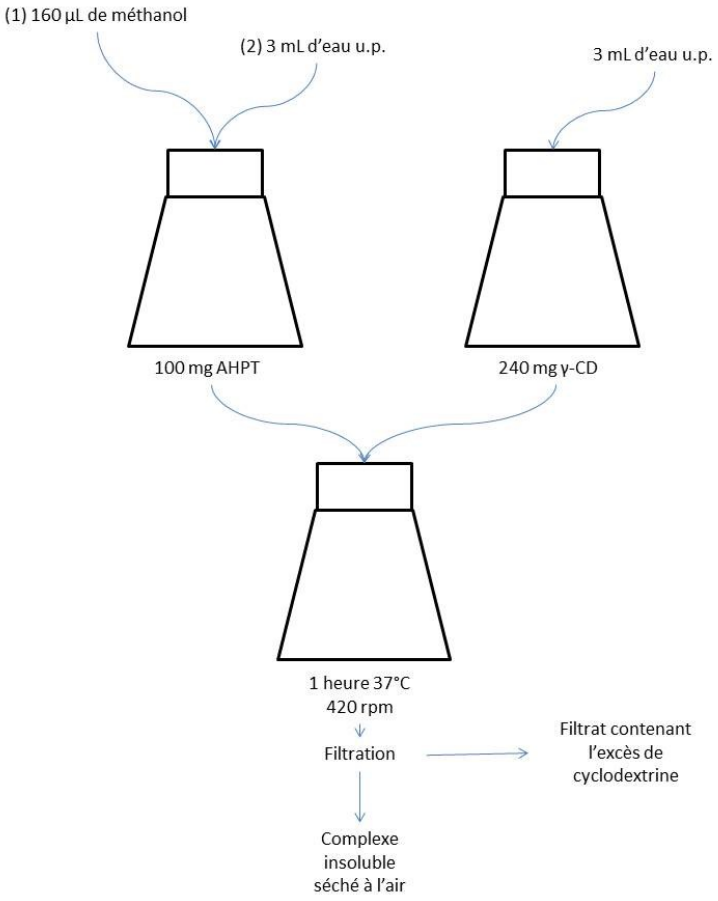


Figure 24 : Mode opératoire schématique de la fabrication des complexes en milieu liquide

2.2.2 Préparation des mélanges témoins secs d'acides hydroxy pentacycliques triterpénoiques / gamma cyclodextrine

Des mélanges secs de chaque AHPT avec la γ-CD ont été préparés dans le but de servir de témoin lors des études analytiques de calorimétrie différentielle à balayage. Pour ce faire, des masses de poudre de 100,00 mg de chacun des AHPTs et de 283,88 mg de γ-CD ont été introduites dans un pilulier en verre. Ces poudres sont alors mélangées l'une à l'autre par quelques retournements du pilulier en évitant toute secousse et choc brusque.

2.3 Caractérisation des complexes acides hydroxy pentacycliques triterpénoiques – gamma-cyclodextrine par calorimétrie différentielle à balayage et résonance magnétique nucléaire

2.3.1 Analyse calorimétrique différentielle (ACD)

Tableau XV : Matériel nécessaire aux expérimentations en ACD.

Matériel	Références	Fournisseurs
Netzsch	STA 409C	Geratebau (Biberach/Baden, Allemagne)
Creusets en aluminium	81004683	Netzsch (Selb, Allemagne)

La calorimétrie différentielle à balayage ou analyse calorimétrique différentielle (ACD) permet de mesurer les différences d'échanges de chaleur entre un échantillon à analyser et un échantillon de référence.

Les analyses ont été réalisées sous balayage d'un gaz inerte, l'argon, afin d'éviter toute réaction parasite de l'échantillon avec l'atmosphère du four.
L'appareillage a été calibré en température et sensibilité avec le chlorure de césium (646°C), le bismuth (271,4°C), l'indium (156,59°C), l'étain (231,92°C) et le zinc (419,52°C).

Les expérimentations ont été effectuées entre 30 et 350°C avec une vitesse de chauffage de 10°C/min. sous un flux d'argon de 50 $mL.min.^{-1}$. Les différents échantillons (AHPTs, γ-CD, mélanges physiques et complexes) ont été préparés par pesée de 5 mg de poudre dans des creusets en aluminium sans couvercle.

Les résultats sont obtenus sous la forme de graphiques représentant : la quantité d'énergie échangée par le système avec l'extérieur exprimée en calories (cal.) en fonction de la température.

2.3.2 Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Tableau XVI : Matériel nécessaire aux études par RMN.

Matériel	Références	Fournisseurs
Bruker DRX- 400	DRX-400	Bruker (Billerica, Massachusetts)
Tubes pour RMN Wilmad	Z2742275-1PAK	Sigma (Saint Louis, Missouri)
Deuterium oxide	D214FS	Euriso-top (Saint-Aubin, France)

La RMN du proton (effectuée au service commun de RMN de l'Université de Lorraine) permet de mesurer les déplacements chimiques des protons de la cavité interne (H_3 et H_5) de la CD (Figure 14). Si ces protons montrent un déplacement significatif (> 0,05 ppm) ou s'ils disparaissent (masqués par un autre groupement), il s'agit alors d'un complexe d'inclusion. Dans le cas contraire, il faut se résoudre au fait que le complexe obtenu n'est pas ou n'a que très peu de chance d'être un complexe d'inclusion.

2.3.2.1 **Choix du solvant deutéré**

De façon classique les solvants deutérés sont D_2O, du méthanol-d_4 ou du DMSO-d_6.

Le DMSO est connu pour être un solvant « dissociant » les complexes (Swiech *et al.*, 2012), et donc des observations à partir de ce milieu ne permettent pas de conclure.

Le méthanol est un bon solvant des AHPTs mais, dans nos conditions expérimentales reste un solvant médiocre pour les CDs.

L'oxyde de deutérium (D_2O) est un très mauvais solvant des AHPTs. Cependant, notre choix s'est porté, par défaut, sur ce solvant.

En pratique :

- 5 mg de γ-CD ont été mis en solution dans 1 mL de D_2O,
- 5 mg de complexe ont été mis en solution dans 1 mL de D_2O,
- les AHPTs ont été mis en suspension dans le D_2O à la concentration de 0,05 mM (limite moyenne de solubilité des AHPTs dans l'eau).

Ces solutions et ces suspensions ont ensuite été filtrées sur membrane nylon 0,45 µm avant d'être placées dans des tubes RMN précédemment rincés à l'acétone et séchés à l'étuve à 50°C. Les expériences de H^1 RMN ont été effectuées à 300 K à l'aide d'un spectromètre travaillant à 400 MHz. Les déplacements chimiques induits pour les protons de la γ-CD (δ Δ) lors de la complexation ont été calculés.

Résultats - Discussion

1 Activités biologiques des AHPTs

Ces dernières années, de nombreuses études ont tenté de démontrer les activités biologiques des terpènes et de façon plus précise des triterpènes pentacycliques dont l'AU, l'AO et l'AB. Cela montre l'intérêt de la communauté scientifique pour ces molécules (Liu, 2005). Les principaux auteurs nous rappellent l'intérêt de ces molécules en thérapeutique tout en soulignant fréquemment leur trop faible hydrosolubilité (Petronelli *et al.*, 2009).

1.1 Activité anti-bactérienne

1.1.1 Comment tester des molécules hydrophobes avec une méthode de microdilution conventionnelle ?

La méthode de CMI par micro méthode est une des méthodes les plus souvent retrouvées dans la littérature. Bien que parfaitement maitrisée au laboratoire, nous avons tout de même fait varier certains paramètres susceptibles d'apporter un biais au cours de nos expériences.

Ces variations avaient toutes trait à la préparation des drogues à tester. La mise en solution des AHPTs n'a pas pu se faire directement dans le milieu de culture de bactériologie du fait de leur (déjà) faible solubilité dans l'eau. Le choix de l'eau ou du milieu de culture reste une possibilité offerte à l'expérimentateur dans l'ensemble des recommandations du CA-SFM (C.J. Soussy *et al.*, 2012), de l'EUCAST (Kahlmeter *et al.*, 2006) et du CLSI (Matthew A. Wikler *et al.*, 2009), même si la recommandation principale reste une mise en solution directement dans le milieu de culture.

Nous avons donc dissout directement les AHPTs dans de l'eau distillée stérile en présence ou en absence de DMSO (1,25 % maximum au final). Dans ces conditions, la présence de DMSO n'altère pas la croissance des bactéries ni l'activité des triterpènes. Cependant la présence de DMSO facilite l'homogénéisation des solutions et la répétabilité des expériences. Nous avons ainsi préférentiellement travaillé en présence de DMSO malgré les réserves que cela peut susciter de la part de la communauté scientifique. Rappelons tout de même ici que le CLSI dans son supplément sur les essais

antibactériens M100-S20 (p136) permet son utilisation, ainsi que celui d'autre co-solvant, à condition que la concentration finale de celui-ci ne dépasse pas 1%.

La détermination des valeurs de CMI a aussi été réalisée avec et sans l'étape de filtration stérilisante sur filtre 0,22 µm. De fait, la mise en solution des AHPTs dans l'eau (avec et sans DMSO) montrant un léger effet moiré, l'idée était de s'assurer que l'étape de filtration ne retenait pas le principe actif. Nous avons constaté qu'en prenant certaines dispositions (utilisation de tubes stériles pour les pesées, maintien des piluliers de stockage fermés jusqu'à la pesée…) lors de la préparation et de la pesée des AHPTs, cette étape de filtration pouvait être supprimée. Cependant les contaminations surviennent beaucoup plus fréquemment en son absence. Les résultats que nous avons pu obtenir en présence et en absence de cette étape ont été identiques. En conclusion, l'étape de filtration stérilisante ne modifie pas les conditions d'essais. Une telle étape est présente dans les recommandations du CLSI. Ces résultats permettent de répondre à l'absence de biais dû à la filtration, absence qui, pour le CLSI, doit être prouvées par « les méthodes les plus appropriés » (section M07-A8 p.10).

1.1.2 Une réelle activité antibactérienne des AHPTs

Le Tableau XVII et le Tableau XVIII présentent les résultats de CMI obtenus, en micro méthode, pour les molécules d'AHPTs seules. Chaque valeur est la moyenne de trois expériences indépendantes (3 inoculum différents, 3 pesées différentes de triterpènes). Ces résultats sont identiques quelle que soit la variation dans le mode opératoire (présence ou absence de DMSO, étape de filtration ou non). Des souches bactériennes de référence (ATCC) ont été testées ainsi que des souches résistantes aux antibiotiques issues d'isolat cliniques.

Tableau XVII : Valeurs de CMI (µg/mL) obtenues sur des souches de référence.

		AU	AO	AB	ATB
E. coli	ATCC 25922	>256	>256	>256	4[a]
S. aureus	ATCC 25923	**8**	**64**	>256	<1[b]
S. aureus	ATCC 29213	**8**	**32**	>256	<1[b]
E. faecalis	ATCC 29212	**4**	**8**	>256	<1[c]
P. aeruginosa	ATCC 27853	256	256	256	16[d]

n=3, AU : acide ursolique, AO : acide oléanolique, AB : acide bétulinique, a : amoxicilline, b : oxacilline, c : vancomycine et d : ticarcilline

Les valeurs de CMI sont énumérées dans le Tableau XVII. Compte-tenu des conditions expérimentales, nous n'avons pas pu démontrer d'activité antibactérienne pour l'AB (CMI ≥ 256 µg/mL). L'AU ainsi que l'AO ont montré un spectre antibactérien semblable, orienté principalement contre les bactéries à Gram positif: 4 µg /mL contre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et 8 µg/mL sur les deux souches ATCC de *Staphylococcus aureus*, pour l'AU; 8 µg/mL contre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, 32 µg/mL *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et 64 µg/mL contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, pour l'AO. En revanche, les deux composés : AU et AO, semblent dépourvus d'activité contre les bactéries à Gram-négatif (>256 µg/mL, pour *Escherichia coli* ATCC 25922 et =256 µg/mL pour *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

Les antibiotiques testés nous ont permis de vérifier que nos souches bactériennes étaient bien des souches sensibles aux antibiotiques.

Ainsi, nous avons démontré que les AU et AO ont tous deux une activité antibactérienne intéressante mais limitée aux bactéries à Gram positif. Ce point permet de souligner que l'existence d'une membrane phospholipidique externe, principale différence entre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif, semble inhiber l'activité antibactérienne de l'AU et de l'AO. Cela va dans le sens des nombreuses publications auxquelles nous avons pu avoir accès (Chandramu *et al.*, 2003 ; Horiuchi *et al.*, 2007 ; Kurek *et al.*, 2012).

Tableau XVIII : Valeurs de CMI (µg/mL) obtenues sur des souches résistantes.

		AB	AO	AU	Atb
E. coli	Producteur de pénicillinase	>256	>256	>256	>256[a]
S. aureus	*mecA*	>256	>256	>256	256[b]
E. faecalis	*vanB*	>256	>256	>256	64[b]
E. faecium	*vanA*	>256	>256	>256	256[c]
P. aeruginosa	Surexpression de pompe à efflux	>256	>256	>256	64[d]

n=3 - AU : acide ursolique, AO : acide oléanolique, AB : acide bétulinique, a : amoxicilline, b : oxacilline, c : vancomycine et d : ticarcilline

Pour les isolats cliniques (Tableau XVIII), les CMI obtenues pour les trois composés sont toutes ≥ 256 µg/mL, quelle que soit la souche bactérienne, ou le mécanisme de résistance considéré.

Les antibiotiques testés nous ont permis de vérifier que nos souches bactériennes étaient bien des souches résistantes aux antibiotiques.

Il est à noter ici que les mécanismes de résistance présents chez les bactéries à Gram positif modifient des constituants du peptidoglycane (*vanA, vanB*) ou des protéines liant les pénicillines (*mecA*). Ces mécanismes sont localisés dans la paroi des bactéries (Figure 25).

Cela permet de souligner que la perte de l'activité biologique liée à ces modifications de la paroi des bactéries (peptidoglycane ou environnement proche) peut être reliée soit à une perte de la perméabilité des bactéries aux AHPTs, soit à une modification de la cible des AHPTs.

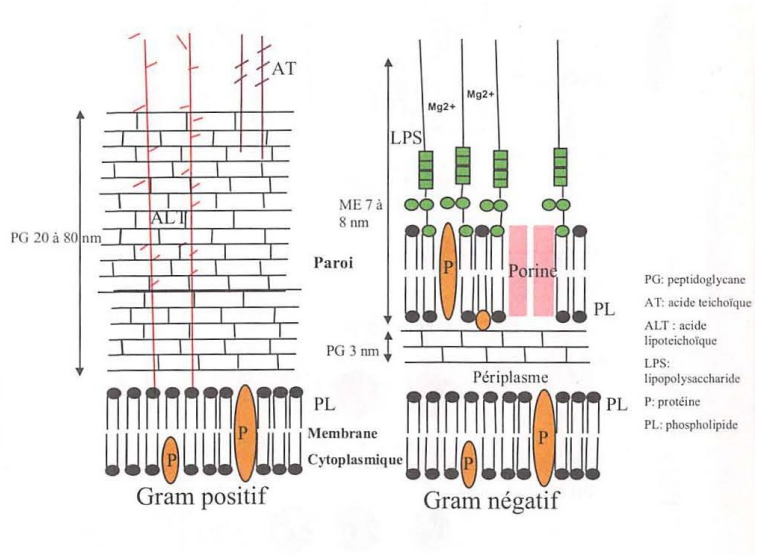


Figure 25 : Schéma des enveloppes bactériennes (Bosgiraud, 2003)

Chez *S. aureus*, un autre type de modification entraine l'augmentation de l'épaisseur de la couche de peptidoglycane sans modification chimique de sa structure. Il s'agit des souches « vancomycin intermediate Staphylococcus aureus » ou VISA. Il serait intéressant de tester la résistance de ces souches aux AHPTs afin de vérifier si le phénomène de résistance est lié à la modification des cibles (perte attendue de la résistance chez les VISA) ou s'il est lié à un problème de diffusion des AHPTs vers le cytoplasme (maintien de la résistance chez les VISA).

La modification des PLP liée au système *mecA* peut aussi s'interpréter comme un phénomène de « leurre ». Cette interprétation pourrait être vérifiée par l'étude des interactions possibles entre un extrait de PLP et les AHPTs.

Ainsi il peut être remis en cause l'habitude prise de donner préférentiellement aux AHPTs une cible d'action interne et surtout de ne plus considérer une interaction avec les acides nucléiques (Kim *et al.*, 2000) comme son unique mode d'action.

1.2 Cytotoxicité

Les résultats de viabilité et de cytotoxicité sont présentés dans le Tableau XIX. Les valeurs des CI_{50} (MTT) et des CC_{50} (RN) sont comparables entre elles quelle que soit la lignée cellulaire considérée (MRC5 ou HaCaT).

Tableau XIX : Valeurs des CI_{50} & CC_{50} (µg/mL d'AHPTs ou équivalent AHPTs).

		AU		AO		AB	
		CI_{50}	CC_{50}	CI_{50}	CC_{50}	CI_{50}	CC_{50}
MRC-5	24 h	15,1	8	25,2	31,9	1	4,5
	48 h	11,2	5,6	24,7	30,8	<1	4
	168 h	11,3	7,2	19,9	40,6	<1	2,73
HaCaT	24 h	7,5	2-4	52,4	23,9	1,4	4,4
	48 h	6	2-4	44,1	32,9	1	2,3
	168 h	5,1	2-4	50,8	40,5	<1	1<

n=3, AU : acide ursolique, AO : acide oléanolique, AB : acide bétulinique.

Après 24 h de traitement, les CI_{50} sont pour l'AU de 15,1 µg/mL sur les MRC5 et de 7,5 µg/mL sur les HaCaT. Les CI_{50} de l'AU diminuent légèrement avec le temps jusqu'à atteindre 11,3 µg/mL pour les MRC5 et 5,1 µg/mL pour les HaCaT à 168 h.

Pour l'OA, les CI_{50} à 24 heures varient entre 25,2 µg/mL pour les MRC5 et 52,4 µg/mL pour les HaCaT. La tendance à la baisse des valeurs de CI_{50} observées avec l'AU est comparable avec l'AO avec des valeurs de CI50 à 168 h de 19,9 µg/mL pour les MRC5 et de 50,8 pour les HaCaT.

L'AB montre un impact beaucoup plus important sur la survie cellulaire avec une $CI_{50} \leq$ 1 µg/mL, pour les MRC5, et de 1,4 µg/mL pour les HaCaT. Etant données ces valeurs hors gamme, aucune évolution n'a pu être observée pour des temps de contacts supérieurs à 24 h Cette valeur confirme la grande toxicité déjà publiée de l'AB (Eiznhamer et Xu, 2004 ; Fulda, 2008 ; Zuco *et al.*, 2002). Les valeurs de CI_{50} mesurées avec l'AU et l'AO sur les cellules MRC5 et HaCaT permettent d'envisager, dans l'absolu, une utilisation de ces molécules. Seule une *expérimentation in-vivo* permettrait de trancher définitivement sur ce point.

Les valeurs de CMI et de CI_{50} après 24 h d'exposition, permettent de calculer les index de sélectivité (IS = CI_{50}/CMI) (Tableau XX).

Tableau XX : Valeurs des index de sélectivité (IS=CI_{50}/CMI).

			AU	AO	AB
MRC5	*E. coli*	ATCC 25922	0,06	<0,09	<0,004
	S. aureus	ATCC 25923	1,9	0,4	<0,004
	S. aureus	ATCC 29213	1,9	0,8	<0,004
	E. faecalis	ATCC 29212	3,8	3,2	<0,004
	P. aeruginosa	ATCC 27853	0,06	0,09	0,004
HaCaT	*E. coli*	ATCC 25922	<0,03	<0,2	<0,005
	S. aureus	ATCC 25923	0,9	0,8	<0,005
	S. aureus	ATCC 29213	0,09	1,6	<0,005
	E. faecalis	ATCC 29212	1,9	6,6	<0,005
	P. aeruginosa	ATCC 27853	0,03	0,2	0,005

n=3, AU : acide ursolique, AO : acide oléanolique, AB : acide bétulinique.

Les valeurs d'IS sur les lignées cellulaires (HaCaT et MRC-5) sont très faibles (*i.e.* 0,005) pour l'AB, en raison de sa forte toxicité et de sa mauvaise activité antibactérienne, et ce quelle que soit la souche bactérienne considérée. L'AU et l'AO présentent des IS assez proches (≈ 1-2), car l'AU à une bonne activité antibactérienne mais l'AO à une plus faible toxicité (Tableau XIX).

1.3 Une toxicité en faveur de l'utilisation des AHPTs contre les bactéries

La plupart des auteurs ont orienté leurs études sur la recherche d'activité antibactérienne d'extraits complexes de plantes. Ils ont ensuite déterminé la composition chimique de ces extraits pour, dans un deuxième temps se permettent d'attribuer les activités antibactériennes aux molécules, dont les AHPTs étudiés ici, principalement contenus dans ces extraits (Cowan, 1999). De plus, les études menées par une méthode de diffusion sur disque, même si elle reste indicative, ne peuvent être comparées aux résultats obtenus ici. En effet, les AHPTs étant hydrophobes, leur migration au sein des géloses (méthode de diffusion) reste des plus limitée. Ainsi les activités mesurées par cette méthode sont difficilement comparables selon le degré d'hydrophobicité des composés testés (Opalchenova et Obreshkova, 1999).

Il est donc difficile de pouvoir certifier à la lecture de ces études que l'activité reste due à la molécule seule et non pas à un effet synergique des molécules (terpènes, tanins, stérols…) présentent dans le mélange testé. Dans le même esprit, l'activité propre des co-solvants où leur éventuelle synergie avec les drogues testées est rarement évalué.

Ces auteurs ont décrit cette classe de molécules comme des antibactériens ayant une bonne activité inhibitrice à l'exception de l'AB dont l'activité bactériostatique ou bactéricide est toujours qualifiée d'inexistante.

Ces faits ont poussé bon nombre de scientifiques à spéculer sur l'intérêt chimiothérapeutique de ces molécules bien que ces expériences aient rarement été menées sur des souches bactériennes de référence de type ATCC mais souvent sur des isolats issus de l'environnement et même quelquefois d'un rare intérêt thérapeutique ; à l'exemple de Ao *et coll.* (Ao *et al.*, 2008) qui utilisent des souches provenant d'un institut agricole sans aucune référence à une collection connue.

De plus, les études faites sur les AHPTs commerciaux ne mentionnent pas, en parallèle, de données concernant la cytotoxicité de ces molécules et donc ne donnent aucune indication de type index de sélectivité, index d'intérêt pour envisager le potentiel thérapeutique réel d'un principe actif.

En ce qui concerne nos travaux, les tests d'activités antibactériennes ont été menés sur des souches parfaitement définies tant pour celles de référence que pour les isolats cliniques (détermination de leur antibiogramme et de leur type de résistance acquise). Les molécules testées sont toutes d'origine commerciale et certifiées pures à plus de 95%. Le principal reproche que l'on peut faire, c'est d'avoir dû, pour les AHPTs seuls, adjoindre du DMSO comme co-solvant. Même si la concentration finale de ce dernier n'a jamais dépassé la concentration maximum permettant l'observation d'une activité antibactérienne, il aurait été plus élégant de pouvoir s'en passer totalement. Quoi qu'il en soit, nous avons pu démontrer, en accord avec de nombreuses hypothèses déjà présentées dans la littérature, l'activité antibactérienne de l'AU et de l'AO (principalement actif sur des bactéries de phénotype sauvage à Gram positif) et l'absence d'activité de l'AB.

La littérature rapporte dans des contextes d'études de relation structure/activité (Chandramu *et al.*, 2003 ; Djoukeng *et al.*, 2005 ; Genet *et al.*, 2010 ; Mallavadhani *et al.*, 2004 ; Yogeeswari et Sriram, 2005), que les activités biologiques des triterpènes pentacycliques sont liées à :

- la présence d'une fonction acide carboxylique libre en C_{17},
- la présence d'un groupement hydroxyle en C_3,
- la présence d'un groupement cétone sur le cycle A (C_1 à C_5),
- la présence d'une double liaison en β et γ de la fonction acide portée par le C_{28}.

Nous pouvons noter que l'AU et l'AO possèdent le groupement hydroxyle en C_3 ainsi que la fonction acide libre en C_{28}. Le masquage par la γ-CD de ces ou d'une de ces fonctions peut être lié à la perte de l'activité antibactérienne des AHPTs une fois complexés. Cependant, nous devons aussi envisager que cette perte d'activité peut aussi être due à une trop forte liaison entre la cyclodextrine et son invité, empêchant sa libération dans le milieu et donc ne lui permettant pas de jouer son rôle d'anti-infectieux.

K. Kozai rapporte une activité inhibitrice pour la glucosyltransférase de *Streptococcus mutans* (Kozai *et al.*, 1987), cependant cela ne laisse pas la possibilité de savoir si cette activité peut être liée à une activité antibactérienne « vraie ». Ainsi, il est difficile de vouloir comparer ou mettre en corrélation des activités très spécifiques avec la recherche d'activité anti-infectieuse.

1.4 Activité antifongique

Dans une première partie seront présentés les résultats liés à la méthodologie de la détermination des CMI sur fungi puis dans un deuxième temps seront présentés les résultats des CMI concernant les AHPTs.

1.4.1 Activité antifongique : méthodologie

Avant de tester l'activité antifongique des triterpènes, il a fallu mettre en place au sein du laboratoire la technique de détermination de CMI sur des fungi. Le cadre normatif lié à l'ISO, au CA-SFM, à l'EUCAST et au CLSI a été exploré.

Tout en restant dans ce cadre et en n'oubliant pas l'aspect thérapeutique lié au travail, plusieurs conditions opératoires ont été testées :

- choix du solvant pour la préparation des solutions de drogues à tester,
- molécules de référence servant à calibrer l'expérimentation,
- choix de la méthode de préparation de l'inoculum,
- choix du milieu de culture,

et ce afin de déterminer lesquelles seraient les plus aisées à mettre en œuvre par la suite dans un cadre de criblage de molécule.

1.4.1.1 **Influence du DMSO sur la croissance fongique**

Les recommandations officielles sur les tests d'activité antifongique ne sont pas toutes très explicites quant à l'utilisation de co-solvant lors de la préparation des molécules à tester. Le CLSI autorise, pour le DMSO, une utilisation à une concentration finale inférieure à 1%, (sections M27-A2 sur les fungi bourgeonnants et M38A sur les fungi filamenteux). Afin de valider au mieux notre méthode d'étude, nous avons voulu vérifier l'impact du DMSO sur la croissance des fungi en culture.

1.4.1.1.1 Candida albicans

Pour chaque condition de culture, la croissance de *C.albicans*, a été déterminée par lecture directe de l'absorbance. Les différences entre :

- la valeur d'absorbance mesurée en milieu de culture seul et,
- la valeur d'absorbance mesurée à différentes concentrations en DMSO,

ont été reportées, en pourcentage, dans le Tableau XXI.

Tableau XXI : variation de la croissance de *C. albicans*.

Milieu Sabouraud	**DMSO**			
	5%	**2,5%**	**1,25%**	**0,625%**
24 h	-61,68	-23,28	-11,16	-6,80
48 h	-33,69	-13,32	-8,65	-4,5
Milieu RPMI 1640	**DMSO**			
	5%	**2,5%**	**1,25%**	**0,625%**
24 h	-58,10	-29,95	-10,76	-6,49
48 h	-57,21	-35,99	-24,35	-15,24

n =3

A 24 h le DMSO montre une très forte activité antifongique sur *C.albicans* dès 5% avec des valeurs d'inhibition de croissance en milieu Sabouraud de -61,68% contre -58,10% en milieu RPMI1640. A 48 h et à 5% de DMSO, ces diminutions ne sont plus que de 33,69% en milieu Sabouraud mais reste élevées (-57,21%) en RPMI1640.
Avec la diminution de la concentration en DMSO, l'inhibition de la croissance diminue dans tous les cas. Elle n'est plus que de -6,8% à 24 h en Sabouraud pour une concentration en DMSO de 0,62% ; et de -4,5% en RPMI. Pour une concentration de 1,25% de DMSO cette inhibition dépasse toujours les -10% à 24 h.

Ainsi, les résultats obtenus (Tableau XXI) lors de l'évaluation de l'influence du DMSO sur la croissance de *Candida albicans* en milieu Sabouraud où RPMI 1640, montrent une diminution de la croissance notable dès 0,625 % de DMSO dans le milieu de culture et ce quel que soit le milieu utilisé (RPMI1640 ou Sabouraud). De fait, la question de son utilisation, même à des concentrations inférieures à 1% final dans le milieu de culture doit être posée. Notre but ici est de déterminer des concentrations permettant une inhibition de croissance de 100%. Ainsi l'utilisation de DMSO à 1% reste tout de même compatible avec cet objectif. Toutefois, nous veillerons tout de même à ce que la concentration finale en DMSO soit maintenue à une valeur inférieure à 0,1% final lors des expériences.

1.4.1.1.2 Aspergillus niger

Pour chaque condition de culture, la croissance de *A.niger* a été déterminée par lecture directe de l'absorbance. Les différences entre :

- la valeur d'absorbance mesurée en milieu de culture seul et,
- la valeur d'absorbance mesurée à différentes concentrations en DMSO,

ont été reportées, en pourcentage, dans le Tableau XXII.

Tableau XXII : variation de la croissance de *A. niger*.

Milieu Sabouraud			**DMSO**		
	5%	**2,5%**	**1,25%**	**0,625%**	**0,312%**
24 h	-49,87	-36,54	-26,74	-16,18	-10,04
48 h	-77,71	-65,85	-61,15	-51,55	-29,50
Milieu RPMI 1640			**DMSO**		
24 h	-48,07	-21,45	-12,59	-10,87	-5,12
48 h	-45,77	-38,66	-36,48	-21,67	-9,77

n=3

A 24 h le DMSO montre une très forte activité antifongique sur *A. niger* dès 5% avec des valeurs d'inhibition de croissance de -49,87% en milieu Sabouraud contre -48,07% en RPMI1640. A 48 h et à 5% de DMSO ces valeurs augmentent en milieu Sabouraud (-77,71%) et restent élevées (-45,77%) en RPMI1640.
A 0,62% de DMSO cette inhibition dépasse toujours les -10% à 24 h.
Avec la diminution de la concentration en DMSO, l'inhibition de la croissance diminue dans tous les cas. Elle reste cependant plus élevée qu'avec *C. albicans* puisqu'elle atteint -10,04% à 24 h en Sabouraud pour une concentration en DMSO de 0,312%. et de -5,12% en RPMI.

Les résultats obtenus (Tableau XXII) lors de l'évaluation de l'influence du DMSO sur la croissance d'*Aspergillus niger* en milieu Sabouraud et RPMI 1640 montrent qu'il y a une diminution de la croissance plus importante en milieu Sabouraud à 24 h, diminution qui s'accentue à 48 h.

Le DMSO, si souvent utilisé lors de la détermination d'activité anti-infectieuse pour amener en solution des molécules dont l'hydrosolubilité est faible montre clairement ici ses limites. Même si nous cherchons à déterminer une CMI (inhibition de 100% de la croissance) l'impact du DMSO (et un éventuel effet synergique) ne peut plus être ici négligé.
Afin d'être certains de ne pas influencer la croissance fongique par sa présence, nous veillerons à ce que sa concentration finale ne dépasse jamais 0,1%. Dans ces conditions, il ne devrait y avoir aucune influence notable sur la croissance fongique ni, par conséquence, sur les résultats.

1.4.1.2 **Détermination de la CMI de l'amphotéricine B**

Ici, sont déterminées les meilleures conditions d'évaluation d'une activité antifongique. La molécule de référence choisie est l'amphotéricine B. L'activité antifongique de l'amphotéricine B a été déterminée pour une gamme de concentrations de 2 à 0,0075 µg/mL sur deux milieux différents (Sabouraud et RPMI 1640), utilisant des solvants différents, et avec deux façons différentes de préparer l'inoculum.

1.4.1.2.1 Candida albicans

Les valeurs de CMI obtenues sur *C.albicans* à 24 et 48 heures en fonction de la méthode de préparation des inocula et des milieux de culture utilisés sont regroupées dans le Tableau XXIII.

Tableau XXIII : Valeurs des CMI obtenues sur *C. albicans* avec l'amphotéricine B.

Milieu Sabouraud	**Solvant**	**24 h**	**48 h**	**EUCAST 24 h**
Suspension de cellules en Sabouraud	PBS	0,06	ND	NA
Suspension de cellules en Eau	PBS	**0,03**	0,06	NA
Suspension de cellules en Eau	Eau	0,12	0,25	NA
Milieu RPMI 1640				
Suspension de cellules en Eau	Eau	0,5	1	0,06 - 0,5

n=3 - ND : non déterminé – NA : non applicable

Selon les différentes conditions de mise en culture, nous avons obtenu des valeurs de CMI allant de 0,03 µg/mL à 0,5 µg/mL soit une variation d'un facteur supérieur à 10.

Les résultats obtenus lors des différentes manipulations réalisées pour évaluer la CMI de l'amphotéricine B sur *C. albicans* (Tableau XXIII) montrent que la méthode la plus sensible pour ce test consiste à utiliser le milieu Sabouraud comme milieu de culture, le PBS comme solvant pour la préparation de la drogue et de préparer l'inoculum selon les recommandations de l'EUCAST. Dans ces conditions, une valeur de CMI de 0,03 µg/mL à 24 h pour l'amphotéricine B sur C.albicans est obtenue.

1.4.1.2.2 Aspergillus niger

Le suivi des valeurs de CMI obtenues sur *A.niger* à 24 et 48 heures en fonction de la méthode de préparation des inocula et du milieu de culture utilisé sont regroupées dans le Tableau XXIII.

Tableau XXIV : Valeurs des CMI obtenues sur *A. niger* avec l'amphotéricine B.

Milieu Sabouraud	Solvant	24 h	48 h
Récolte des spores en Sabouraud	PBS	**0,06**	0,12
Récolte des spores en Eau	Eau	0,25	0,5
Récolte des spores en Eau-Tw20 0,1%	Eau	0,25	0,5
Milieu RPMI 1640			
Récolte des spores en Eau	Eau	1	1
Récolte des spores en Eau-Tw20 0,1%	Eau	0,12	0,12

n=3 - ND : non déterminé – NA :non applicable

En ce qui concerne A. niger, en fonction des conditions de culture, une CMI variant de 0,06 à 1 µg/mL est mesurée. La différence entre ces deux valeurs représente un facteur de 16.

L'évaluation de la CMI de l'amphotéricine B sur *A. niger* (Tableau XXIV), montre que la méthode la plus sensible consiste à utiliser le milieu Sabouraud comme milieu de culture, le PBS comme solvant pour les molécules à tester et une préparation de l'inoculum par récolte des spores avec 5 mL de bouillon Sabouraud. Dans ces conditions la CMI obtenue sur *A. niger* avec l'amphotéricine B est de 0,06 µg/mL à 24 h.

A la suite de ces résultats, une question est apparue : Si les CMI sont plus faibles avec du PBS, n'est-ce pas parce que le PBS influence le développement des fungi ?

1.4.1.3 **Influence du PBS sur la croissance fongique**

Lors des expérimentations avec l'amphotéricine B, les résultats obtenus pour *Candida albicans* et pour *Aspergillus niger*, en utilisant le PBS comme solvant, ont toujours présentés des valeurs de CMI plus basses que dans les autres conditions de préparation (eau et/ou DMSO). L'existence d'une influence du PBS sur la croissance fongique a

donc été évaluée avant de choisir définitivement les molécules de référence et les conditions opératoires.

1.4.1.3.1 Candida albicans

Les valeurs de CMI obtenues sur *C. albicans* à 24 et 48 heures en fonction de la concentration finale en PBS et du milieu de culture utilisé sont regroupées dans le Tableau XXV.

Tableau XXV : variation de la croissance de *C.albicans* en fonction de la concentration en PBS.

Milieu Sabouraud	**PBS**		
	50%	**25%**	**12,5%**
24 h	-20,38	-12,93	-7,44
48 h	-20,80	-14,34	-9,58
Milieu RPMI 1640			
24 h	-12,99	-5,39	-4,89
48 h	-19,88	-13,4	-7,26

n=3

À 24 h les diminutions de croissance de *C.albicans* en présence de 50% de PBS sont de l'ordre de -20% en milieu Sabouraud et de -13% en RPMI1640. La diminution est du même ordre à 48 h en Sabouraud mais augmente jusqu'à -20% en RPMI1640.

A 25% de PBS, les diminutions sont de l'ordre de -13% en Sabouraud et de -5% en RPMI1640 à 24 h d'incubation. Cette valeur n'est pratiquement pas modifiée à 48 h en milieu Sabouraud mais atteint -13% en RPMI1640.

Enfin à 12,5 % de PBS, l'inhibition de croissance est de l'ordre de -7% à 24 h en milieu Sabouraud et de -4,8% en RPMI1640 ; augmentant à -9,5% en milieu Sabouraud et à -7,2% en RPMI1640 à 48 h.

Ainsi, les résultats obtenus montrent un impact du PBS sur la croissance de *C.albicans* et cela quel que soit le milieu de culture retenu et cela dès 12,5% de PBS.

1.4.1.3.2 Aspergillus niger

Les valeurs de CMI obtenues sur *A. niger* à 24 et 48 heures en fonction de la concentration finale en PBS et du milieu de culture utilisé, Sabouraud ou RPMI 1640, sont regroupées dans le Tableau XXVI.

Tableau XXVI : variation de la croissance de *A. niger* en fonction de la concentration en PBS.

Milieu Sabouraud	**PBS**			
	50%	**25%**	**12,5%**	**6,25%**
24 h	- 26,67	- 17,94	- 15,31	- 11,19
48 h	- 66,37	- 59,34	- 50,38	- 39,73

n =3

L'ensemble des résultats montre pour A. niger un fort impact du PBS sur sa croissance avec des pourcentages d'inhibition de 66% à 50% de PBS et de 39% à 12,5% de PBS à 48 h. Même si à 24 h. cette inhibition de croissance est beaucoup plus modérée, elle reste importante avec des valeurs atteignant 26% à 50% de PBS et 11% à 12,5% de PBS.

A. niger semble beaucoup plus sensible au PBS que *C. albicans*. Les pourcentages d'inhibition obtenus en milieu Sabouraud à 50% de PBS sont de 26% à 24 h contre 20% pour *C.albicans*. Pourtant l'évaluation de l'influence du PBS en milieu RPMI 1640 a montré qu'il n'y a pas d'influence sur la croissance de *A. niger* !

Finalement, le Tableau XXVI montre que le PBS est un solvant à éviter lorsque l'on souhaite déterminer une activité antifongique sur *A. niger* en milieu Sabouraud.

1.4.1.4 **Détermination de la CMI de l'itraconazole**

L'activité antifongique de l'itraconazole a été déterminée pour une gamme de concentrations de 16 à 0,0625 µg/mL sur deux milieux différents (Sabouraud et RPMI 1640), utilisant des solvants différents, et avec deux façons différentes de préparer l'inoculum. L'utilisation du PBS a été écartée suite aux précédents résultats.

1.4.1.4.1 Candida albicans

Les valeurs de CMI obtenues sur *C.albicans* à 24 et 48 heures avec l'itraconazole en fonction du milieu de culture utilisés sont regroupées dans le Tableau XXVII.

Tableau XXVII : Valeurs des CMI obtenues sur *C. albicans* avec l'itraconazole.

Milieu Sabouraud	Solvant	24 h	48 h	EUCAST 24 h
Suspension de cellules en Eau	Eau	0,25	0,25	NA
Milieu RPMI 1640				
Suspension de cellules en Eau	Eau	0,5	1,00	0,25 - 1

n=3 - NA : non applicable

Les résultats de CMI de l'itraconazole sur *C.albicans* à 24 h ne montre qu'une faible variation (facteur 2X maximum). Cependant, cette évaluation est en faveur de l'utilisation du milieu Sabouraud, avec une CMI de 0,25 µg/mL en milieu Sabouraud à 24 h contre une CMI de 0,5 µg/mL à 24 h en milieu RPMI1640.

1.4.1.4.2 *Aspergillus niger*

Les valeurs de CMI obtenues sur *A. niger* à 24 et 48 heures avec l'itraconazole en fonction du milieu de culture utilisé et du mode de préparation des inocula sont regroupées dans le Tableau XXVII.

Tableau XXVIII : Valeurs des CMI obtenues sur *A. niger* avec l'itraconazole.

Milieu Sabouraud	Solvant	24 h	48 h
Récolte des spores en Eau-Tw20 0,1%	Eau	8	16
Milieu RPMI 1640			
Suspension de cellules en Eau	Eau	8	16

n=3

L'évaluation de la CMI de l'itraconazole en milieu Sabouraud et RPMI 1640 pour *Aspergillus niger* montre qu'il n'y a pas de différence entre les deux méthodes, pour lesquelles la CMI est de 8 µg/mL à 24 h.

Pour conclure, nous avons démontré que le PBS influe la croissance de *Candida albicans* et ce, quel que soit le milieu de culture utilisé. L'utilisation de PBS comme solvant réduit à 24 h la croissance des deux fungi jusqu'à 40 %.
Pour ce qui est d'*Aspergillus niger* en milieu Sabouraud, le PBS induit une diminution de la croissance de plus de 40 % à 24 h et de plus de 70 % à 48 h.

A partir de ces résultats nous avons conclu que l'eau est le meilleur solvant à utiliser : elle n'a aucune influence sur la croissance des champignons, condition indispensable pour l'évaluation de la CMI des substances antifongiques.

Enfin, la préparation de l'inoculum recommandée par l'EUCAST comporte moins d'étape que la préparation en bouillon Sabouraud. Les résultats de CMI obtenus sont proches avec les deux méthodes. L'utilisation du Tween20 à 0,1% sur *Aspergillus niger* pour la récolte des spores n'a aucune influence visible sur la détermination de la CMI. Les résultats obtenus avec et sans Tween20 sont identiques lors des manipulations réalisées en milieu Sabouraud. Le Tween20, qui devait favoriser la libération des spores d'*Aspergillus niger* et leur récolte, semble n'avoir au final aucun effet. Cependant, la méthode en bouillon Sabouraud possède quelques avantages : elle reste plus sensible et plus économique :

- La croissance de *Candida albicans* en milieu Sabouraud est légèrement inférieure à celle observée en milieu RPMI 1640 mais reste du même ordre de grandeur.
- La croissance d'*Aspergillus niger* est bien supérieure en milieu Sabouraud, mais sa sporulation est plus tardive. Dans les deux cas l'absorbance mesurée à 24 h est due au mycélium. Cependant à 48 h en RPMI 1640, l'absorbance semble due à la présence de spores qui sont absentes en milieu Sabouraud.

Nous avons évalué trois paramètres essentiels pour la détermination des CMI sur des champignons :

- l'influence du solvant (milieu, eau ou PBS) ou du co-solvant (DMSO),
- la préparation de l'inoculum,
- l'influence du milieu de culture (RPMI 1640 ou Sabouraud).

Et validé l'utilisation de deux antifongiques comme molécules de référence pour la méthode :

- l'amphotéricine B,
- l'itraconazole.

Nous en avons conclu pour la suite que

- le meilleur solvant à utiliser est l'eau
- le DMSO doit être utilisé avec beaucoup de prudence et à une concentration finale inférieure à 0,1%.

- l'utilisation de milieu Sabouraud, est aussi valide que l'utilisation du milieu RPMI 1640 pour la détermination de la CMI de substances antifongiques.
- la préparation de l'inoculum de *A. niger* avec ou sans Tween20 donne des résultats similaires en milieu Sabouraud.

Dans ces conditions, les CMIs obtenues lors des manipulations avec l'amphotéricine B et l'itraconazole sur *Candida albicans* permettent d'obtenir des valeurs contenues dans la fourchette des valeurs données par l'EUCAST. En ce qui concerne *Aspergillus niger* aucune valeur n'est proposée, et cela pour quelque antifongique que ce soit.

1.4.2 Activité antifongique : application

En ce qui concerne les activités antifongiques des triterpènes, l'utilisation ancestrale de plantes à forte teneur de terpènes comme le thym ou le romarin (Ozcakmak *et al.*, 2010) comme plante « purifiante » a rapidement mené au raccourci qui allait classer les AHPTs comme antifongique ménager. De fait, ces plantes, aussi très riches en naphta possèdent une réelle activité antimicrobienne mais certainement pas due uniquement aux AHPTs.

Une recherche bibliographique dans « pubmed », en 2012, permet de trouver avec les mots clefs :

- « antifungal » et « triterpene », 453 résultats,
- « antifungal » et « ursolic acid »,22 références,
- « antifungal » et « oleanolic acid », 53 références et
- « antifungal » et « betulinic acid », 22 références,
- pour un total de 15119 pour le seul terme « triterpene ».

Si l'on écarte les études testant des extraits de plantes contenant des triterpènes pentacycliques et non des molécules seules il faut retirer un tiers de ces références. Une autre partie de ces publications utilise des sels de tetrazolium pour mettre en évidence la survie de leur fungi (Shai *et al.*, 2008) alors que cette méthode reste des plus discutable dans le contexte des tests antimicrobiens (Grare *et al.*, 2008). Enfin dans certaines de ces études, des recherche de CMI à 2000 µg/mL sont parfois proposées. Cependant, au vu de l'hydrosolubilité de ces composés et en l'absence de toute référence à un co-solvant, cette littérature reste difficile à exploiter. Certains auteurs utilisant jusqu'à 5%

de DMSO final pour tester une activité antifongique par une méthode en milieu gélosé (Kuiate *et al.*, 2007) proposent une CMI à 100 µg/mL pour *Microsporum audouinii* et à 25 µg/mL sur *Trichophyton soudanense* (deux agents de la « teigne »). Il serait donc intéressant de tester notre méthodologie sur ces deux espèces afin d'avoir un point de comparaison.

Pour ce qui est de notre expérience, les souches de fungi (*A. niger, A. fumigatus, A. nidulus, C. neoformans et C. albicans*) ont été testées de façon conforme aux normes NF EN 1275 et 1960. Lors des tests sur des spores de *A. niger*, *A. fumigatus* et sur des cultures de *C. albicans*, nous n'avons pu montrer aucune activité antifongique pour les AHPTs et ce pour des gammes de concentrations comprises de 1 à 256 µg/mL. Ces expériences ont été réalisées en triplicata.

Cependant, il est intéressant de noter que la paroi de *C. albicans* riche en chitine et la paroi des *Aspergillus* riche en glucanes et en chitine permet de différencier les fungi des bactéries dites « sensibles aux antibiotiques » et des cellules de vertébrés.
Lors de notre étude sur les activités antibactériennes, nous avons montré qu'une variation dans la nature chimique des parois bactériennes est capable d'induire un phénomène de résistance aux AHPTs. Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que la forte paroi des fungi est, de la même façon, responsable de ce phénomène de résistance ? Il serait intéressant ici aussi d'obtenir des protoplastes fongiques afin de re-tester les activités des AHPTs.

N'ayant pas réussi à mettre en évidence d'activité antifongique pour les AHPTs, nous n'avons pas testé l'activité des complexes sur ces organismes.

1.5 Activité antivirale

Avant de tester l'activité antivirale des AHPTs, il a été necessaire, dans un premier temps, de définir les hypothèses de travail afin d'effectuer certains choix méthodologiques tels que :

- la méthode de titrage viral : sur tapis monocellulaire pré-établi en microplaque de 96 puits ou par plage de lyse. A noter que la norme ne précise pas si ces 2 méthodes doivent être utilisées ou si l'une suffit. Au contraire, elle cite même la

possibilité d'une 3ème méthode de titrage viral sur des cellules en suspension sur plaque de microtitration,

- l'utilisation du formaldéhyde, cité dans la norme, comme molécule de référence malgré le manque de donnée bibliographique sur le sujet,
- le test d'autres substances de référence.

Les activités antivirales des AHPTs seront évaluées à la plus forte concentration déduite des résultats de cytotoxicité. Le temps de contact choisi sera de 1 minute.

Notre préalable concernera le choix d'une méthode efficace de production de virus. Les nombreux protocoles existant sont rarement comparés.

Notre premier objectif sera de mettre au point les protocoles permettant de caractériser l'action « antiseptique-antivirale » après un temps de contact de 1 min. entre le virus et la substance. Pour ce faire, 2 techniques devant aboutir à des résultats similaires seront utilisées:

- le titrage du virus sur tapis monocellulaire préétabli en microplaques de 96 puits,
- la méthode plage de lyse en plaque de 6 puits.

Ces méthodes seront validées à l'aide de molécules de référence déterminées par nos soins.

La norme de 2007 (AFNOR, 2007) définit 2 notions : celle d'activité « antiseptique antivirale » et celle d'activité « antivirale ». Si, lors d'un essai une diminution de 4 log ou plus du titre d'une suspension virale est observée pour un temps de contact donné avec la substance testée, alors l'activité de la substance peut être qualifiée d'« antiseptique antivirale ». Si cette diminution est moindre alors seul le qualificatif d'« antivirale » lui sera attribué.

Notre second objectif sera d'appliquer le protocole établi afin d'évaluer les activités antivirales de nos AHPTs. Après avoir mis en évidence une activité virucide d'une molécule de référence, il sera intéressant de rechercher les concentrations minimales permettant d'obtenir

- la perte de 4 log du titre viral indispensable à l'obtention de la mention « produit antiseptique-antiviral sur le virus X après un temps de contact X »,

- ou à défaut la mention « produit antiviral sur le virus X après un temps de contact X » pour toute diminution inférieur du titre viral.

1.5.1 Activité antivirale: méthodologie

1.5.1.1 **Protocole de production virale**

1.5.1.1.1 Poliovirus Lsc 2ab

Les titres viraux obtenus avec les différentes méthodes ont été comparés avant et après inoculation, voir après plusieurs inoculations successives avec le même lot de virus. Ont été réalisées jusqu'à 4 inoculations successives (Tableau XXIX).

Tableau XXIX : Titres viraux du poliovirus de type 1 Lsc-2ab obtenus selon diverses méthodes de production virale.

Titre viral	Inoculum	Surnageant après 1 passage	Surnageant après 2 passages	Surnageant après 4 passages
Méthode 1 (dans 15 mL)	$10^{4,6}$ $10^{4,8}$ $10^{5,6}$ $10^{5,5}$	 $10^{5,6}$ $10^{5,8}$	$10^{6,4}$	$10^{6,7}$ $10^{6,4}$
Méthode 2 (dans 15 mL)	$10^{6,4}$	$10^{5,4}$		
Méthode 3 de Julien Simonet (dans 30 mL)	$10^{5,4}$	$10^{6,1}$		

n=1

D'après les résultats (Tableau XXIX), la technique la plus productive s'avère être la méthode n°3 (1.4.2.1.1 Poliovirus p. 86) car le même titre viral qu'avec les autres méthodes est obtenu mais pour un volume deux fois plus important. Cela permet d'effectuer deux fois plus de tests qu'avec les autres méthodes. Nous avons ainsi montré que l'étape d'inoculation du virus avec un volume réactionnel limité favorisant un contact étroit entre les cellules et les particules virales est une étape importante dans un processus d'infection virale *in vitro*.

Nous avons également voulu étudier l'impact de la congélation/décongélation sur le titre viral du poliovirus. Pour cela, le titre du virus avant ($DICT_{50}$ =10^{7}) et après congélation ($DICT_{50}$ =$10^{6.4}$) a été déterminé. La congélation n'entraîne qu'une faible

perte d'activité du poliovirus ; ceci confirme le fait qu'il s'agit d'un virus considéré comme assez résistant.

En conclusion la méthode n°3 sera utilisée pour produire un stock de suspension virale. Après aliquotage, les tubes seront placés à -80°C et seront décongelés au besoin. Les cycles décongélation / re-congélation seront évités autant que possible.

1.5.1.1.2 hCMV

Lors de nos différentes tentatives, nous avons noté que le tapis cellulaire ne doit pas atteindre une confluence trop forte (de l'ordre de 80-85% maximum) avant d'être infecté, si l'on souhaite observer une infectiosité (assez) élevée. Dans ce cas, l'ECP n'apparait que très tardivement et la perte de temps peut être de plusieurs semaines (apparition de l'ECP jusqu'à 19 jours contre 4 jours en moyenne).

Le titre viral du hCMV est plus important lors de le 3ème récolte (8 jours d'incubation) ($10^{5,5}$) que lors de la 2ème récolte (6 jours d'incubation) ; ($10^{4,6}$) et de la 1ère récolte (4 jours d'incubation) ; ($10^{5,1}$).

La congélation entraîne une variation d'1 log du titre viral : 2ème récolte avant congélation ($10^{5,5}$) et après congélation ($10^{4,5}$). Les données bibliographiques vont toutes dans le sens d'une certaine sensibilité du hCMV aux cycles de congélations/décongélations. Cette sensibilité serait liée à l'existence d'une enveloppe, structure biologique bien connue pour sa fragilité aux variations de température, qui le fragilisent (Agut *et al.*, 2003).

1.5.1.2 **Détermination du moment optimum de l'apparition de l'ECP pour la détermination du titre viral**

1.5.1.2.1 Poliovirus Lsc2ab

La suspension de cellules Vero est introduite dans 8 plaques de 96 puits : 4 plaques serviront pour la détermination du titre viral du virus seul. Le but de la manipulation étant de déterminer le moment optimum d'apparition de l'ECP en observant les 4 plaques. Nous avons utilisé le lot de poliovirus produit sur cellules Vero après 4 inoculations successives (Tableau XXX).

Tableau XXX : Evolution du titre viral du poliovirus en fonction du temps d'incubation.

Temps d'incubation (h)	24	48	72	96
Titre viral	$10^{2,8}$	$10^{5,1}$	$10^{5,9}$	$10^{6,4}$

n=2

Après coloration au cristal violet de deux plaques à chacun des temps (24, 48, 72 et 96 h) nous avons pu observer une lyse du tapis cellulaire dès 24 heures aux fortes concentrations de virus (dilution à 10^{-2} à 10^{-3}). Le titre augmente au cours du temps jusqu'à atteindre une valeur maximale de $10^{6,4}$ à 96 h et semble ne plus évoluer (Tableau XXX). Ce temps sera donc retenu pour la lecture des essais de virucidie et des tests de viabilité.

1.5.1.2.2 hCMV

Un puits est considéré comme infecté dès lors que l'ECP du hCMV (ballonisation des cellules) est visible à un endroit du puits. Les plaques seront lues chaques jour au microscope inversé afin de déterminer le moment où il n'y a plus de nouveau puits infecté. En fonction de la confluence des cellules MRC5 au moment de l'inoculation du virus, le délai d'apparition de l'ECP est variable. Ainsi le temps optimum d'incubation avant la détermination de l'ECP ne peut pas être déterminé définitivement, mais variera entre 5 et 16 jours selon les expériences.

1.5.1.3 **Molécules de référence et activité antivirale**

De nombreuses molécules sont dites actives sur le poliovirus et le hCMV mais toutes ne peuvent pas être utilisées dans ces essais de virucidie *in vitro*. Les composés halogénés, chlorés ou iodés, l'eau oxygénée, les oxydants et les ammoniums quaternaires sont connus pour leurs propriétés antiseptique/désinfectante ; mais sont très toxiques pour les cellules et donc difficilement utilisables pour des tests *in vitro*. Ainsi peu de molécules ont été testées comme molécule de référence : seul un article mentionne des essais réalisés sur le poliovirus avec le glutaraldéhyde à faible concentration (<2%) (Bailly *et al.*, 1991). En effet, le glutaraldéhyde (GTA) à 1-2% a un spectre d'action très large ; mais les virus (surtout les entérovirus) sont connus pour lui être résistants. Le but était de valider son utilisation pour la désinfection des endoscopes qui sont fréquemment souillés par des entérovirus. L'inactivation du poliovirus par le GTA suit une cinétique

d'ordre 1 (relation linéaire entre le taux d'inactivation et la concentration en GTA). En raison d'une toxicité cellulaire, des concentrations supérieures à 0,10% n'ont pu être testées. A faible pH, le GTA 0,05% n'entraîne pas de diminution significative du titre viral, mais à pH alcalin, une diminution de 3,3 log est observée après un contact de 30 min. Seule une diminution de 4 log, significative au sens de la norme, est observée après 40 min de contact avec du GTA 0,10% à pH neutre.

Nous commencerons par tester le GTA 2,5% que l'on sait actif (Bailly *et al.*, 1991 ; Nayebzadeh, 2007). Le GTA possède une toxicité aiguë et chronique sur l'homme entraînant un frein à son utilisation : irritation de la peau, des yeux, des voies respiratoires, maux de tête, allergie (asthme, dermatose) (Fleurette *et al.*, 1995 ; Nayebzadeh, 2007). La température est également un paramètre important car elle augmente la formation de ces polymères ce qui le rend inefficace (Bailly *et al.*, 1991). Les tests seront donc réalisés à température ambiante ; ce qui se rapproche le plus de la réalité d'utilisation. De plus, en solution aqueuse, sauf à pH acide, le GTA a tendance à se polymériser ce qui bloque les sites actifs aldéhydes. Ces groupements aldéhydes libres réagissent avec les groupements thiols et aminés des cibles cellulaires (enveloppe, acide nucléique, capside…) (Fleurette *et al.*, 1995).

Le formaldéhyde présente une toxicité similaire au GTA. Il agit en dénaturant les protéines (enzymatiques et structurales) et par alkylation des acides nucléiques. Comme il fixe les protéines, une baisse rapide de son activité est constatée en présence de molécule interférente. Il n'est que lentement virucide et moins actif sur les virus nus comme le poliovirus (Fleurette *et al.*, 1995).

Les alcools sont également des candidats sérieux au titre de molécule de référence. Il faut savoir que l'éthanol 70% et l'isopropanol 95% inactivent le poliovirus en 10 min ; l'isopropanol étant en général antiseptique à des concentrations supérieures à 70%. Le problème est qu'il est 2 fois plus toxique que l'éthanol ; c'est pourquoi nous l'avons écarté de nos tests (Fleurette *et al.*, 1995).

Ainsi, la norme reste très « vague » au sujet des molécules de référence utilisables. L'objectif de nos investigations est de déterminer des molécules de référence utilisables pour valider le protocole. Trois molécules ont été choisies à différentes concentrations :

- le formaldéhyde (à 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3 ; 4 et 5%),
- le glutaraldéhyde (GTA) (à 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3 ; 4 et 5%),
- l'éthanol (1 ; 2 ; 2,5 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 8 et 10%).

1.5.1.3.1 Détermination des concentrations utilisables pour les molécules de référence : toxicité cellulaire

Les essais d'activité antivirale doivent toujours être précédés d'une recherche de cytotoxicité de la ou des molécules étudiées sur les cellules permissives à la culture virale et ce afin de déterminer quelle sera la plus faible concentration de drogue ne produisant pas d'effet sur les cellules. En effet, toute quantité résiduelle de composant testé doit l'être de façon suffisamment diluée afin qu'aucun effet biologique ne puisse être confondu avec l'ECP des virus qui auraient gardé leur infectiosité après le contact avec la substance à tester.

1.5.1.3.1.1 Cas du poliovirus

Les tests au MTT sont réalisés dans les conditions des essais de virucidie afin de s'assurer de l'absence de toxicité cellulaire. Les plaques sont révélées à la 96ème heure ce qui correspond au moment optimum d'apparition de l'ECP du poliovirus. Ceci permet de certifier l'absence de toxicité sur les cellules VERO après contact avec la substance.

Tableau XXXI : CI_{50} des molécules de référence obtenues par le test MTT sur cellules Vero.

CI_{50}	24 h	96 h
Glutaraldéhyde	0,5%	ND
Ethanol	> 10%	6 – 8%
Formaldéhyde	0%	ND

n=3 – ND : Non Déterminé

La CI_{50} du GTA à 24 h est de 0,5%. La CI_{50} de l'éthanol décroit lentement passant de plus de 10% à 24 h à 6-8% à 96 h. il ne faut pas oublier que la température d'incubation est de 37°C et que l'éthanol s'évapore même à température ambiante. Il est donc difficile de conclure si la diminution de la toxicité de l'éthanol au cours du temps est réelle ou due à la diminution de son titre dans les puits.

Aucune toxicité n'est visible dans ces conditions, excepté pour le GTA à la concentration de 0,025%. Cette concentration ne sera donc pas prise en compte lors de la détermination des titres viraux afin d'être certain de ne pas avoir confondu un effet cytotoxique avec un ECP.

1.5.1.3.1.2 Cas du hCMV

Les tests au MTT sont ici encore réalisés dans les conditions des essais de virucidie. Les tests sont lus après 6 et 11 jours d'incubation, temps qui permettent d'encadrer le moment d'apparition de l'ECP. Aucune altération de la viabilité cellulaire n'est observée. Ainsi la lecture du titre viral par recherche de l'ECP ne risquera pas d'être confondue avec un éventuel artefact lié à la toxicité de la molécule. Aucune altération de la viabilité n'est constatée sauf pour le formaldéhyde. Les CI_{50} sont résumées dans le Tableau XXXII.

Tableau XXXII : CI50 des molécules de référence obtenues par test MTT sur cellules MRC5.

CI_{50}	**24 h**	**6 J**	**11 J**
Glutaraldéhyde	3%	2%	2%
Ethanol	> 10%	8%	6%
Formaldéhyde		0%	

n=3

La CI_{50} du GTA à 24 h est de 3%, elle ne varie presque pas en 11 jours passant à 2%. La CI_{50} de l'éthanol décroit lentement passant de plus de 10% à 24 h à 8% en 6 jours et 6% en 11 jours. Cependant la remarque précédente sur l'évaporation de l'éthanol reste valable.

Le formaldéhyde a une action délétère sur la viabilité cellulaire aux concentrations de 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3 ; 4 ; 5% dès 24 h. En effet le formaldéhyde est un fixateur cellulaire ne permettant pas les tests *in vitro* sur des cellules (Fleurette *et al.*, 1995 ; Trofimova *et al.*, 1983). En testant le formaldéhyde à 1,4% comme cela est recommandé par la norme nous observons une importante toxicité cellulaire. Le formaldéhyde ne sera donc pas utilisé comme référence pour ces essais.

Pour le GTA nous avons pu déterminer une CI_{50} entre 0,5 et 1% à 24 et 96 h. Le GTA pourra donc être testé à des concentrations de 1 à 2,5% maximum au contact du virus.

L'éthanol possède une CI_{50} supérieure à 10 % au bout de 24 h et comprise entre 6 et 8% à 96 h: l'alcool à 70% ($^{v}/_{v}$) peut donc être testé étant donné qu'après la dilution au 100ème décrite dans notre protocole, la concentration finale d'alcool au contact des cellules ne dépassera pas 0,7%.

Les essais seront donc réalisés avec le GTA à 1, 2 et 2,5% et l'alcool à 70% ($^{v}/_{v}$).

1.5.1.3.2 Détermination des activités antivirales des molécules de référence sur le poliovirus Lsc2ab par la méthode de titrage en tapis monocellulaire

Le GTA 2,5% et l'alcool 70% ($^{v}/_{v}$), précédemment retenus pour les essais de virucidie sont mis en contact avec le poliovirus selon le protocole établi durant 1min. La colonne 3 de la plaque au GTA (0,025%) ne présente pas de tapis cellulaire. Ceci n'est pas dû à la lyse cellulaire provoquée par le virus mais à une altération de la viabilité cellulaire comme l'atteste le test au MTT.

Le titre initial du poliovirus est de $10^{-7,2}$.

Après 1min de contact en présence d'alcool 70% ($^{v}/_{v}$), le titre viral est de $10^{6,2}$. Ainsi l'alcool 70% ($^{v}/_{v}$) possède une activité antivirale car une diminution de plus de 0,5 log du titre viral est observée (7,2 – 6,2 = 1 log) (Tableau XXXIII). Cette diminution étant inférieure à 4 log, le terme d'activité antiseptique-antivirale établi par la norme ne pourra pas être employé.

En présence de GTA 2,5%, le titre viral est de 10^{2} après 1 min de contact. Le GTA 2,5% possède une activité antivirale/désinfectante après 1 min de contact (perte de 7,2 – 2 = 5,3 log de $DICT_{50} > 4$).

Tableau XXXIII : Δ $DICC_{50}$ obtenus sur le poliovirus pour les molécules de référence.

	Alcool	**GTA**		
	70%	1%	2%	2,50%
Δ $DICT_{50}$ en log	1	4,3	4,75	5,3

n=3

D'après la littérature, le GTA 2% est actif sur le poliovirus (Bailly *et al.*, 1991). L'origine des tests ayant permis d'établir cette valeur et les méthodes utilisées ne sont pas détaillées dans les publications scientifiques. Afin de confirmer ce résultat, nous avons testé l'efficacité du GTA à 1 et 2% en plus de la concentration à 2,5% testée précédemment (Tableau XXXIII). Des tests de viabilité au MTT ont bien sûr été réalisés et aucune altération de la viabilité cellulaire n'est à signaler.

Après action du GTA 1%, une différence de 6,8 - 2,5 = 4,3 log de $DICT_{50}$ est observée. Pour le GTA 2%, la différence s'élève à 4,75 log. Jusqu'à une concentration de 1%, le GTA possède une activité antivirale/désinfectante selon la norme NF EN 14476+A1.

1.5.1.3.3 Détermination des activités antivirales des molécules de référence sur le poliovirus Lsc2ab par la méthode des plages de lyse

Les plages de lyse des différents puits sont comptées. Mais seuls les puits avec des plages de lyse non confluentes seront comptabilisés. Dans notre cas, seuls deux puits présentent des plages de lyse dans les puits 10^{-4} et 10^{-5}. A partir de ces plaques et de l'Équation 3, on détermine l'unité formant plage :

UFP/t = [5 + 4] / [(1 + 1 × 0,1 + 1 × 10-2 + 10-3 + 10-4+ 10-5+ 10-6+ 10-7+ 10-8+ 10-9 + 10-10) ×10-2] = 810

Soit en logarithme décimal : UFP/t = 2,9

Or t le volume de dilution virale ajoutée dans chaque puits est de 400 µL.

Ainsi UFP/mL = 7,25 (exprimé en log).

Cette méthode a également été utilisée pour tester les drogues mais aucun résultat n'a été obtenu du fait de la difficulté technique de cette manipulation (séchage des tapis cellulaire, arrachage du tapis lors de l'élimination de la couche de milieu gélosé…).

1.5.1.3.4 Détermination des activités antivirales des molécules de référence sur le hCMV par la méthode de titrage en tapis monocellulaire

L'alcool entraîne une perte supérieure à 4 log du titre viral (5,5) et possède donc une activité antiseptique-antivirale. Le GTA 2% entraine une diminution de log de 3,5, insuffisante pour parler d'activité antiseptique-antivirale.

1.5.2 Activité antivirale : application

Le GTA et l'alcool 70% ($^{v}/_{v}$) ont permis de valider notre modèle d'étude en démontrant sa capacité à mettre en évidence des activités antivirales des substances sur le poliovirus et sur le hCMV. Nous pouvons donc maintenant tester les AHPTs.

1.5.2.1 **Les acides hydroxy pentacycliques triterpénoiques : activité antivirale**

Le solvant utilisé pour tester les AHPTs est le DMSO. L'activité antivirale du DMSO pur sur le hCMV peut permettre d'observer une diminution de 0,65 log en moyenne, soit presque 10% de la valeur initiale ce qui n'est pas négligeable. Pour le poliovirus, la

diminution de 0,64 log en moyenne est aussi élevé pour un titre de départ de 7,2 log. La concentration testée pour les AHPTs est de 10^{-3}M, concentration à partir de laquelle il est aisé de différencier les ECP de la toxicité propre de nos molécules.

Tableau XXXIV : Δ $DICC_{50}$ des virus testés avec les AHPTs libre & impact du DMSO.

	titre solution mère de virus	DMSO	AU	AO	AB
Polio Lsc2ab / L132	7,19	6,56	8,52	9,5	10
Δ % titre		***-0,64***	1,33	2,31	2,81
Δ % DMSO			1,97	2,95	3,45
hCMV AD169 / MRC5	8,99 7,77	7,11	10,80	9,30	4,62
Δ % titre		***-0,66***	1,81	0,31	**-4,37**
Δ % DMSO			2,47	0,97	**-3,71**

n=3

En ce qui concerne le DMSO, une activité antivirale de faible intensité a pu être mise en évidence. Il n'est pas possible pour le moment de savoir si, combinée à une autre substance, cette activité du DMSO potentialisera l'effet que l'on cherche à mesurer. De fait, nous avons décidé de calculer des différences de titres viraux en tenant et en ne tenant pas compte de l'impact du DMSO.

En ce qui concerne le poliovirus, virus nu, aucune activité antivirale n'a été mise en évidence. Au contraire, chacune des molécules testées, AU, AO et AB semble accroître le titre viral des suspensions testées, potentialisant l'infectiosité du poliovirus.

Concernant les tests sur le hCMV, virus enveloppé, l'AB entraîne une diminution significative (plus de 4 log) du titre viral. L'AO et l'AU, quant à eux, ne présentent pas d'activité sur ce virus, au contraire, une augmentation du titre viral avec ces composés a été observé (Tableau XXXIV).

Il est à noter une fois encore l'importance des membranes biologiques dans les activités des AHPTs. En effet la seule activité antivirale notable est liée à un virus possédant une telle structure. Rappelons pour mémoire que l'AB est reconnu pour son activité antivirale par de nombreux auteurs (Shikov *et al.*, 2011 ; Yao *et al.*, 2009). Cependant aucune référence n'a pu être trouvée concernant ces virus et les AHPTs étudiés.

1.5.3 Discussion à propos de la norme AFNOR NF EN 14476+A1

1.5.3.1 **Le choix des virus**

Nous avons choisi de valider l'essai de virucidie par des tests sur un virus nu ; le poliovirus.

- Intérêts de réaliser les tests sur hCMV ?

En cas d'absence d'activité sur ces virus nus nous avons décidés de réaliser des tests sur le hCMV : un virus enveloppé largement répandu en médecine humaine et potentiellement endémique surtout à l'hôpital où il serait responsable d'infections associées aux soins.

- Intérêts de réaliser les tests sur le poliovirus ?

Jusqu'en 1988, la poliomyélite était présente dans le monde entier et endémique dans plus de 125 pays du fait de sa transmission féco-orale et de sa grande résistance dans le milieu extérieur grâce à l'absence d'enveloppe. Aujourd'hui, elle est totalement éradiquée sur une grande partie du globe surtout grâce à l'efficacité de la vaccination. Elle est encore endémique au Nigéria, Pakistan, en Inde et en Afghanistan. Seuls de rares cas d'importations persistent dans les pays développés. Le poliovirus est donc rarement impliqué dans les « infections associées aux soins » et son emploi comme virus nu de référence dans les essais de virucidie peut être discuté. Une des raisons justifiant encore son utilisation est qu'il demeure l'un des virus les plus résistants décris. Des études récentes proposent de remplacer le poliovirus par le virus de l'hépatite B plus largement rencontré en médecine humaine.

1.5.3.2 **Le choix des molécules de référence**

Le formaldéhyde est un fixateur cellulaire ce qui pose problème lors des essais sur cellules. Il est donc étonnant qu'il soit cité comme molécule de référence à 1,4% dans la norme. Il ne faut pas oublier l'interdiction qui frappe le formaldéhyde. En France sont interdite sa mise sur le marché comme biocide depuis le premier novembre 2011 et son utilisation toujours comme biocide depuis le premier mai 2012 (JORF, 2011). A terme cela devrait être étendue à l'Europe entière.

Le GTA offre un bon compromis comme molécule de référence si l'on fait abstraction de sa forte toxicité. Il faut tout de même souligner que le GTA n'est plus soutenu par l'industrie et qu'il commence à être touché par des interdictions d'utilisation depuis août 2011 pour certaine utilisation biocide (JORF, 2010).

L'éthanol, avec une activité restreinte, reste utilisable pour montrer la validité d'une méthode de recherche d'activité antivirale.

Il serait intéressant de chercher de nouvelles molécules (présentant moins de problèmes), qui serait utilisable comme antiseptique et pourrait servir de référence pour ce type d'étude. Bien sur l'utilisation d'antiviraux connus est une piste qui est ouverte, cependant, la molécule de référence pourrait alors varier selon le modèle choisi. En effet certains type d'antiviraux, par exemple les inhibiteurs de RT, ne seraient pas très adaptés dans notre situation.

1.5.3.3 **Le temps de contact virus-drogue**

La norme précise que le temps de contact doit être déterminé selon l'utilisation pratique prévue pour le produit ; pour les désinfectants de surfaces et d'instruments, les temps sont de 5, 15, 30 et 60 min. Nous avons choisi de tester le temps de 1 min., les temps proposés par la norme semblent relativement longs en rapport des conditions d'usage habituelles d'un antiseptique : lavage des mains par friction durant 30 sec. … Ces temps sont malgré tout cités dans la norme car des temps plus faibles seraient impossibles à mettre en pratique, par le protocole d'essai.

1.5.3.4 **La notion d'activité antiseptique-antivirale**

L'antiseptique/désinfectant doit-il faire disparaître toute trace de constituants viraux ou juste inactiver les particules virales ? Dans notre cas d'étude de la virucidie, seules les particules virales infectieuses nous intéressent. Ainsi la quantification de génome viraux par biologie moléculaire n'a pas de raison d'être utilisée ici. De plus quel serait l'intérêt de quantifier des « débris » viraux non infectieux ? En effet la détection de fragment génomique est insuffisante pour confirmer la présence de virus infectieux.

La réduction de 4 logs demandée par la norme n'est-elle pas trop exigeante ? Il faut rappeler que lors de cette méthode de titrage, nous quantifions uniquement les particules virales actives et infectieuses et non les débris viraux non infectieux (ARN, capside…). Ainsi la barre de 4 log fixée par la norme représente une inactivation de 99,99% des virus infectieux présents, est tout à fait légitime par principe de précaution.

1.6 Activité anticancéreuse

1.6.1 Efficacité sur les lignées cellulaires cancéreuses

La Figure 26 nous montre l'efficacité des AHPTs à 6, 12, 18, 24 et 48 h sur les cellules K562.

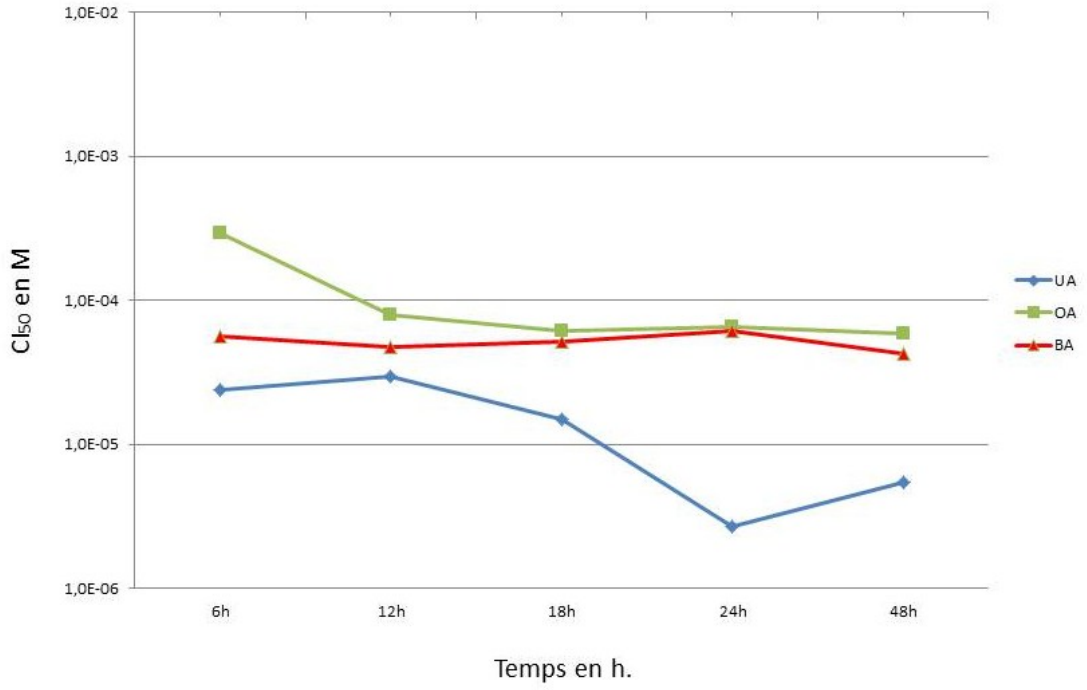


Figure 26 : Evolution des CI_{50} des AHPTs envers les K562

Les AHPTs montrent tous une valeur de CI_{50} de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-6} M. Nous pouvons noter que ces valeurs sont temps - dépendant puisque les CI_{50} diminuent toutes au cours du temps pour AU et AO. Ces valeurs obtenues pour l'AU et l'AO ($\approx 10^{-5}$ M)sont en accord avec les résultats de Ovesna (Ovesná *et al.*, 2006) ; pour AB, ces valeurs ($\approx 10^{-6}$ M) sont en accord avec les valeurs trouvées par Wu *et coll.* (Wu *et al.*, 2010).

Tableau XXXV : CI_{50} des AHPTs obtenues par tests MTT sur K562 doxoR.

K562doxoR	6h	12h	18h	24h	48h
AU	1,00E-04	1,00E-04	1,00E-04	1,00E-04	ND
AO	1,00E-04	1,00E-04	1,00E-04	1,00E-04	ND
AB	1,00E-04	1,00E-04	1,00E-04	1,00E-04	ND

n=3 – ND : Non Déterminé

Concernant les cellules K562 doxorubicine résistantes, aucune CI_{50} n'a pu être déterminée dans nos conditions opératoires.

La comparaison des résultats obtenus sur la lignée K562 et K562 doxoR donne une indication sur les cibles potentielles des AHPTs. En effet le mécanisme de résistance à la doxorubicine est lié à une pompe à efflux située sur l'enveloppe nucléaire des cellules (Hui *et al.*, 2008). Si ce mécanisme agit sur les AHPTs comme il agit sur la doxorubicine, les AHPTs devraient se retrouver expulsés du noyau des K562 doxoR, indiquant alors une cible nucléaire. Ce résultats va dans le sens des propositions de Kim et d'une action des AHPTs sur les acides nucléiques ou les protéines nucléaires (Kim *et al.*, 2000) chez les cellules animales.

Tableau XXXVI : CI_{50} des AHPTs par test MTT sur IgROV1.

IgrOV1	6h	12h	18h	24h	48h
AU	1,00E-04	1,00E-04	1,00E-04	1,00E-04	ND
AO	1,00E-04	1,00E-04	1,00E-04	1,00E-04	ND
AB	1,00E-04	1,00E-04	1,00E-04	1,00E-04	ND

n=3 – ND : Non Déterminé

Concernant les cellules IgrOV1, aucune valeur de CI_{50} n'a pu être déterminée selon nos conditions opératoires. Habituellement pour cette lignée cellulaire la CI_{50} est de l'ordre de ≈ 10 µM après 72 h de contact entre l'AB et les IgrOV1 (Zuco *et al.*, 2002). Aucune données concernant les CI_{50} de l'AU et de l'AO sur les IgrOV1 n'a pu être trouvée dans la littérature.

1.6.2 Le rapport à la cytotoxicité sur MRC5

La Figure 27 montre la cytotoxicité des AHPTs à 6, 12, 18, 24 et 48 h sur les cellules MRC5.

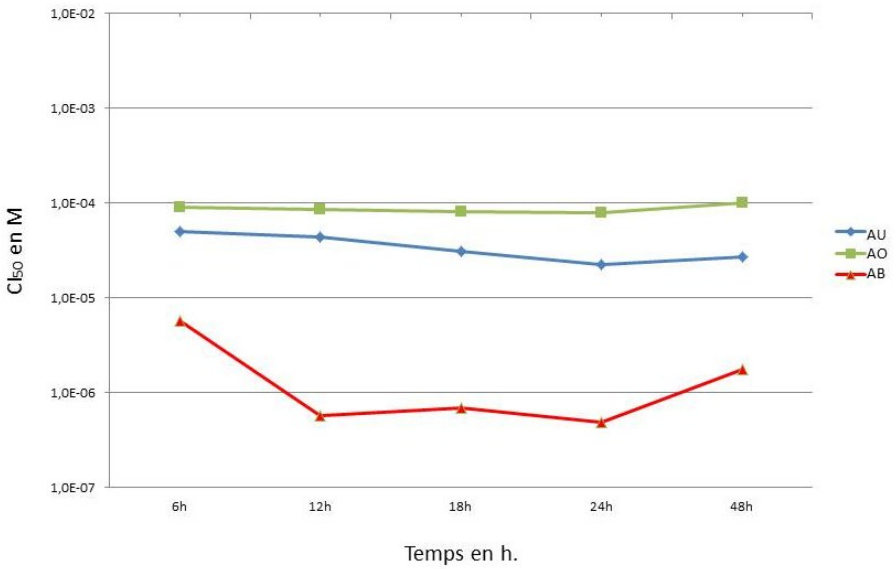


Figure 27 : Evolution des CI_{50} des AHPTs envers les MRC5.

Les cellules K562 et MRC5 se montrent sensibles à l'AU avec des valeurs de CI_{50} de l'ordre de ≈ 10 µM. Comme l'AU, l'AO est toxique sur les cellules MRC5. Comme attendu, l'AB montre une grande toxicité à l'encontre des K562 mais aussi des MRC5.

Les MRC5 montrent une grande sensibilité à l'AB avec des valeurs de CI_{50} de l'ordre du µmolaire dès 24 h d'exposition alors que l'AU et l'AO présentent sur les MRC5 des valeurs de CI_{50} 10 fois plus élevées avec des valeurs de plusieurs dizaines de µM. Le temps d'exposition n'influe pas sur la valeur des CI_{50} qui ne varient que très peu en fonction du temps.

Si nous comparons ces valeurs de cytotoxicité sur MRC5 aux valeurs d'efficacités déterminées sur les K562 nous pouvons, comme pour l'activité antibactérienne calculer des index de sélectivité présentés dans le Tableau XXXVII.

Tableau XXXVII : IS des AHPTs sur K562 *vs*. MRC5.

IS	6h	12h	18h	24h	48h
AU	2,09	1,51	2,09	8,35	5,06
AO	0,31	1,09	1,34	1,21	1,69
AB	0,10	0,01	0,01	0,01	0,04

n=3

Les IS indique que l'AU est une molécule présentant un fort intérêt anticancéreux puisqu'il a des IS supérieurs à 2 pour tous les temps d'exposition. Ces IS atteignent même des valeurs de 8 à 24 h.

L’AO possède des valeurs d’IS aux alentours de 1. Sans présenter le même intérêt que l’AU cette molécule reste intéressante pour une éventuelle utilisation en thérapeutique.

L’AB quant à lui obtient des scores d’IS très inférieurs à 1. Alors que beaucoup d’auteurs proposent l’intégration de cette molécule dans l’arsenal thérapeutique anticancéreux du fait de sa grande cytotoxicité, les IS calculés ici montre à quel point la seule détermination d’une efficacité anticancéreuse sans mise en perspective avec la notion de toxicité peut entrainer vers des voies sans issue.

2 Etude physicochimique de la complexation et des complexes acides hydroxy pentacycliques triterpénoiques – gamma-cyclodextrine

2.1 Chromatographie liquide haute performance

2.1.1 Choix des conditions opératoires

Pour déterminer le choix de la CD, nous avons utilisé initialement les conditions opératoires décrites par Claude (Claude *et al.*, 2004) soit :

- une phase mobile variant de 55/45 à 70/30 ($^{v}/_{v}$) d'acétonitrile/tampon phosphate,
- la colonne 1
- une concentration en CD variant de 2 à 12 mM,
- un débit de 1 mL/min,
- une température de 25°C

Après avoir réalisé les premières injections d'AU sans CD, les temps de rétention obtenus ont été de l'ordre de 10 minutes ce qui semble acceptable pour cette étude au vu du nombre important d'injections à faire. Cependant cette concentration en acétonitrile s'est avérée incompatible avec la solubilisation de la cyclodextrine. En effet, même à la concentration de 3 mM, cette dernière précipite dès l'ajout d'acétonitrile à la solution tampon.

Le méthanol pur a donc été utilisé comme solvant de remplacement de l'acétonitrile dans lequel toutes les CDs présentent une meilleure solubilité. Cependant, avec le méthanol, les temps de rétention sont beaucoup plus grands, de l'ordre de 50 minutes. L'échange de la colonne 1 par la colonne 2, l'augmentation du débit à 2 mL/min. et une température d'expérimentation de 50°C, n'ont pas permis d'obtenir des temps de rétention inférieurs à 50 minutes. Donc un mélange méthanol/tampon phosphate ne s'avère pas pertinent.

Le retour à un mélange acétonitrile/tampon phosphate 50/50 ($^{v}/_{v}$) reste le meilleur compromis lors de cette première étape, mais avec augmentation de la température.

Les nouvelles conditions opératoires ont donc été les suivantes :

- une phase mobile 50/50 ($^{v}/_{v}$) acétonitrile/tampon phosphate
- la colonne 2
- une concentration en CD de 4 mM,
- un débit de 3 mL/min,
- une température de 50°C
- des injections (boucle de 20µL) de solutions méthanoliques d'AHPTs à 0,1 mg/mL.

Elles ont permis d'obtenir des temps de rétention de l'ordre de 20 min. tout en conservant une pression inférieure à 200 bars. Ce sont donc ces conditions opératoires qui ont été appliquées par la suite lors du choix de la CD.

2.1.2 Choix de la cyclodextrine

La CLHP a permis de mettre en évidence un retard de migration des AHPTs injectés dans la phase mobile sans CD par rapport aux AHPTs injectés dans la phase mobile maintenue à 50°C avec des concentrations croissantes de différentes CDs (β-CD, γ-CD, HP-β-CD, HP-γ-CD).

Le tableau suivant (Tableau XXXVIII) montre les constantes apparentes de formation Kf des complexes obtenus lors du tracé des droites des coefficients de détermination (1/k') en fonction des concentrations en CDs (Équation 6 p. 103).

Tableau XXXVIII : K_f (M^{-1}) des complexes AHPTs : CD, à 50°C.

CD	Triterpène	R^2	K_f (M^{-1})
βCD	AU	0,999	1,7 ± 1,6
	AB	0,934	5,6 ± 2,1
	AO	0,971	32,7 ± 3,7
γ-CD	AU	0,999	770,7 ± 14,2
	AB	0,999	1610,5 ± 62,3
	AO	0,999	601,5 ± 9,3
HPβCD	AU	0,954	18,5 ± 6,4
	AB	0,893	11,2 ± 7,5
	AO	0,591	38,5 ± 20,5
HPγ-CD	AU	0,999	730,6 ± 13,1
	AB	0,999	1536,5 ± 49,8
	AO	1,000	671,9 ± 6,9

2.1.2.1 **Coefficients de détermination**

Le Tableau XXXVIII présente les coefficients de détermination (R^2) pour les tracés des courbes 1/k' en fonction de la concentration en CD présente dans la phase mobile. Ils ont été calculés pour des modèles de complexes 1 : 1. Les coefficients de détermination (R^2) se rapprochant de 1 avec ce modèle de calcul, la stœchiométrie 1 : 1 des complexes est donc confirmée.

2.1.2.2 **Constantes apparentes de formation**

Le Tableau XXXVIII fait ressortir que l'utilisation de la β-CD, qu'elle soit native ou hydroxy-propylée, comme additif à la phase mobile conduit à l'obtention de constantes de formation des complexes faibles de 1,7 à 38,5 M^{-1} et ce quel que soit l'AHPT utilisé.

Pour ces deux β-CD, la taille de la cavité interne (60 – 65 nm) est certainement trop petite pour l'invité.

Pour les deux γ-CD utilisées, les constantes de formation observées sont très proches pour un même AHPT et conduisent à la formation de complexes dont la Kf est toujours supérieure à 600 M-1.

Des constantes de formation comprises entre 600 et 700 M-1 ont été obtenues pour l'AU et l'AO. Ceci est certainement dû au fait que leurs structures sont très similaires. En effet, il s'agit d'une simple isomérie de position d'un groupement hydroxyle en position C_{19} pour l'AU et C_{20} pour l'AO.

La plus forte constante de formation a été obtenue pour les complexes AB : γ-CD. Cet AHPT est donc en interaction plus forte avec la γ-CD que les AHPTs AU et AO.

L'existence d'un groupement hydroxypropyl greffé sur la CD ne montre que très peu ou pas d'influence sur la complexation des AHPTs.

Ainsi pour toutes ces raisons mais également pour des raisons économiques et toxicologiques, la γ-CD sera choisie pour la suite des expérimentations.

2.1.3 Caractérisation de la complexation des acides hydroxy pentacycliques triterpénoiques avec la gamma-cyclodextrine

Afin de pouvoir caractériser les complexes d'un point de vue thermodynamique, il est indispensable de faire varier la température du système chromatographique. Or la γ-CD ajoutée à une concentration de 4 mM est très peu soluble dans le mélange acétonitrile/tampon phosphate lorsque la température est inférieure à 50°C. De nouveaux essais de phase mobile ont donc été réalisés. La solution a été apportée avec une phase mobile méthanol/tampon phosphate 88/12 ($^{v}/_{v}$) qui a permis la solubilisation de la γ-CD pour des concentrations allant de 0 à 4 mM et ce de 25 à 45°C.

Les nouvelles conditions opératoires ont donc été les suivantes :

- une phase mobile 88/12 ($^{v}/_{v}$) méthanol /tampon phosphate,
- une concentration en CD de 0 à 4 mM,
- la colonne 3,
- un débit de 3 mL/min,
- une température de 25 à 45°C.

Afin de s'assurer que la variation des temps de rétention des AHPTs est bien due à l'interaction entre la γ-CD et les différents invités, une concentration en glucose de 32 mM a été ajoutée à la phase mobile maintenue à 25°C en remplacement de la concentration en γ-CD de 4 mM dans la phase mobile.

Il s'en est suivi qu'aucune variation du temps de rétention des AHPTs n'a été observée lorsque la γ-CD est remplacée par du glucose. Cela confirme que la différence de migration est bien due à une interaction entre la γ-CD et les AHPTs et non à une variation de la viscosité de la phase mobile due à l'adjonction de sucre.

2.1.3.1 Influence de la concentration en gamma-cyclodextrine dans la phase mobile

L'influence de la concentration en γ-CD dans la phase mobile est montrée à titre d'exemple sur la Figure 28 qui représente les chromatogrammes obtenus lors de l'injection d'AU avec des concentrations en γ-CD de 0 à 4 mM dans la phase mobile.

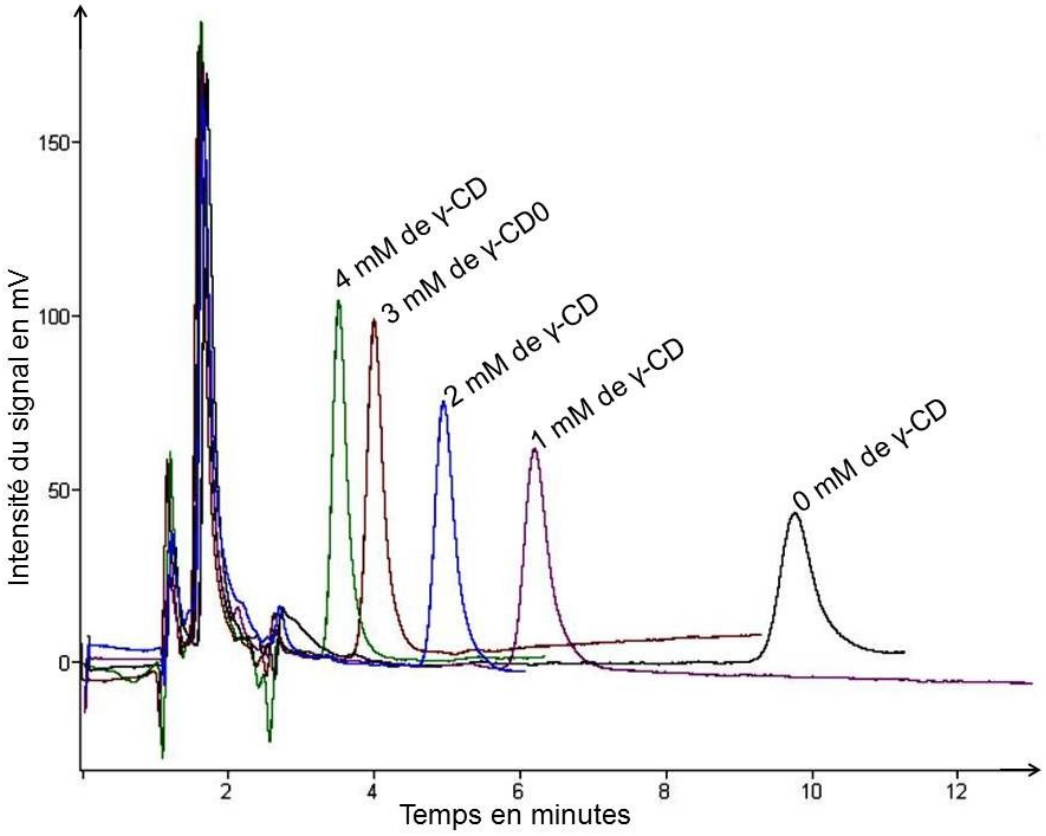


Figure 28 : Influence de l'addition de γ-CD à différentes concentrations dans la phase mobile sur le temps de rétention de l'AU à 25°C.

Ces chromatogrammes représentés Figure 28 montrent bien qu'il existe une interaction entre l'AU et la γ-CD. En effet, plus la concentration en γ-CD augmente, plus le temps de rétention de l'AU diminue. Cela signifie que l'AU, de plus en plus polaire par sa

complexation avec la γ-CD interagit de moins en moins avec la phase stationnaire apolaire et de ce fait est de moins en moins retenu. Cela a été confirmé pour AO et AB.

2.1.3.2 **Influence de la température d'expérimentation sur les facteurs de capacités et les constantes de complexation**

L'étude de l'influence de la température d'expérimentation sur la mobilité des AHPTs a été réalisée à différentes concentrations en γ-CD. Les facteurs de capacités ont été déterminés pour :

- une concentration en γ-CD de 0 à 4 mM,
- une température de 25 à 45°C.

2.1.3.2.1 Influence sur les facteurs de capacité

Les facteurs de capacités des AHPTs en fonction de la température du système et de la concentration en γ-CD sont rassemblés dans le Tableau XXXIX.

Tableau XXXIX: k' des AHPTs dans une phase mobile contenant de 0 à 4 mM de γ-CD.

AHPTs	Temp (°C)	γ - CD concentration (mM)				
		0	1	2	3	4
AU	25	3,85 ± 0,03	3,71 ± 0,00	2,08 ± 0,02	1,72 ± 0,01	1,37 ± 0,00
	30	3,74 ± 0,12	3,71 ± 0,08	2,13 ± 0,05	1,89 ± 0,05	1,42 ± 0,05
	35	3,47 ± 0,01	2,87 ± 0,10	1,92 ± 0,01	1,71 ± 0,02	1,32 ± 0,05
	40	2,54 ± 0,01	2,39 ± 0,01	1,81 ± 0,01	1,64 ± 0,02	1,04 ± 0,02
	45	2,66 ± 0,00	2,40 ± 0,03	1,43 ± 0,01	1,46 ± 0,02	1,20 ± 0,02
AO	25	3,63 ± 0,01	3,59 ± 0,02	2,08 ± 0,03	1,76 ± 0,01	1,41 ± 0,01
	30	3,57 ± 0,13	3,66 ± 0,00	2,07 ± 0,01	1,99 ± 0,06	1,53 ± 0,03
	35	3,24 ± 0,01	2,74 ± 0,11	1,76 ± 0,06	1,69 ± 0,06	1,38 ± 0,03
	40	2,35 ± 0,02	2,20 ± 0,02	1,77 ± 0,02	1,65 ± 0,01	1,07 ± 0,01
	45	2,53 ± 0,04	2,26 ± 0,01	1,39 ± 0,01	1,43 ± 0,00	1,26 ± 0,02
AB	25	3,17 ± 0,05	2,36 ± 0,01	1,13 ± 0,03	0,78 ± 0,02	0,59 ± 0,00
	30	3,12 ± 0,04	2,44 ± 0,02	1,33 ± 0,04	0,92 ± 0,01	0,79 ± 0,05
	35	2,89 ± 0,03	1,96 ± 0,00	1,13 ± 0,02	0,92 ± 0,04	0,68 ± 0,02
	40	2,32 ± 0,02	1,99 ± 0,02	1,15 ± 0,00	0,82 ± 0,01	0,76 ± 0,00
	45	2,22 ± 0,03	1,67 ± 0,01	0,86 ± 0,01	0,80 ± 0,00	0,71 ± 0,02

n=3 - Valeurs de k'± écart type

Ces résultats montrent que les facteurs de capacités diminuent d'autant plus que la température d'expérimentation augmente et cela quelle que soit la concentration en γ-CD dans la phase mobile.

2.1.3.2.2 Influence sur les constantes de complexation

Les données de k' du Tableau XXXIX ont permis de calculer les K_f des complexes AHPTs : γ-CD à des températures variants de 25 à 45°C. Ces K_f sont présentées dans le Tableau XL.

Tableau XL : Influence de la température d'expérimentation (de 25 à 45°C) sur K_f.

AHPT's	Température (°C)	K_f (M^{-1})
AU	25	584 ± 62
	30	512 ± 61
	35	418 ± 49
	40	413 ± 70
	45	324 ± 38
AO	25	498 ± 51
	30	400 ± 50
	35	351 ± 31
	40	323 ± 52
	45	264 ± 34
AB	25	1881 ± 418
	30	1010 ± 144
	35	966 ± 99
	40	670 ± 79
	45	557 ± 79

L'étude de la température sur la mobilité des AHPTs en CLHP a permis de montrer qu'elle impacte le phénomène de complexation de façon significative. En effet, pour un triterpène donné, l'augmentation de la température entraine une diminution de la constante de complexation du couple triterpène : γ-CD. Ainsi en passant de 25 à 45°C l'AU voit, sa constante de complexation diminuer presque de moitié (584 à 324 M^{-1}) ; celle de l'AO également (498 à 264 M^{-1}). L'AB, possédant une constante plus élevée que l'AU et l'AO voit cette dernière diminuer d'un facteur supérieur à 3 passant de 1881 M^{-1} à 25°C à 557 M^{-1} à 45°C.

La variation de la concentration en γ-CD dans la phase mobile sur la mobilité en CLHP des AHPTs, a permis de confirmer que les complexes ont des K_f que l'on peut qualifier de moyennes à faibles pour l'AU et l'AO (584 et 498 M^{-1} à 25°C) et de moyennes à élevées pour l'AB (1881 M^{-1} à 25°C). Les valeurs de K_f du complexe AB : γ-CD sont 3 fois supérieures à celles des K_f des complexes obtenus avec l'AU et l'AO.

Ces valeurs de K_f sont en accord avec celles déterminées par Claude *et coll.* en 2004 avec l'HP-γ-CD. Selon cet auteur, à 50°C l'AB : HP-γ-CD a une valeur de K_f de 3469 M^{-1}, l'AU : HP-γ-CD de 1031 M^{-1} et l'AO : HP-γ-CD de 1039 M^{-1} (Claude *et al.*, 2004).

Les forces mises en jeu lors de cette complexation AHPTs : γ-CD restent cependant encore mal connues. Comme très souvent lors de l'utilisation de CD, il est proposé que ces forces soient des forces hydrophobes, électrostatiques, de Van der Walls ou des liaisons hydrogènes (Liu et Guo, 2002). Elles semblent agir indépendamment ou en coopération les unes avec les autres entre la molécule invitée et la molécule hôte au cours de la formation du complexe. En revanche, aucune liaison covalente n'intervient.

2.1.3.3 **Aspect thermodynamique de la complexation des acides hydroxy pentacycliques triterpénoiques avec la gamma-cyclodextrine**

Le tracé des droites représentant 1/k' en fonction de la température pour chaque AHPT permet de déterminer les variations d'entropie de formation (ΔS_f) et les variations d'enthalpie de formation (ΔH_f). Le Tableau XLI regroupe l'ensemble des résultats de ΔS_f, ΔH_f et les variations d'enthalpie libre de formation (ΔG_f) pour les différents complexes AHPT : γ-CD. Les ΔG_f ont été calculés pour une température de 25°C (298K).

Tableau XLI : Caractérisation thermodynamique de la complexation AHPTs / γ-CD à 25°C.

AHPT's	T (K)	ΔH°f (J/mol)	ΔS°f (J/K/mol)	TΔS°f (J/mol)	ΔG°f (J/mol)
AU	298	-21953 ± 2812	-21 ± 9	-6156	15797
AO	298	-23436 ± 1946	-27 ± 6	-8104	15332
AB	298	-42585 ± 7690	-81 ± 25	-24251	18334

Les valeurs de ΔH_f sont au minimum 1000 fois supérieures aux valeurs de ΔS_f pour l'AU et l'AO et 500 fois supérieures pour l'AB. L'étude thermodynamique à ainsi montré un phénomène de formation des complexes lié à l'enthalpie du système. La formation des complexes lorsque les AHPTs sont en présence de γ-CD, est énergétiquement favorable, et donc spontanée.

2.1.4 Détermination de la solubilité des complexes acides hydroxy pentacycliques triterpénoiques – gamma-cyclodextrine selon Higuchi et Connors

Les AHPTs sont pratiquement insolubles dans l'eau. Nous avons pu déterminer par CLHP que leur solubilité aqueuse, après 7 jours d'agitation à 420 rpm et à 37°C était de :

- 0,015 mM pour l'AU
- 0,058 mM pour l'AO
- 0,046 mM pour l'AB

Nous avons précédemment démontré que les AHPTs se complexaient avec la γ-CD. Mais comment cela influence-t-il l'hydrosolubilité des AHPTs ?

Le diagramme de solubilité aqueuse des AHPTs en fonction de la concentration en γ-CD, représenté Figure 29 permet de répondre à cette question.

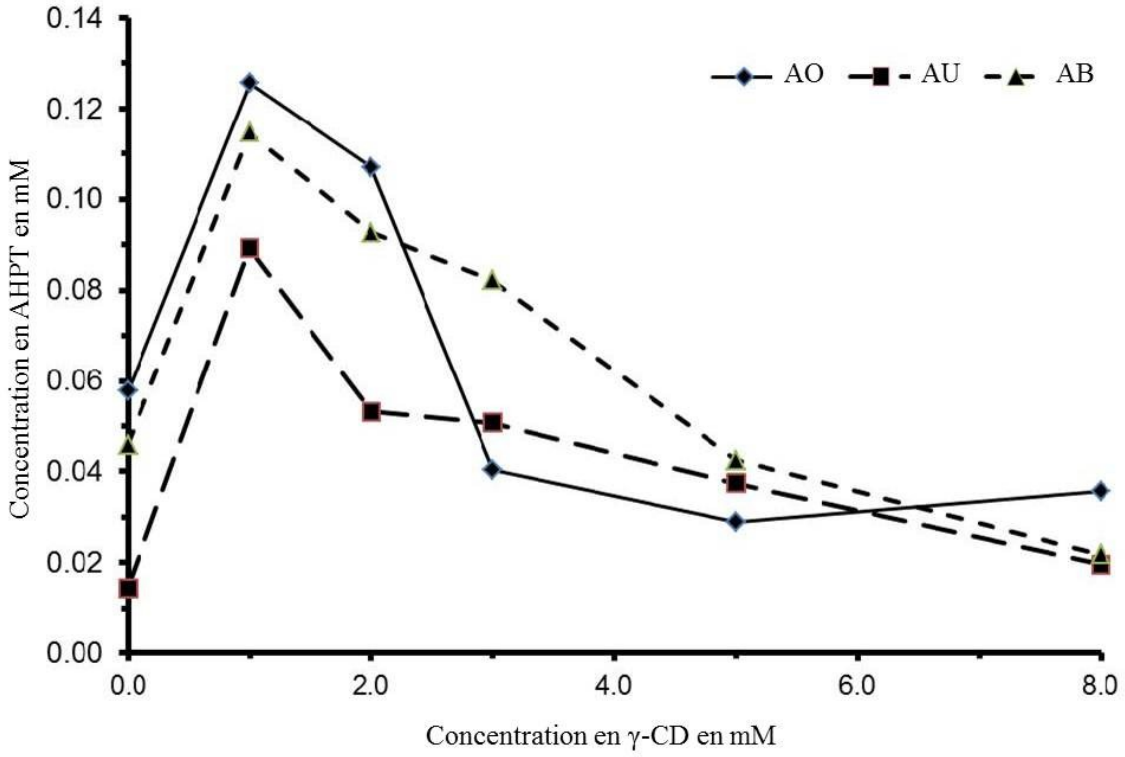


Figure 29 : Diagramme de phase du système AHPTs/γ-CD

Pour chaque AHPT, l'étude a permis d'observer une courbe de Higuchi-Connors de type B (Higuchi et Connors, 1965). Cela signifie que les complexes AHPTs : γ-CD possèdent une solubilité aqueuse limitée, voire très limitée.

La solubilité aqueuse des AHPTs a pu être mesurée. Dans des conditions équimolaires d'AHPTs et de γ-CD, elle est de :

- 0,089 mM pour l'AU,
- 0,126 mM pour l'AO
- 0,115 mM pour l'AB

Ceci correspond à des augmentations significatives de l'hydrosolubilité de l'ordre de deux fois pour l'AB et l'AO et de six fois pour l'AU. Donc, la complexation des AHPTs avec la γ-CD permet bien d'augmenter l'hydrosolubilité des triterpènes de façon mesurable.

2.2 Préparation des complexes

Ce travail préliminaire a permis de montrer que la complexation des trois AHPTs considérés était la plus forte avec la γ-CD et le complexe obtenu est de type 1 : 1. Ces complexes sont très peu solubles en solution aqueuse, il est donc possible de les fabriquer par la méthode de précipitation.

Les conditions de fabrication ont été les suivantes :

- les masses d'AHPTs et de γ-CD mises en œuvre ont été respectivement de 100,00 mg et de 283,88 mg afin d'obtenir le ratio molaire de 1 :1
- la température du mélange a été maintenue à 37°C sachant qu'une température de 25°C aurait été préférable car les AHPTs ont une meilleure affinité pour la γ-CD à 25°C qu'à une température supérieure. Cependant cette température est la plus souvent retenue pour la fabrication de complexes à des fins thérapeutiques
- un temps d'agitation d'1 h,
- une filtration sur membrane nylon 0,45µm,
- un séchage d'une nuit à l'air libre.

Les masses totales de complexes obtenus après fabrication ainsi que les rendements de fabrication sont résumés dans le Tableau XLII.

Tableau XLII : masses d'AHPTs et de γ-CD mises en œuvre et rendements de fabrication.

Masse de γ-CD en mg	284,86	284,23	284,15	284,4	284,85	284,40	285,29	284,21	284,33
Masse d'AU	100,63	100,54	100,06						
Masse d'AO				100,23	99,66	100,34			
Masse d'AB							100,41	102,00	99,98
Masse totale	385,09	384,77	384,21	384,63	384,51	384,74	385,70	386,21	384,31
Masse de complexe	364,42	316,48	381,70	418,79	409,04	404,74	410,70	408,08	394,36
Rendement en %	94,63	82,25	99,30	108,88	106,37	105,19	106,48	105,66	102,61

Trois fabrications différentes pour chaque AHPT ont été réalisées. Le Tableau XLII montre que la masse de complexe récupéré après filtration s'approchait de la somme des masses d'AHPTs et de γ-CD.

De plus, la γ-CD étant très soluble dans l'eau, tout excès de γ-CD non complexée au triterpène devrait se retrouver dans l'eau de filtration. Or une analyse RMN de ce filtrat n'a pas montré la présence de CD. Nous pouvons donc en conclure que toutes les masses d'AHPTs et de γ-CD se trouvent dans la poudre de complexe.

Les rendements de fabrication légèrement supérieurs à 100% peuvent s'expliquer par une infime quantité d'eau restée piégée dans la masse compacte de poudre du fait du simple séchage à l'air libre, mais aussi par l'incertitude sur les pesées.

2.3 Caractérisation des complexes acides hydroxy pentacycliques triterpénoiques – gamma-cyclodextrine

Les complexes AHPTs : γ-CD ont été caractérisés par calorimétrie différentielle à balayage et résonance magnétique nucléaire.

2.3.1 Analyse calorimétrique différentielle (ACD)

L'analyse thermique est un puissant outil d'analyse permettant la caractérisation de complexes principes actifs : cyclodextrines. Les thermogrammes des AHPTs, de la γ-CD, des mélanges secs AHPTs plus γ-CD et des complexes AHPTs : γ-CD sont illustrés Figure 30.

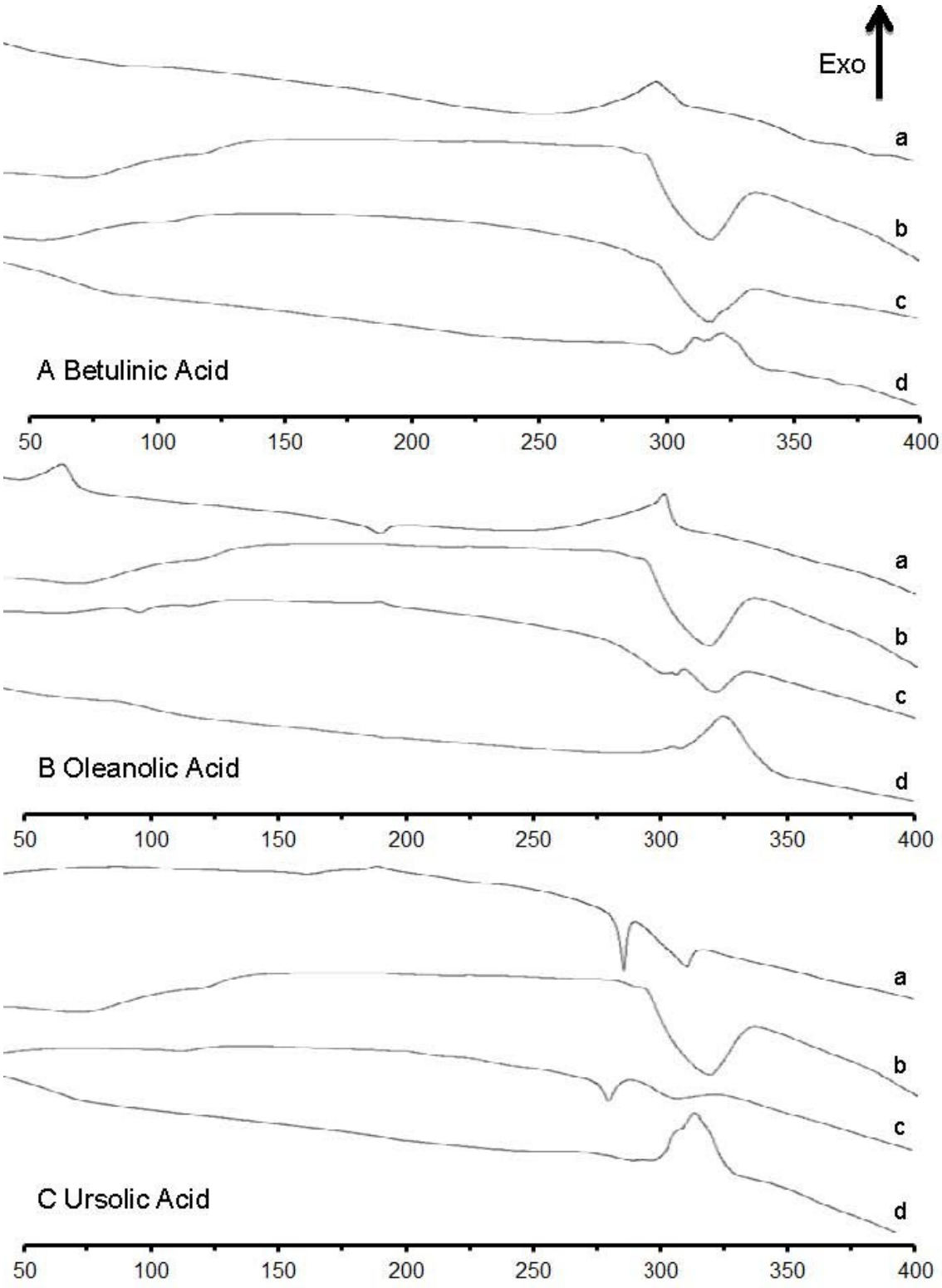


Figure 30 : Courbes de ACD des acides bétulinique (A), oléanolique (B) et ursolique (C): (a) acide seul, (b) γ-CD, (c) mélange physique (1:1) and (d) complexe

Les thermogrammes obtenus permettent la mise en évidence d'importantes différences de comportement calorimétrique entre les substances pures, les mélanges physiques et les complexes étudiés.

Les profils thermiques des AHPTs ont montré des pics de fusion à 298,3°C pour l'AB, à 283,5°C pour l'AU et à 301,3°C pour l'AO. Cette derniére valeur est confirmée par Cerga (Cerga *et al.*, 2011).

La γ-CD seule a un pic de fusion qui se situe à 318.3°C.

Le thermogramme du mélange physique AHPT plus γ-CD est semblable à la superposition des thermogrammes de l'AHPT seul et de la γ-CD seule avec conservation du pic dû à la fusion de l'acide. Ces courbes apportent la preuve de l'absence d'interaction entre l'AHPT et la γ-CD par le simple mélange des deux composés sous forme solide.

Le thermogramme de chaque complexe AHPT : γ-CD montre le déplacement du pic de fusion de l'acide quel que soit l'AHPT, avec des pics déplacés à :

- 324,4°C pour l'AB : γ-CD,
- 325,7°C pour l'AO : γ-CD,
- 398,2°C pour l'AU : γ-CD,

Ces résultats sont en faveur d'une interaction très étroite entre l'acide et la γ-CD. (Pralhad et Rajendrakumar, 2004). Ils sont en accord avec ceux obtenus par Cerga qui a complexé l'AU et l'AO avec l'HP-γ-CD (Cerga *et al.*, 2011). Leur étude par ACD a bien montré le même pic de fusion pour l'AO. Cependant, elle n'a pas permis de mettre en évidence de pics de fusion pour l'AU seul, la γ-CD seule et les complexes obtenus car elle a été réalisée entre 25 et seulement 300°C.

Ainsi donc, la ACD n'a pas permis de mettre en évidence une différence de comportement thermique entre les entités seules et leur mélange physique. En revanche, le thermogramme des complexes fait apparaitre un comportement thermique complétement différent. Ceci indique qu'une entité nouvelle existe d'un point de vue thermique. Il devient donc légitime de conclure à l'existence d'un complexe AHPT : γ-CD quel que soit le triterpène (AU, AO ou AB) et donc de tester ces entités par RMN du proton afin de déterminer si ce complexe est d'association ou d'inclusion.

2.3.2 Résonance magnétique nucléaire *(RMN)*

La RMN du proton est une technique très souvent utilisée afin de déterminer les interactions physico-chimiques lors de la formation d'un complexe (Bratu *et al.*, 2005 ; Demarco et Thakkar, 1970 ; Schneider *et al.*, 1998). Dans le cas de complexes avec des

cyclodextrines, cette technique est déterminante pour différencier les complexes d'association des complexes d'inclusion.
Dans notre étude RMN, les spectres des AHPTs seuls en D_2O n'ont pas pu être obtenus du fait de la trop faible hydrosolubilité des triterpènes.

En revanche, les spectres de la γ-CD seule et des complexes ont été obtenus et sont présentés respectivement Figure 31 et Figure 32.

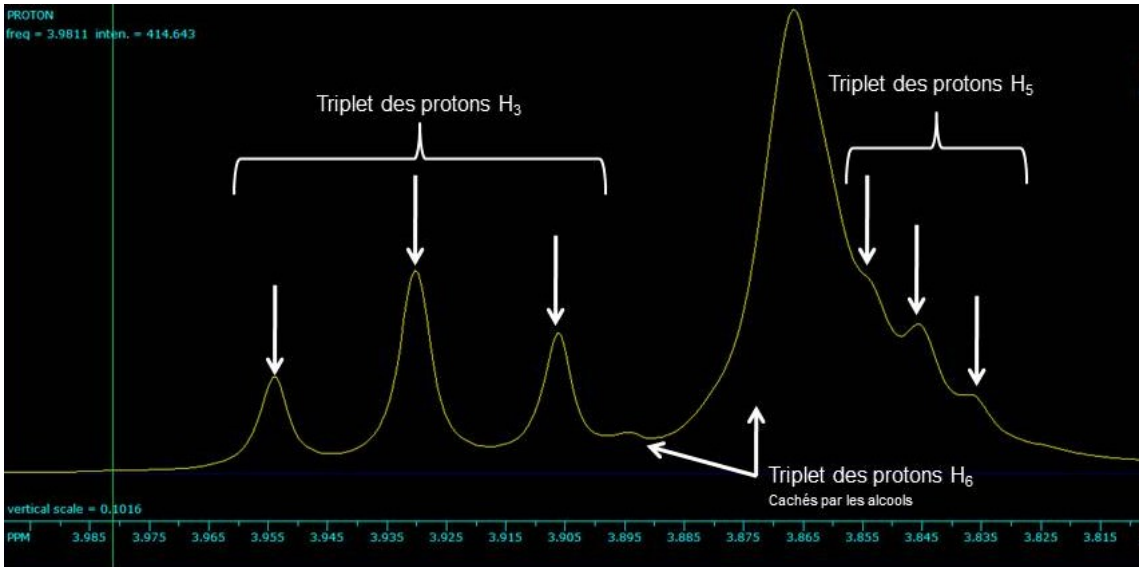


Figure 31 : Spectre ^{1}H-RMN de la γ-CD en D_2O à 400MHz entre 4 et 3,80 ppm (D_2O calibré à 4,79ppm).

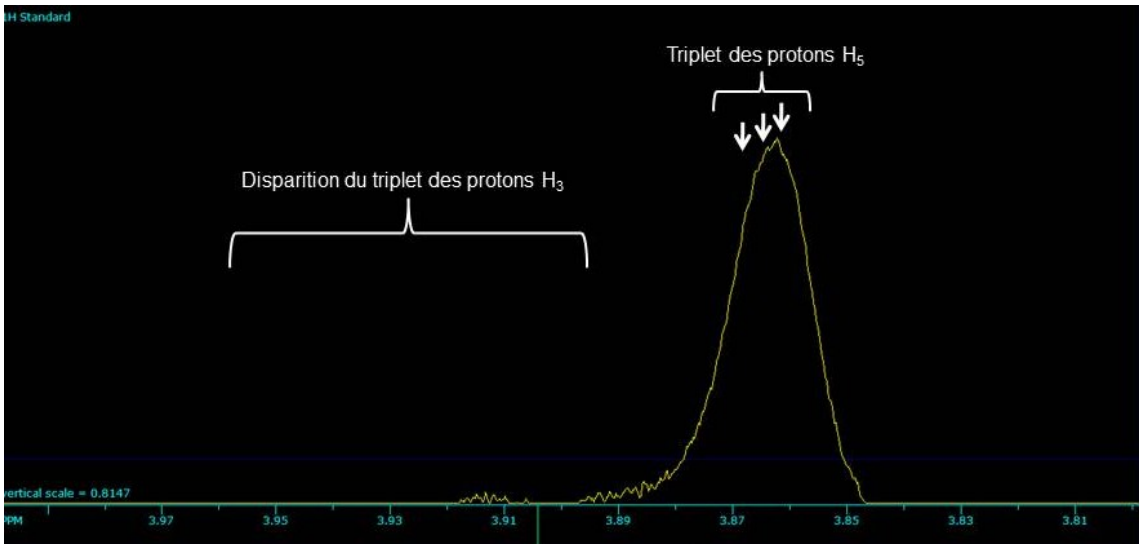


Figure 32 : Spectre ^{1}H-RMN du complexe AU : γ-CD en D_2O à 400MHz entre 4 et 3,80 ppm (D_2O calibré à 4,79ppm).

Sur le spectre RMN de la γ-CD seule, les triplets des protons H_3 et H_5 sont très nettement visibles alors que ces mêmes triplets ont quasiment disparu sur le spectre du complexe AU : γ-CD. Des spectres identiques ont été obtenus avec l'AO et l'AB.

Les déplacements des protons de la γ-CD seule sont rassemblés dans le tableau suivant :

Tableau XLIII : Déplacements des ^{1}H de la γ-CD en D_2O.

^{1}H assignation	γ-CD seule
H_1	5,065
H_3	3,890
H_6	3,827
H_5	3,801
H_2	3,621
H_4	3,545

Les protons H_3 et H_5 sont ceux tournés vers l'intérieur de la cavité de la CD comme le montre la figure 14

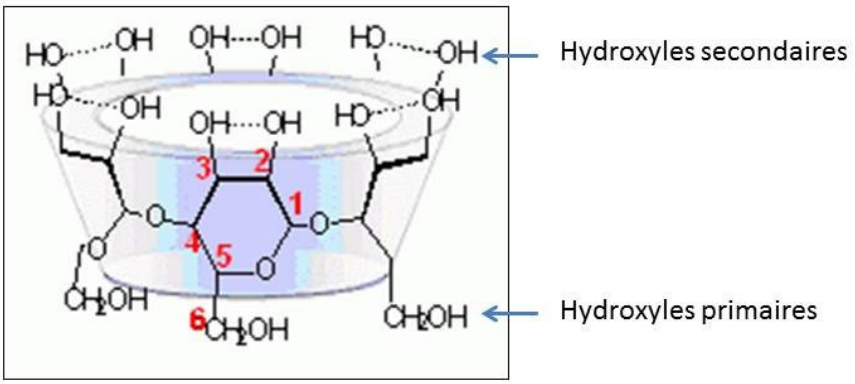


Figure 14 : Règle de numérotation des carbones sur une cyclodextrine (ici α-CD)

Une variation de la valeur de ces déplacements chimiques indique une interaction de l'hôte avec les molécules invitées ajoutées au solvant.

Les phénomènes d'inclusion mettant en jeu les protons H_3 et H_5 des CDs ont été observés dès 1970 par Demarco et Thakkar (Demarco et Thakkar, 1970). Depuis cette date, ce type de preuve a toujours été recherchée dans ce genre de complexation.

Le Tableau XLIV rassemble les variations de déplacements chimiques des protons de la γ-CD après complexation avec les invités : AU, AO et AB.

Tableau XLIV : Variations des déplacements chimiques des protons de la γ-CD complexée avec les AHPTs dans D_2O.

	Δδ (ppm)		
1H assignation	**AU : γ-CD**	**AO ; γ-CD**	**AB : γ-CD**
H_1	0,006	0,006	0,006
H_3	*	*	*
H_6	0,006	-0,008	0,000
H_5	-0,024	-0,027	-0,023
H_2	0,002	0,002	-0,003
H_4	-0,006	-0,004	-0,012

*indéterminé car masqués

La complexation des AHPTs avec la γ-CD, entraîne la disparition des protons H_3 et un important déplacement des protons H_5. Ces protons étant situés à l'intérieur de la cavité de la γ-CD, les résultats sont en cohérence avec un phénomène de pénétration des AHPTs à l'intérieur de la cavité hydrophobe de la γ-CD et prouvent la formation de complexes d'inclusion.

3 Activités biologiques des complexes et de la gamma-cyclodextrine

Les études réalisées en physico chimie nous ont permis de choisir la γ-CD comme vecteur et de montrer la faisabilité des complexes d'inclusion avec nos AHPTs.

Cette étape de complexation des AHPTs avec la γ-CD, proposée dans de nombreux brevets, n'avait jusqu'alors pas été démontrée ou publiée, chose qu'a permis de faire ce travail de recherche. Il nous reste maintenant à étudier l'impact de cette complexation sur les activités biologiques des AHPTs.

3.1 Activité anti-bactérienne

De la même façon que pour les AHPTs seuls, différentes conditions de préparation des solutions de complexe ont été testées.

Les valeurs de CMI sont énumérées dans le Tableau XLV. Pour une meilleure lecture, les CMI obtenues avec les AHPTs seuls ont été ajoutées au tableau.

Tableau XLV : CMI (µg/mL AHPTs ou *équivalent* AHPTs) obtenues sur des souches ATCC.

		AU	AO	AB	γ-CD	AU :γ-CD	AO :γ-CD	AB :γ-CD
Escherichia coli	ATCC 25922	>256	>256	>256	>128	>128*	>128	**128**
Staphylococcus aureus	ATCC 25923	**8**	**64**	>256	>128	>128*	>128	>128*
Staphylococcus aureus	ATCC 29213	**8**	**32**	>256	>128	>128*	>128	**128**
Enterococcus faecalis	ATCC 29212	**2-4**	**8**	>256	>128	**32**	>128	>128
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 27853	256	>256	256	>128	>128*	>128	>128

n=3 - >128* : Concentration pour laquelle nous avons observé une diminution de la croissance d'au moins 50%

La γ-CD, dans nos conditions expérimentales ne montre aucune activité antibactérienne. Toutefois nous avons observé que la γ-CD à de plus forte concentration (512 µg/mL) pouvait inhiber la croissance bactérienne.

Le complexe AU : γ-CD présente une activité intéressante sur *E.faecalis* (32 µg/mL). Une inhibition de la croissance bactérienne est aussi observée à 128 µg/mL sur les

quatre autres bactéries pour ce complexe AU : γ-CD, mais cette inhibition est insuffisante pour correspondre à une CMI.

De façon inattendue, il apparait que les complexes AU : γ-CD et AO : γ-CD ne conservent pas les activités antibactériennes de l'AU et de l'AO. Compte tenu des conditions de nos expérimentations (gammes de 128 à 0,5 µg/mL), l'activité antibactérienne de l'AO complexé est très nettement diminuée (CMI ≥ 128 µg/mL).

Inattendus également les résultats obtenus avec l'AB. Seul il ne présentait aucune activité antibactérienne alors que complexé avec la γ-CD il montre des valeurs de CMI de 128 µg/mL contre *E.coli* et *S.aureus* ATCC 29213. Ce complexe AB : γ-CD inhibe aussi de manière significative le développement de *S.aureus* ATCC 25923. Ce comportement peut nous surprendre car les bactéries à Gram positif et à Gram négatif ne sont pas toutes impactées de la même façon, contrairement à ce qui a été observé avec les molécules d'AHPTs seuls.

La détermination des valeurs des CMI a été réalisé avec et sans l'étape de filtration stérilisante sur filtre 0,22 µm. Les résultats que nous avons pu obtenir en présence et en absence de cette étape ont été identiques.

Nous avons aussi souhaité vérifier si un mélange des deux solutions d'AHPTs et de γ-CD présentait des résultats de CMI :

- identiques à ceux des molécules seules où,
- identiques à ceux des solutions de complexes AHPTs : γ-CD.

Dans le premier cas nous pouvions espérer que le complexe ne se formerait pas dans nos milieux de culture. Dans le deuxième cas, le complexe se formerait dans notre milieu de culture, ce qui serait en faveur de l'existence de molécules complexées et en défaveur d'une libération de notre AHPT.
Ainsi, nous avons testé un « mélange extemporané » de deux solutions :

- solution aqueuse de γ-CD,
- différentes solutions d'AHPTs avec 10% de DMSO.

Pour cela nous avons effectué un premier dépôt des différentes concentrations de γ-CD et un deuxième dépôt contenant un des différents AHPTs. Ces dépôts ont été réalisés de

façon à se retrouver, au final, avec une gamme de concentration en γ-CD et en AHPTs identique à celle que nous aurions obtenue si l'on avait réalisé une simple dilution d'un complexe.

Ici encore, les résultats que nous avons obtenus avec ce « mélange extemporané » de nos molécules sont identiques à ceux obtenus avec des complexes.

Ces résultats nous confortent dans l'hypothèse que les complexes se forment de façon quasi immédiate en milieu liquide et ce malgré une faible quantité de DMSO, solvant pourtant réputé dissociant des complexes cyclodextrinique (A. Marsura, communication personnelle).
Pour les isolats cliniques, étant donné l'absence d'activité des principes actifs seuls, les valeurs de CMI des complexes AHPTs :γ-CD n'ont pas été déterminées.

En résumé, nous avons démontré que l'AU complexé à la γ-CD conserve une activité antibactérienne sur *E.faecalis* et que l'AB complexé présente une activité sur *S.aureus* et *E.coli*. Lors de ces manipulations, nous avons aussi démontré que la γ-CD n'a aucun impact sur la croissance bactérienne.

3.2 Cytotoxicité

Les résultats de viabilité sont présentés dans le Tableau XLVI. Là encore les résultats des AHPTs seuls ont été rappelés. Les CC_{50} n'ayant pas été informative lors de l'étude de la cytotoxicité des AHPTs seuls, nous n'avons pas déterminé les valeurs de CC_{50} pour les complexes d'AHPTs.

Tableau XLVI : Valeurs des CI_{50} (µg/mL d'AHPTs ou *équivalent* AHPTs) obtenues par test MTT sur MRC5.

	AU	**AO**	**AB**	**γ-CD**	**AU :γ-CD**	**AO :γ-CD**	**AB :γ-CD**
	CI_{50}	CI_{50}	CI_{50}	CI_{50}	CI_{50}	CI_{50}	CI_{50}
24 h	15,1	25,2	1	>256	>256	98,9	9,75
48 h	11,2	24,7	<1	>256	>256	73,5	3,48
168 h	11,3	19,9	<1	>256	>256	65,8	2,55

n=3

Après 24 h de traitement, les valeurs de CI_{50} de tous les complexes AHPTs :γ-CD sont toutes supérieures à celles obtenues avec les AHPTs seuls.

Cette augmentation est très marquée pour l'AU et l'AO pour lesquels les valeurs de CI_{50} augmentent de 15,1 µg/mL à >256 µg/mL pour l'AU et de 25,2 µg/mL à 98,9 µg/mL pour l'AO.

Les valeurs de CI_{50} obtenues pour l'AB restent faibles quant à elles puisque la CI_{50} à 24 h augmente de 1 µg/mL à seulement 9,75 µg/mL.

A 48 h et 168 h les valeurs de CI_{50} des complexes AU : γ-CD et AO : γ-CD ne varient que très peu. Toutefois, la variation est beaucoup plus marquée dans le cas de l'AB atteignant une valeur de 2,55 µg/mL à 168 h contre 9,75 µg/mL à 24 h.

Ces résultats montrent que, globalement, la complexation diminue la cytotoxicité des AHPTs sur les MRC5, quelque soit le temps de contact entre les cellules et les AHPTs.

Les valeurs de CMI et de CI_{50} après 24 h d'exposition, permettent de calculer les index de sélectivité sur MRC5 pour les complexes (IS = CI_{50}/CMI) (Tableau XLVII).

Tableau XLVII : IS des AHPTs et de leurs complexes (antibactériens) sur MRC5.

		AU	**AO**	**AB**	**γ-CD**	**AU :γ-CD**	**AO :γ-CD**	**AB :γ-CD**
E. coli	ATCC 25922	0,06	<0,09	<0,004	NA	2*	<0,77	<0,076
S. aureus	ATCC 25923	1,9	0,4	<0,004	NA	2*	<0,77	<0,076
S. aureus	ATCC 29213	1,9	0,8	<0,004	NA	2*	<0,77	<0,076
E. faecalis	ATCC 29212	3,8	3,2	<0,004	NA	8	<0,77	<0,076
P. aeruginosa	ATCC 27853	0,06	0,09	0,004	NA	2	<0,77	<0,076

n=3 - NA : Non Applicable - * valeurs calculées avec des CI_{50} > à 256 µg/mL donc minimisées par rapport à leurs valeurs réelles.

Les valeurs d'IS sont très faibles (*i.e.* 0,076) pour le complexe d'AB, en raison de sa forte toxicité et de sa mauvaise activité antibactérienne, et ce quelle que soit la souche bactérienne considérée. Les complexes d'AU et d'AO présentent des IS assez proches (≈ 1-2), car l'AU a une bonne activité antibactérienne mais l'AO a une plus faible toxicité.

Dans tous les cas (exception faite du complexe de l'AO sur *E. faecalis*) les valeurs d'IS des triterpènes complexés avec la γ-CD sont augmentés de façon significative. Cette augmentation est très importante pour le complexe de l'AB avec une multiplication par un facteur 20 de l'IS de la molécule seule et cela quelque soit la souche bactérienne considérée.

3.3 Activité antivirale

L'ECP du poliovirus étant potentialisé par les AHPTs, l'activité des complexes AHPTs : γ-CD sur ce virus n'a pas été évaluée. Le Tableau XLVIII regroupe donc les valeurs de différence logarithmique des titres viraux (Δ log) pour les AHPTs, la γ-CD et leurs complexes.

Tableau XLVIII : Δ $DICC_{50}$ (en log) sur le hCMV pour les AHPTs libre ou complexés à la γ-CD.

	titre solution mère de virus	**+ DMSO**	**+ AU**	**+ AO**	**+ AB**	**+ γ-CD**	**+ AU : γ-CD**	**+ AO : γ-CD**	**+ AB : γ-CD**
hCMV AD169 / MRC5	7,77 8,99	7,11	10,80	9,30	4,62	9,49	7,52	9,29	7,49
Δ % titre		***-0,66***	1,81	0,31	**-4,37**	0,50	**-1,47**	0,30	**-1,50**
Δ % DMSO			2,47	0,97	**-3,71**	1,16	**-0,81**	0,96	**-0,84**

n=3

Il reste toujours délicat de prendre en compte ou non l'impact du DMSO sur le calcul des Δ log des molécules avant et après complexation avec la γ-CD.

La γ-CD ne présente pas d'activité sur le hCMV, au contraire, et de façon paradoxale, nous observons une augmentation du titre viral avec la γ-CD.

Le complexe AU : γ-CD montre une activité antivirale significative puisque la diminution du titre virale observé est de 1,47 log. Il est aussi intéressant de noter que pour l'AU nous passons d'une situation de potentialisation du hCMV à une activité antivirale du complexe AU : γ-CD avec un Δ log qui varie de + 1,81 à -1,47.

Le résultat obtenu avec le complexe l'AB : γ-CD est lui aussi intéressant avec un Δ log de -1,50, même si l'activité antivirale de ce complexe est moins élevée que celle de l'AB seul (Δ log = -4,37).
La complexation de l'AO permet d'obtenir des Δ log identiques à ceux de l'AO seul.

Finalement, la complexation des AHPTs permet de conserver l'activité antiviral de l'AB vis-à-vis du hCMV tout en améliorant son hydrosolubilité. La complexation de l'AU à la γ-CD permet à la nouvelle entité d'acquérir une activité antiviral sur le hCMV et cela dès 1 min. de contact.

3.4 Activité anticancéreuse des complexes

3.4.1 Efficacité sur des lignées cellulaires cancéreuses

L'évaluation de l'efficacité anticancéreuse a été réalisée sur les lignées cellulaires K562, K562 doxoR. Comme pour les AHPTs seuls, aucune activité anticancéreuse n'a pu être démontrée pour les complexes AHPTs : γ-CD sur la lignée K562 doxoR.

Les AHPTs seuls n'ayant pas permis d'obtenir de valeurs d'CI_{50} sur les IgrOV1, les complexes AHPTs : γ-CD n'ont pas été testés sur cette lignée.

Les valeurs d'CI_{50} obtenues avec les K562 sont présentées dans la Figure 33.

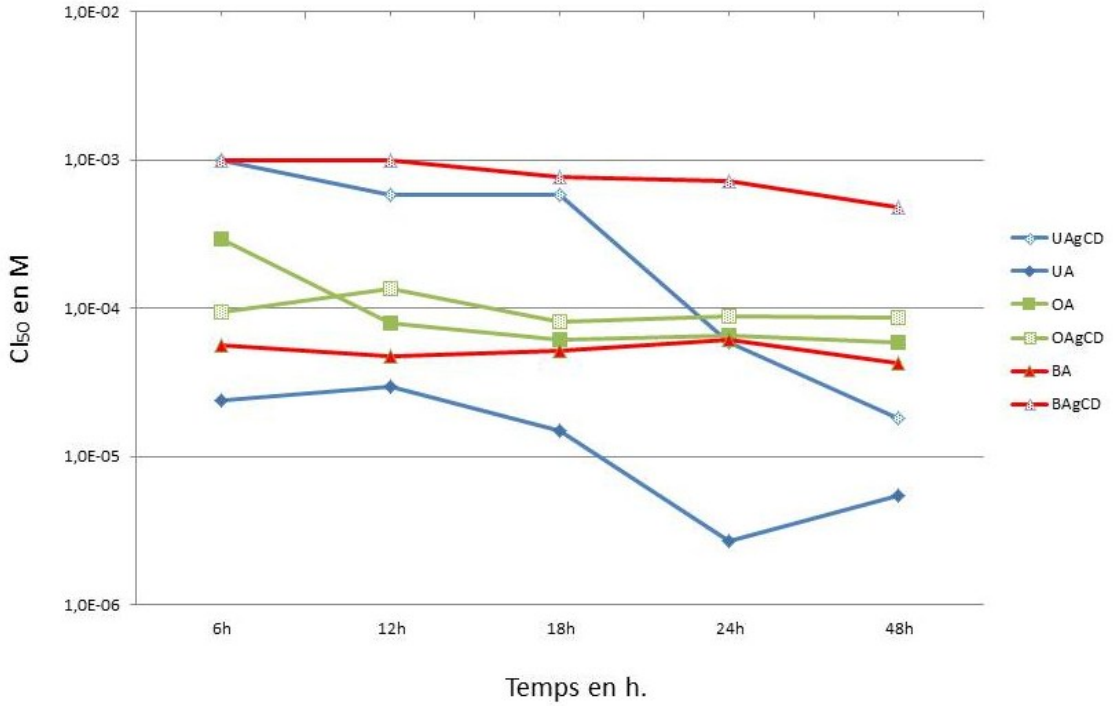


Figure 33 : Valeurs des CI_{50} obtenues avec les complexes d'AHPTs et les AHPTs seuls lors des tests MTT sur K562 à 6, 12, 18, 24 et 48 heures – n=3

La γ-CD ne présente aucune activité sur les cellules K562 (CI_{50} >10^{-3} M) dans nos conditions opératoires. C'est pour cette raison que les valeurs obtenues pour la γ-CD ne figurent pas sur le graphique.

Les valeurs de CI_{50} obtenues pour l'AO seul et son complexe sont du même ordre de grandeur et ne présentent pas de différences significatives. En effet, les valeurs de CI50 de l'AO varient de 2,94 10^{-4} M. à 6 h à 5,93 10^{-5} M. à 48 h et celle du complexe AO : γ-CD de 9,46 10^{-5} M. à 6 h à 8,73 10^{-5} M. à 48 h.

De façon générale les complexes correspondant aux autres triterpènes (AU et AB) montrent une augmentation de la CI_{50} donc une baisse d'activité par comparaison aux observations faites pour les AHPTs seuls pour un temps donné. Cependant, pour le complexe AU : γ-CD, les valeurs de CI_{50} à 48 h (1,80 10^{-5} M.) sont identiques à celle de l'AU seul à 6 (2,39 10^{-5} M.), 12 (2,93 10^{-5} M.) et 18 h (1,48 10^{-5} M.).

Le complexe d'AB semble présenter la même tendance mais avec plus de retard. En effet ce n'est qu'à partir de 48 h que les valeurs de CI_{50} du complexe AB : γ-CD se mettent à diminuer passant de 1,00 10^{-4} M. à 6 h à 4,78 10^{-4} M. à 48 h, tandis que dans

le même temps, la molécule d'AB seule présentait une forte efficacité anticancéreuse avec des CI_{50} de l'ordre de 5,0 10^{-5} M. proche de la valeur observé et cela quelque soit le temps d'incubation considéré. Ce décalage d'activité dans le temps pouvant s'avérer utile dans un cadre thérapeutique afin de maintenir une efficacité continue tout en diminuant le nombre de prise par jour de médicament, c'est un résultat qui doit être retenu.

Au final, nous pouvons conclure que la complexation des AHPTs à la γ-CD diminue l'activité anticancéreuse de l'AB, n'impacte pas celle de l'AO et décale dans le temps celle de l'AU.

3.4.2 Cytotoxicité sur les cellules MRC5

Quelle que soit la lignée cellulaire considérée, la γ-CD ne montre aucun effet cytotoxique aux concentrations et aux temps considérés.
Les valeurs de CI_{50} obtenues avec les MRC5 sont présentées dans la Figure 34.

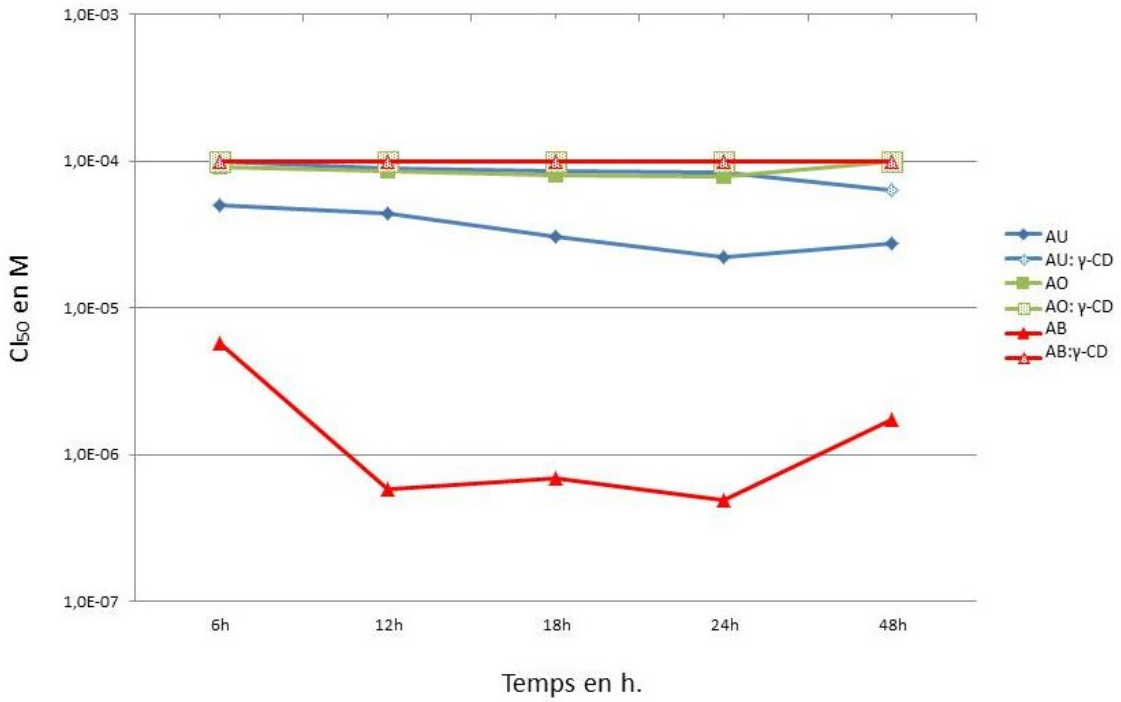


Figure 34 : Valeurs des CI_{50} obtenues avec les complexes d'AHPTs et les AHPTs seuls lors des tests MTT sur MRC5 à 6, 12, 18, 24 et 48 heures – n=3

Les valeurs de toxicité pour l'AO et son complexe sont identiques dans le temps et se superposent avec celles du complexe de l'AB à 10^{-4} M.

Le complexe d'AB présente une CI_{50} moyenne de 10^{-4} M quelque soit le temps d'incubation. Comparé à l'AB seul, qui lui possède une valeur moyenne de CI_{50} de 10^{-6} M constant au cours du temps, le complexe d'AB présente une cytotoxicité diminuée sur les MRC5.

De façon similaire, la toxicité du complexe AU : γ-CD est plus faible que celle de l'AU seul avec des valeurs de CI_{50} mesurées (10^{-4} M à 6 h 8,49 10^{-5} M à 18 h et 6,36 10^{-5} M à 48 h) qui restent proches des valeurs obtenues avec l'AU seul (5 10^{-5} M à 6 h 3,09 10^{-5} M à 18 h et 2,73 10^{-5} M à 48 h).

Comme pour les AHPTs seuls, nous avons calculés les IS pour les complexes, reprise dans le Tableau XLIX. Nous rappelons aussi les valeurs déterminées pour les AHPTs seul afin de facilité la comparaison des valeurs obtenues avec les molécules seules et les molécules complexées.

Tableau XLIX : IS (anticancéreux) des AHPTs et de leurs complexes sur K562 *vs*. MRC5.

IS	6h	12h	18h	24h	48h
Γ-CD	NA	NA	NA	NA	NA
AU : γ-CD	0,10*	0,16	0,15	**1,46**	**3,53**
AO : γ-CD	1,06*	0,74*	1,23*	1,14*	1,15*
AB : γ-CD	0,10*	0,10*	**0,13**	**0,14**	**0,21**
AU	2,09	1,51	2,09	8,35	5,06
AO	0,31	1,09	1,34	1,21	1,69
AB	0,10*	0,01	0,01	0,01	0,04

n=3 – NA : Non Applicable - * calcul effectué avec des valeurs de CI_{50} en limite de gamme $>10^{-3}$ ou $>10^{-4}$ M.

Le complexe d'AU montre un IS qui augmente avec le temps de contact, ce qui est en accord avec le déplacement d'efficacité anticancéreuse dans le temps, déplacement précédemment mis en évidence. La molécule d'AU complexée présente donc un grand intérêt dans un contexte de recherche et développement d'agent anticancéreux.

Le complexe d'AO montre un IS, neutre sans bénéfice ni désavantage.

Par contre, les valeurs obtenues avec le complexe d'AB sont toutes supérieures ou égales à 1 et augmentent jusqu'à 0,21. Pour mémoire, les valeurs d'IS obtenues avec l'AB seul ne dépassent jamais 0,01. Lorsque nous avons comparés les valeurs de CI_{50} mesurées dans le cadre de l'évaluation de l'efficacité anticancéreuse sur K562, du complexe AB : γ-CD et de l'AB seul, ce dernier semblait bien désavantagé.

Dans le cas du complexe de l'AB, les IS sont multipliés par 10. Cela montre l'importance d'incorporer la notion de cytotoxicité à ce type d'étude. La complexation de l'AB dans un contexte de recherche d'activité anticancéreuse est donc très intéressante d'un point de vue cytotoxicité pour une éventuelle utilisation ultérieure en thérapeutique.

Conclusion-Perspectives

Ce travail nous a permis de mettre en place des méthodes pour l'évaluation des activités anti-infectieuses et anticancéreuses de l'AU, l'AO et l'AB. Nous avons aussi démontré que la complexation de la γ-CD avec les AHPTs était possible et nous avons caractérisé les complexes d'un point de vue physico-chimique. Enfin nous avons mesuré les activités biologiques des complexes AHPTs : γ-CD en utilisant les protocoles définis dans la première partie de ce travail.

Nous avons vu à quel point la détermination des activités biologiques est délicate d'un point de vue normatif. En effet, même si la détermination des activités antibactériennes peut s'appuyer sur de nombreux textes de référence (normes et recommandations) émanant d'organismes officiels (AFNOR, CLSI, CA-SFM, EUCAST) ; il n'en est pas de même pour l'évaluation des autres propriétés biologiques notamment antivirale et anticancéreuse. En outre, à l'exception des études antibactériennes, aucun de ces textes ne fait référence à une application thérapeutique mais plutôt à des applications en hygiène hospitalière ou industrielle.

Ainsi, dans le domaine de la recherche de nouveaux anti-infectieux, parmi les études publiées nombreuses sont celles qui utilisent des milieux non conventionnels, ou des agents pathogènes issus de l'environnement et non identifiés, ou aucune molécule de référence (antibiotique, antifongique…).

Pour notre part, la mise en évidence d'activités biologiques sur des molécules commerciales est un premier pas en avant. Les méthodes utilisées dans ce travail, même si elles sont basées sur des référentiels normatifs, restent discutables comme :

- l'utilisation nécessaire d'un co-solvant bioactif (DMSO),
- les temps d'expérimentation (temps d'incubation, temps de contact…),

car elles gardent un aspect subjectif lié aux choix de l'expérimentateur.

Nous avons réussi à démontrer que les AHPTs ont des activités biologiques certaines, mais très différentes malgré leur structure proche.

Ainsi, l'AU et l'AO sont actifs sur *S.aureus* et *E.faecalis*. L'AB a une activité antivirale sur le hCMV. Les trois AHPTs testés ont une activité anticancéreuse sur les K562. Ces résultats sont en accord avec ceux de Ovesna *et coll.* pour l'AU et l'AO (Ovesná *et al.*, 2006). Et avec ceux de Wu *et coll.* pour l'AB (Wu *et al.*, 2010). A l'inverse, les trois AHPTs testés n'ont aucune activité antifongique ni aucune activité sur le poliovirus.

L'objectif principal qui était d'augmenter l'hydrosolubilité par la formation d'un complexe d'inclusion a été atteint. Nous avons pu mettre en évidence la formation d'un complexe d'inclusion 1 :1 AHPT : γ-CD pour l'AU, l'AO et l'AB.

L'augmentation (de 2 à 6 fois) de la solubilité des AHPTs a pu être caractérisée et mesurée. Ainsi, les solubilités dans l'eau des AHPTs avant et après complexation à la γ-CD sont les suivantes :

- 0,015 mM et 0,090 mM pour l'AU
- 0,045 mM et 0,110 mM pour l'AB
- 0,060 mM et 0,125 mM pour l'AO.

Cependant, des études complémentaires sur le mécanisme de complexation décrit dans ce travail sont nécessaires car un certain nombre de questions demeurent.
Comment se comporte la nouvelle entité moléculaire que sont les complexes d'une part *in-vitro* dans les milieux de culture et d'autre part *ex-vivo* dans un environnement biologique plus proche des réalités physiologiques comme le sérum ou le sang ?
Qu'en serait-il de nos résultats si nous reproduisions, si nous transposions notre étude en utilisant comme solvant des milieux biologiques complexes comme l'ont proposé Stella *et coll.* en 1999 (Stella *et al.*, 1999) ?
Une solution à cette problématique serait de réaliser une cinétique de libération de la molécule complexée dans ces différents environnements.

L'augmentation d'hydrosolubilité mesurée, bien que significative demanderait aussi une optimisation. La compétition existante entre la libération et/ou la complexation du principe actif par la cyclodextrine dépend également fortement de la molécule hôte choisie et de ses propriétés. Ainsi, l'utilisation de cyclodextrine modifiée (de type hydroxypropyl gamma cyclodextrine ou gamma cyclodextrine aléatoirement méthylée) devrait permettre d'optimiser le paramètre d'hydrosolubilité.

La question de la stabilité des complexes se pose également. Connors, en 1997 a montré que la stabilité d'un complexe est très fragile et qu'elle dépend fortement du solvant utilisé (Connors, 1997).

Un autre point important à prendre en compte pour comparer des résultats est la concentration en molécule active de l'échantillon étudié. Dans notre étude, la

concentration en AB libéré par le complexe AB : γ-CD atteint difficilement **0,04 µg/mL** Alors que Jager *et coll.* ont montré en 2007 (Jager *et al.*, 2007) que la concentration en acide bétulinique dans un extrait aqueux brut de *Viscum album* (gui) pouvait atteindre **0,9 µg/mL**. Selon cet auteur cela serait dû à l'existence de complexes AB/globulines (végétales) qui favoriseraient l'hydrosolubilité des composés de type terpène. Ainsi le bénéfice thérapeutique des extraits bruts ne serait plus seulement lié aux différents effets synergiques possibles entre les molécules de l'extrait, mais aussi au fait que ces dernières se trouveraient à des concentrations plus élevées dans ces extraits que dans des préparations de principe actif pur.

Il est donc possible de penser que, dans le domaine de la recherche médicale sur les vecteurs, ces globulines végétales pourraient ouvrir une voie vers de nouveaux transporteurs utilisables pour la vectorisation de molécules hydrophobes de synthèse.

En ce qui concerne la détermination des activités antibactériennes, les méthodologies sont bien définies et le laboratoire a déjà une expérience de plusieurs années dans ce domaine. Le milieu de culture MH est accepté par toute la communauté des bactériologistes pour déterminer des CMI. Il en est de même en ce qui concerne l'intérêt et le choix des molécules antibiotiques de référence. Les souches bactériennes issues de l'ATCC servant de référence font, elles aussi l'objet d'un consensus entre les différents organismes de normalisation.

En suivant ces recommandations, nous avons démontré que les AU et AO ont tous deux une activité antibactérienne intéressante mais limitée aux bactéries à Gram positif alors que l'AB est dépourvu d'intérêt dans la lutte anti bactérienne. Nous avons montré aussi que l'AU complexé à la γ-CD conserve une activité antibactérienne sur *E.faecalis* et que l'AB complexé présente une activité sur *S.aureus* et *E.coli*.

Il serait intéressant comme proposé précédemment de tester ces molécules et leurs complexes contre des protoplastes bactériens afin de confirmer ou d'infirmer l'existence d'une cible pariétale.

Des études ont proposé que ces triterpènes soient capables d'inhiber certaines activités enzymatiques en s'intercalant, entre autre, dans des poches hydrophobes de ces catalyseurs biologiques. Tester cette aptitude in-vitro sur des enzymes spécifiques du métabolisme bactérien pourrait aussi nous renseigner sur les cibles d'action de ces AHPTs.

L'implication dans des structures membranaires bactériennes (surtout pour la série hopane) devrait permettre d'envisager un possible rôle quant à la déstructuration des membranes biologiques lors de l'augmentation de la quantité en AHPTs dans la membrane bactérienne. Ce point va dans le sens des propositions déjà faites d'une cible membranaire qui ne serait plus accessible chez certaines bactéries mutantes. Ce type de question pourrait aussi trouver une réponse par l'étude de la stabilité de films de Langmuir en présence et en absence de ces AHPTs. Les interactions entre les parois bactériennes et les AHPTs pourraient également être étudiées par Microscopie à Force Atomique (AFM) en greffant les triterpènes sur une pointe d'AFM.
Enfin, la sélection de mutants résistants à ces molécules pourrait aussi nous amener à une utilisation de la biologie moléculaire et plus particulièrement l'étude des variations dans l'expression de gènes liés à la résistance (et ou à la virulence) des bactéries avant et après traitement. Cela peut constituer une approche quant aux déterminations de structures bactériennes impactées par ces antiinfectieux.

Pour ce qui est des normes de détermination d'activité antifongique (et sporicide) seules existent des normes AFNOR concernant les activités antiseptiques et désinfectantes, dans des domaines d'application relativement larges (agro-alimentaire, industrie, domestique et collectivité). Il faut ajouter deux recommandations de l'EUCAST relatives à la détermination de CMI pour des antifongiques en microdilution ; l'une pour les levures et l'autre pour forme filamenteuse sporulante. Cependant ces normes font appel au milieu de culture RPMI1640 alors que le milieu le plus souvent utilisé reste le milieu Sabouraud. Il semblerait donc intéressant de mettre en accord les normes avec la pratique du plus grand nombre en choisissant le milieu Sabouraud. Là encore, les études publiées qui proposent des résultats avec des molécules de référence ou avec des souches fongiques issues de banques de cellules (ATCC, CIP…) reconnues et non simplement isolées de l'environnement sont rares.

En suivant les recommandations concernant l'étude des activités antifongiques, nous n'avons pu démontrer une activité biologique des AHPTs. Cependant, même si nous pouvons trouver dans la littérature des exemples montrant une activité biologique de l'AU et de l'AO entre autre sur *C.albicans* (Rocha *et al.*, 2004) ceux-ci sont associés à des fractions chromatographiques d'extraits de plantes et non à des sources commerciales. Ainsi, après les conclusions que nous avons pu formuler quant à

l'interaction AHPTs/membranes, et connaissant les particularités des parois des champignons, il serait intéressant de tester nos molécules sur des protoplastes fungiques.

Pour ce qui est de l'activité antivirale, seule existe à notre connaissance la norme AFNOR NF EN 14476+A1 de 2007. Cette norme présente, comme nous l'avons vu précédemment, de nombreux points de discussion possible concernant le choix des virus, des molécules de référence, d'un co-solvant et des temps de contact entre le virus et notre molécule.

En suivant les recommandations de l'AFNOR, nous avons montré que les molécules testées, AU, AO et AB semblent accroître le titre viral des suspensions de poliovirus. De fait, nous n'avons pas évalué les complexes sur ce modèle viral.

Le hCMV, virus enveloppé, s'est révélé être sensible à l'AB avec une diminution significative (plus de 4 log) de son titre viral. L'AO et l'AU ne présentant pas d'activité sur ce virus, bien au contraire puisque une augmentation du titre viral à été observée en présence de ces composés. Les complexes d'AU et AB avec la γ-CD ont quant à eux montré une activité antivirale sur le hCMV ce qui ouvrirait des perspectives futures encourageantes pour l'utilisation de ces complexes dans un contexte thérapeutique.

Ces résultats d'activité antivirale ne sont pas sans poser de nombreuses questions et sans ouvrir de nombreuses perspectives.

Dans notre cas, nous avons pu noter que le DMSO a une activité qui peut être estimée à -0,6 log de la $DICC_{50}$. Mais que faire de cette valeur puisque nous ne pouvons pas évaluer si elle est intégralement répercutée lors du test des AHPTs et de leurs complexes. En mélangeant le DMSO et les agents (AHPTs, complexes, antifongiques…) à tester nous ne pouvons pas en l'état dire si la mesure vient d'une activité synergique, additive ou soustractive entre le DMSO et l'agent testé.

Il convient de se poser la question du test des molécules non hydrosolubles lors des essais antiviraux (et aussi antibactérien, antifongique et anticancéreux…). Doit-on envisager de travailler à partir d'une masse de produit sur laquelle on dépose un certain volume de suspension virale (en espérant ne pas piéger de particules virales dans la masse de produit) ? Doit-on continuer à utiliser des co-solvants malgré les interrogations que cela apporte ? Doit-on développer un test qui permettrait de mesurer les effets synergiques en antivirale, à la manière de la technique de l'échiquier en bactériologie et ce afin de choisir au mieux un co-solvant ?

En ce qui concerne les résultats sur le poliovirus, les effets des complexes sont surprenants. En effet nous observons un effet potentialisant des AHPTs sur ce virus, avec des titres viraux augmentés avec la suspension virale traitée par rapport à la suspension virale de référence.

La première chose à mettre en avant concernant ces valeurs, c'est de rappeler que le poliovirus est nu alors que le CMV est enveloppé. A cela, nous pouvons ajouter que les AHPTs ayant une importance dans la structuration des membranes lipidiques chez certains organismes vivants, ils paraissent capables d'induire aussi un déséquilibre des membranes du hCMV et donc de constituer une piste de chimiothérapie pour ce type d'infection.

Nous pouvons, en second, rappeler que des interactions ADN/AHPTs voir ADN/AHPTs/ protéines de réplications ont été avancées pour expliquer les activités biologiques de nos triterpènes pentacycliques (Kim *et al.*, 2000). Le hCMV étant un virus à ADN et le poliovirus, un virus à ARN, les AHPTs peuvent ne pas répondre de la même façon en fonction de la nature différente des acides nucléiques des virus testés.

Il conviendrait donc de tester un virus enveloppé à ARN comme le coronavirus et un virus nu à ADN comme un adénovirus par exemple. Cela permettrait de confirmer ou d'infirmer l'existence d'une cible membranaire ou d'une cible nucléique des AHPTs.

Pour expliquer le fait que le complexe AU : γ-CD ait une activité alors que l'AU seul n'en a pas, nous pouvons proposer que ces entités ont des activités propres et différentes, ce qui implique des cibles d'action et/ou des mécanismes d'action différents pour chacune d'entre elles.

Nous pouvons aussi proposer comme hypothèse que l'AB et son complexe agissent parce que ce complexe se dissocie, non pas du fait de sa faible stabilité (sa Kf est la plus forte des trois) mais parce que l'AB a une meilleure affinité pour sa cible que pour la γ-CD. Cela suppose alors d'avoir de préférence une cible en surface du virus en lien avec la capside ou aux protéines de surface et moins probablement à des éléments internes (son génome à ADN comme précédemment proposé).

Ce modèle peut aussi être en accord avec une substitution de l'AHPT par une autre molécule dans la γ-CD, ce qui libérerait et « activerait » l'AHPT. La libération ne serait alors pas opérée de façon innée simplement du fait d'une faible Kf mais par un réel mécanisme d'échange. De tels modèles ont été proposés dans la littérature pour favoriser le relargage des molécules d'intérêt en chassant l'invité de la cavité

hydrophobe de la cyclodextrine à l'aide de petits peptides (2 ou 3 acides aminées) ou des molécules de type chitosan ayant une plus grande affinité que les molécules invitées pour la CD.

Enfin, si les complexes d'AHPTs passent la membrane, il est possible qu'ils se retrouvent dans le cytoplasme des cellules infectées ou à l'intérieur des virus enveloppés. Cela leur donne un accès privilégié à la machinerie de réplication virale qui n'est pas encore intranucléaire mais cytoplasmique. L'activité serait donc déplacée de « cytoplasmique » à « nucléaire » et en lien avec la capacité de l'AU d'interagir avec l'ADN viral comme précédemment décrit. Cela permet une interaction facilitée avec l'ADN viral et préférentiellement avec les cellules infectées et non avec les autres si l'AU complexé profite des virus enveloppés comme d'un « vecteur ».

La potentialisation du poliovirus comme celle observée dans ce travail laisse un grand nombre de questions en suspens. Cela implique que les AHPTs soient capables de potentialiser une étape (certainement précoce) du cycle viral du poliovirus (adsorption à la surface des cellules, passage de la membrane cytoplasmique, libération de l'acide nucléique, multiplication virale…).

L'activité antivirale des AHPTs demande encore beaucoup d'efforts avant d'être élucidée !

Concernant les mesures d'efficacité anti cancéreuse, aucun document normatif n'a pu être trouvé dans la littérature. *In vitro*, les études des effets anticancéreux de molécules sont de types et de formes très différentes. A la différence des études en infectiologie où de nombreuses normes et recommandations existent, le chercheur en cancérologie doit faire (et justifier…) ses choix méthodologiques.

Nous avons pour notre part choisi de nous limiter à des tests de viabilité cellulaire (MTT) afin de montrer une différence entre la survie de cellules cancéreuses et celle de cellules saines (MRC5). Certes cela ne révélera rien sur les mécanismes mis en œuvre lors de la mort des cellules suite à leur exposition aux AHPTs ou à leurs complexes, mais cela a l'avantage de prendre en compte un aspect global de la cellule sans s'attacher à des différences qui pourraient ne pas être liées à une activité anticancéreuse *stricto sensu*. En effet, certains paramètres biologiques (dosage d'activité enzymatique, relargage de messager secondaire ou encore mesure de dépolarisation…) peuvent être mis en évidence sans pour autant entrainer une variation visible de la viabilité cellulaire.

Cette approche pourrait paraitre désuète mais cependant elle garde l'avantage de ne pas mesurer un paramètre biologique déconnecté d'un système cellulaire global (libération du cytochrome c/ dosage enzymologique des caspases / libération de l'AIF / mesure du potentiel zeta / pcr quantitative / mesure de la perméabilité membranaire…) et reste indépendante au maximum d'éventuels mécanismes de protection ou de compensation biologique (PPAR…) qui influent souvent seulement sur un de ces paramètres.

Comme déjà annoncé dès l'introduction, de nombreux auteurs ont mis en avant les propriétés anticancéreuses de l'AU et de l'AB. Pour une grande majorité d'entre eux, ils ont souligné la difficulté d'utilisation de ces molécules dans un contexte thérapeutique du fait de leur manque d'hydrosolubilité. Il semblerait que la complexation avec des cyclodextrines puisse ouvrir une voie vers l'utilisation en thérapeutique de ces principes actifs.
Nous avons pu confirmer sur les cellules K562, l'intérêt que présente l'utilisation des AHPTs comme anti leucémique, surtout l'acide bétulinique. Les activités mesurées avec les complexes nous ont semblé très décevantes, mais cela était sans compter sur l'importance de mettre en relation les valeurs de ces activités avec les valeurs de cytotoxicité. Nous avons ainsi pu montrer l'intérêt de l'AU et de l'AB complexé avec des valeurs d'IS plus favorables pour le complexe d'AB que pour l'AB seul.

D'un point de vue plus général, de nombreuses pistes restent à explorer : Quelles sont les cibles des AHPTs ? Quels sont leur mode d'action ? Les modes d'action sont-ils uniques ou pluriels ? Quels sont les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des AHPTs ? Comment sont-ils métabolisés ?

Les interactions ADN/triterpènes peuvent être étudiées. Une expérience de complexation entre un ADN (de séquence aléatoire « random ») peut nous renseigner quant à d'éventuelles interactions avec des acides nucléiques par une simple expérience de retard sur gel. Des expériences similaires peuvent être envisagées avec des constituants pariétaux isolés de bactéries (N acétyl glucosamine, acide N acétyl muramique, lipopolysaccharide…)

Il faudrait se poser des questions identiques à propos des complexes AHPTs : γ-CD.

Enfin, comme toute étude de pharmacologie préclinique, le passage de tests *in vivo* de nos molécules candidates, reste une étape importante. De trop rares études sur la pharmacocinétique et la pharmacodynamique des AHPTs (AO (Ji *et al.*, 2009) & AU (Liao *et al.*, 2005)) voient le jour. Ces questions devront elles aussi être élucidées avant un passage potentiel de ces molécules en thérapeutique humaine.

Les études biologiques que nous avons menées, ont permis de montrer que les complexes avaient rarement les mêmes activités biologiques que les seules molécules invitées. En effet, soit les activités étaient préservées mais avec une cinétique différente, soit les activités observées étaient complétement différentes de celles attendues.

Ainsi l'idée simple ou simpliste, souvent avancée qu'une complexation avec des cyclodextrines suffit à obtenir une vectorisation bénéfique pour les malades ne va pas de soi et demande, outre des études de faisabilité physico-chimiques, des tests biologiques appropriés avant de pouvoir envisager une application thérapeutique de tels objets supramoléculaires que sont les complexes cyclodextriniques.

Références bibliographiques

Abdou S., Collomb J., Sallas F., Marsura A., Finance C. (1997), Beta-cyclodextrin derivatives as carriers to enhance the antiviral activity of an antisense oligonucleotide directed toward a coronavirus intergenic consensus sequence. *Archives of Virology,* **142**, 8, pp. 1585-602.

Abe I. (2007), Enzymatic synthesis of cyclic triterpenes. *Nat Prod Rep,* **24**, 6, pp. 1311-31.

Abe I. (2008), Engineering of squalene cyclizing enzymes. *Yakugaku Zasshi,* **128**, 8, pp. 1109-18.

Abe I., Rohmer M., Prestwich G. D. (1993), Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. *Chemical Reviews,* **93**, 6, pp. 2189-206.

Abe I., Tanaka H., Noguchi H. (2002), Enzymatic formation of an unnatural hexacyclic C35 polyprenoid by bacterial squalene cyclase. *Journal of the American Chemical Society,* **124**, 49, pp. 14514-5.

Abe T., Hoshino T. (2005), Enzymatic cyclizations of squalene analogs with threo- and erythro-diols at the 6,7- or 10,11-positions by recombinant squalene cyclase. Trapping of carbocation intermediates and mechanistic insights into the product and substrate specificities. *Organic & Biomolecular Chemistry,* **3**, 17, pp. 3127-39.

AFNOR (2007), « Essais virucide quantitatif de suspension pour les antiseptiques et désinfectants chimiques utilisés en médecine humaine ». Vol. NF EN 14476+A1.

AFSSA (23 novembre 2001), Avis relatif à une demande d'évaluation de gamma-cyclodextrine dans le cadre du règlement (CE) n° 258/97. 2001-SA-0119 AAAT - Additives f. a. p. a. http://www.anses.fr/index.htm

Agatonovic-Kustrin S., Williams D., Ibrahim N., Glass B. D. (2007), Influence of sulfobutylether-beta-cyclodextrin on the stability of S- and R- omeprazole. *Current drug discovery technologies,* **4**, 3, pp. 192-7.

Agut H., Huraux J.-M., J-C. N., H. P.-L. (2003), Traité de virologie médicale. De Boeck Diffusion, Paris, 699 p.

Alakurtti S., Makela T., Koskimies S., Yli-Kauhaluoma J. (2006), Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *Eur J Pharm Sci,* **29**, 1, pp. 1-13.

Ali H., Houghton P. J., Soumyanath A. (2006), alpha-Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology,* **107**, 3, pp. 449-55.

Allabashi R., Arkas M., Hormann G., Tsiourvas D. (2007), Removal of some organic pollutants in water employing ceramic membranes impregnated with cross-linked silylated dendritic and cyclodextrin polymers. *Water research,* **41**, 2, pp. 476-86.

Allard S., Ourisson G. (1957), Remarques sur la nomenclature des triterpènes. *Tetrahedron,* **1**, 4, pp. 277-83.

Allouche Y., Warleta F., Campos M., Sanchez-Quesada C., Uceda M., Beltran G., Gaforio J. J. (2010), Antioxidant, Antiproliferative, and Pro-apoptotic Capacities of Pentacyclic Triterpenes Found in the Skin of Olives on MCF-7 Human Breast Cancer Cells and Their Effects on DNA Damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 121-30.

Alonso L., Cuesta P., Fontecha J., Juarez M., Gilliland S. E. (2009), Use of beta-cyclodextrin to decrease the level of cholesterol in milk fat. *Journal of Dairy Science,* **92**, 3, pp. 863-9.

Altinier G., Sosa S., Aquino R. P., Mencherini T., Della Loggia R., Tubaro A. (2007), Characterization of topical antiinflammatory compounds in Rosmarinus officinalis L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **55**, 5, pp. 1718-23.

Andre N., Rome A., Carre M. (2006), Antimitochondrial agents: a new class of anticancer agents. *Archives de Pédiatrie,* **13**, 1, pp. 69-75.

Ao C., Li A., Elzaawely A. A., Xuan T. D., Tawata S. (2008), Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of Ficus microcarpa L. fil. extract. *Food Control,* **19**, 10, pp. 940-8.

Asbahr A. C., Franco L., Barison A., Silva C. W., Ferraz H. G., Rodrigues L. N. (2009), Binary and ternary inclusion complexes of finasteride in HPbetaCD and polymers: preparation and characterization. *Bioorganic & medicinal chemistry,* **17**, 7, pp. 2718-23.

Bai K. K., Yu Z., Chen F. L., Li F., Li W. Y., Guo Y. H. (2012), Synthesis and evaluation of ursolic acid derivatives as potent cytotoxic agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters,* **22**, 7, pp. 2488-93.

Bailly J. L., Chambon M., Peigue-Lafeuille H., Laveran H., De Champs C., Beytout D. (1991), Activity of glutaraldehyde at low concentrations (less than 2%) against poliovirus and its relevance to gastrointestinal endoscope disinfection procedures. *Applied & Environmental Microbiology,* **57**, 4, pp. 1156-60.

Bakkour Y. (2005), Etude par RMN des complexes d'inclusion avec des cyclodextrines natives et polymérisées, lille 1, Lille,

Baricevic D., Sosa S., Della Loggia R., Tubaro A., Simonovska B., Krasna A., Zupancic A. (2001), Topical anti-inflammatory activity of Salvia officinalis L. leaves: the relevance of ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology,* **75**, 2-3, pp. 125-32.

Barzegar A., Moosavi-Movahedi A. A., Rezaei-Zarchi S., Saboury A. A., Ganjali M. R., Norouzi P., Hakimelahi G. H., Tsai F. Y. (2008), The mechanisms underlying the effect of alpha-cyclodextrin on the aggregation and stability of alcohol dehydrogenase. *Biotechnology & Applied Biochemistry* **49**, Pt 3, pp. 203-11.

Bégin D., Lavoué J., Gérin M. (2002), La substitution des solvants par le diméthylsulfoxide. *Bilan de connaissances - rapport de l'université de Montréal*, pp. 1-80.

Benard J., Da Silva J., De Blois M. C., Boyer P., Duvillard P., Chiric E., Riou G. (1985), Characterization of a human ovarian adenocarcinoma line, IGROV1, in tissue culture and in nude mice. *Cancer research,* **45**, 10, pp. 4970-9.

Bielejewska A., Duszczyk K., Kwaterczak A., Sybilska D. (2002), Comparative study on the enantiomer separation of 1,1′-binaphthyl-2,2′diyl hydrogenphosphate and 1,1′-bi-2-naphthol by liquid chromatography and capillary electrophoresis using single and combined chiral selector systems. *Journal of Chromatography A,* **977**, 2, pp. 225-237.

Bishayee A., Ahmed S., Brankov N., Perloff M. (2011), Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer. *Frontiers in Bioscience : a Journal & Virtual Library,* **16**, pp. 980-96.

Bisson-Boutelliez C., Fontanay S., Finance C., Kedzierewicz F. (2010), Preparation and Physicochemical Characterization of Amoxicillin beta-cyclodextrin Complexes. *American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech,* **11**, 2, pp. 574-81.

Blanchemain N., Laurent T., Chai F., Neut C., Haulon S., Krump-konvalinkova V., Morcellet M., Martel B., Kirkpatrick C. J., Hildebrand H. F. (2008), Polyester vascular prostheses coated with a cyclodextrin polymer and activated with antibiotics: cytotoxicity and microbiological evaluation. *Acta Biomaterialia,* **4**, 6, pp. 1725-33.

Bloch K. (page consultée le 27 septembre 2012), The biological synthesis of cholesterol. *http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1964/bloch-lecture.pdf*.

Bloch K. (1992), Sterol molecule: structure, biosynthesis, and function. *Steroids,* **57**, 8, pp. 378-83.

Bochar D. A., Freisen J., Stauffacher C. V., Rodwell V. W. (1999), Biosynthesis of Mevalonic Acid from Acetyl-CoA. *In*: Comprehensive Natural Products Chemistry. *Otto M.-C., Sir Derek B. ,Koji N. eds*., Pergamon, Oxford, pp. 15-44.

Boiteau P., Pasich B., Ratsimamanga A. R. (1964), Triterpénoïdes en physiologie végétale et animale. . Gauthiers-Villarsp.

Bonechi C., Martini S., Ciani L., Lamponi S., Rebmann H., Rossi C., Ristori S. (2012), Using liposomes as carriers for polyphenolic compounds: the case of trans-resveratrol. *PLoS One,* **7**, 8, pp. e41438.

Bonnal C., Calvo F. (1996), Résistance aux traitements anticancé;reux : mécanismes, intérêt clinique : Résistance aux xénobiotiques. Masson, Paris, FRANCEp.

Borenfreund E., Puerner J. A. (1985), A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *Methods in Cell Science,* **9**, 1, pp. 7-9.

Bosgiraud C. (2003), Microbiologie Générale et Santé. Association des Enseignants de Microbiologie et d'Immunologie des Facultés de Pharmacie Françaises, 520 p.

Boudad H., Legrand P., Lebas G., Cheron M., Duchêne D., Ponchel G. (2001), Combined hydroxypropyl-β-cyclodextrin and poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles intended for oral administration of saquinavir. *International Journal of Pharmaceutics,* **218**, 1–2, pp. 113-124.

Boukamp P., Petrussevska R. T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A., Fusenig N. E. (1988), Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of cell biology,* **106**, 3, pp. 761-71.

Boulmedarat L., Bochot A., Lesieur S., Fattal E. (2005), Evaluation of buccal methyl-beta-cyclodextrin toxicity on human oral epithelial cell culture model. *Journal of Pharmaceutical Sciences,* **94**, 6, pp. 1300-9.

Bratu I., Gavira-Vallejo J. M., Hernanz A. (2005), 1H-NMR study of the inclusion processes for alpha- and gamma-cyclodextrin with fenbufen. *Biopolymers,* **77**, 6, pp. 361-7.

Brewster M., Mackie C., Noppe M., Lampo A. N. N., Loftsson T. (2007), The Use of Solubilizing Excipients and Approaches to Generate Toxicology Vehicles for Contemporary Drug Pipelines
Solvent Systems and Their Selection in Pharmaceutics and Biopharmaceutics. *In*: *Augustijns P. ,Brewster M. E. eds*., Springer New York, vol. I, pp. 221-256. (Biotechnology: Pharmaceutical Aspects).

Brewster M. E., Loftsson T. (2007), Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews,* **59**, 7, pp. 645-66.

Brewster M. E., Loftsson T. (2007), Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Deliv Rev,* **59**, 7, pp. 645-66.

Brewster M. E., Loftsson T., Estes K. S., Lin J.-L., Fridriksdóttir H., Bodor N. (1992), Effect of various cyclodextrins on solution stability and dissolution rate of doxorubicin hydrochloride. *International Journal of Pharmaceutics,* **79**, 1–3, pp. 289-299.

Brieskorn C. H., Zweyrohn G. (1970), The occurrence of three triterpene acids in the leaves of Rosmarinus officinalis. *Pharmazie,* **25**, pp. 488-90.

Brown G. A., Martini E. R., Roberts B. S., Vukovich M. D., King D. S. (2002), Acute hormonal response to sublingual androstenediol intake in young men. *Journal of applied physiology,* **92**, 1, pp. 142-6.

C.J. Soussy, R. Bonnet, F. Caron, J.D. Cavallo, H. Chardon, C. Chidiac, P. Courvalin, H. Drugeon, L. Dubreuil, V. Jarlier, F. Jehl, T. Lambert, R. Leclercq, M.H. Nicols-Chanoine, P.

Plesiat, M.C. Ploy, C. Quentin, E. Varon, P. Weber (2012),Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie: Recommandations 2012.

Cappello B., De Rosa G., Giannini L., La Rotonda M. I., Mensitieri G., Miro A., Quaglia F., Russo R. (2006), Cyclodextrin-containing poly(ethyleneoxide) tablets for the delivery of poorly soluble drugs: potential as buccal delivery system. *International Journal of Pharmaceutics,* **319**, 1-2, pp. 63-70.

Cerga O., Borcan F., Ambrus R., Popovici L. (2011), Syntheses of new cyclodextrin complexes with oleanolic and ursolic acids *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies,* **17**, 4, pp. 405-9.

Chandramu C., Manohar R. D., Krupadanam D. G., Dashavantha R. V. (2003), Isolation, characterization and biological activity of betulinic acid and ursolic acid from Vitex negundo L. *Phytotherapy Research,* **17**, 2, pp. 129-34.

Chen Q., Jeong S., Hwang G., Kim K., Kang J. (2008), Enantioselective determination of chlorpheniramine in various formulations by HPLC using carboxymethyl-β-cyclodextrin as a chiral additive. *Archives of Pharmacal Research,* **31**, 4, pp. 523-529.

Chen V. Y., Posada M. M., Zhao L., Rosania G. R. (2007), Rapid doxorubicin efflux from the nucleus of drug-resistant cancer cells following extracellular drug clearance. *Pharmaceutical Research,* **24**, 11, pp. 2156-67.

Chinna Reddy P., Karthik Siva C. C., Subrahmanyam P. V. R. S., Madhusudan R. Y. (2012), Cyclodextrins and their Derivatives in Drug Delivery: A Review. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy,* **6 (3)**, pp. 255-75.

Chow D. D., Karara A. H. (1986), Characterization, dissolution and bioavailability in rats of ibuprofen-β-cyclodextrin complex system. *International Journal of Pharmaceutics,* **28**, 2–3, pp. 95-101.

Chowdhury A. R., Mandal S., Mittra B., Sharma S., Mukhopadhyay S., Majumder H. K. (2002), Betulinic acid, a potent inhibitor of eukaryotic topoisomerase I: identification of the inhibitory step, the major functional group responsible and development of more potent derivatives. *Medical Science Monitor,* **8**, 7, pp. BR254-65.

Cipak L., Grausova L., Miadokova E., Novotny L., Rauko P. (2006), Dual activity of triterpenoids: apoptotic versus antidifferentiation effects. *Archives of Toxicology,* **80**, 7, pp. 429-35.

Clarot I., Clédat D., Guillaume Y. C., Cardot P. J. (2001), Chromatographic study of terpenes-β-cyclodextrine complexes on porous graphic carbon stationnary phase. *Chromatographia*, pp. 447-53.

Claude B., Morin P., Lafosse M., Andre P. (2004), Evaluation of apparent formation constants of pentacyclic triterpene acids complexes with derivatized beta- and gamma-cyclodextrins by reversed phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A,* **1049**, 1-2, pp. 37-42.

Connolly J. D., Hill R. A. (1989), Triterpenoids. *Natural Product Reports,* **6**, 5, pp. 475-501.

Connolly J. D., Hill R. A. (2000), Triterpenoids. *Natural Product Reports,* **17**, 5, pp. 463-82.

Connolly J. D., Hill R. A. (2001), Triterpenoids. *Natural Product Reports,* **18**, 5, pp. 560-78.

Connolly J. D., Hill R. A. (2002), Triterpenoids. *Natural Product Reports,* **19**, 4, pp. 494-513.

Connolly J. D., Hill R. A. (2003), Triterpenoids. *Natural Product Reports,* **20**, 6, pp. 640-59.

Connolly J. D., Hill R. A. (2005), Triterpenoids. *Natural Product Reports,* **22**, 4, pp. 487-503.

Connolly J. D., Hill R. A. (2007), Triterpenoids. *Natural Product Reports,* **24**, 2, pp. 465-86.

Connolly J. D., Hill R. A. (2008), Triterpenoids. *Natural Product Reports,* **25**, 4, pp. 794-830.

Connolly J. D., Hill R. A. (2010), Triterpenoids. *Natural Product Reports,* **27**, 1, pp. 79-132.

Connolly J. D., Hill R. A., Ngadjui B. T. (1994), Triterpenoids. *Natural Product Reports,* **11**, 5, pp. 467-92.

Connors K. A. (1997), The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. *Chemical Reviews,* **97**, 5, pp. 1325-1358.

Cowan M. M. (1999), Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews,* **12**, 4, pp. 564-82.

Croteau R., Loomis W. D. (1973), Biosynthesis of squalene and other triterpenes in Mentha piperita from mevalonate-2-14C. *Phytochemistry,* **12**, 8, pp. 1957-1965.

Cunha W. R., de Matos G. X., Souza M. G. M., Tozatti M. G., Andrade e Silva M. L., Martins C. H. G., Silva R. d., Da Silva Filho A. A. (2010), Evaluation of the antibacterial activity of the methylene chloride extract of Miconia ligustroides, isolated triterpene acids, and ursolic acid derivatives. *Pharmaceutical Biology,* **48**, 2, pp. 166-9.

Damour O., Hua S. Z., Lasne F., Villain M., Rousselle P., Collombel C. (1992), Cytotoxicity evaluation of antiseptics and antibiotics on cultured human fibroblasts and keratinocytes. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries,* **18**, 6, pp. 479-85.

Dandawate P., Vyas A., Ahmad A., Banerjee S., Deshpande J., Swamy K., Jamadar A., Dumhe-Klaire A., Padhye S., Sarkar F. (2012), Inclusion Complex of Novel Curcumin Analogue CDF and β-Cyclodextrin (1: 2) and Its Enhanced In Vivo Anticancer Activity Against Pancreatic Cancer. *Pharmaceutical Research,* **29**, 7, pp. 1775-1786.

De Jesus M. B., Fraceto L. F., Martini M. F., Pickholz M., Ferreira C. V., de Paula E. (2012), Non-inclusion complexes between riboflavin and cyclodextrins. *Journal of Pharmacy and Pharmacology,* **64**, 6, pp. 832-42.

De Luca V., St Pierre B. (2000), The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends in Plant Science,* **5**, 4, pp. 168-173.

De Melo N. F. S., Grillo R., Rosa A. H., Fraceto L. F. (2008), Interaction between nitroheterocyclic compounds with β-cyclodextrins: Phase solubility and HPLC studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* **47**, 4–5, pp. 865-69.

De Sa M. S., Costa J. F., Krettli A. U., Zalis M. G., Maia G. L., Sette I. M., Camara Cde A., Filho J. M., Giulietti-Harley A. M., Ribeiro Dos Santos R., Soares M. B. (2009), Antimalarial activity of betulinic acid and derivatives in vitro against Plasmodium falciparum and in vivo in P. berghei-infected mice. *Parasitology Research,* **105**, 1, pp. 275-9.

Del Valle E. M. M. (2004), Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry,* **39**, 9, pp. 1033-46.

Demarco P. V., Thakkar A. L. (1970), Cyclohepta-amylose inclusion complexes. A proton magnetic resonance study. *Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications*, 1, pp. 2-4.

Djoukeng J. D., Abou-Mansour E., Tabacchi R., Tapondjou A. L., Bouda H., Lontsi D. (2005), Antibacterial triterpenes from Syzygium guineense (Myrtaceae). *Journal of Ethnopharmacology,* **101**, 1-3, pp. 283-6.

Dominguez-Carmona D. B., Escalante-Erosa F., Garcia-Sosa K., Ruiz-Pinell G., Gutierrez-Yapu D., Chan-Bacab M. J., Gimenez-Turba A., Pena-Rodriguez L. M. (2010), Antiprotozoal activity of betulinic acid derivatives. *Phytomedicine,* **17**, 5, pp. 379-82.

Drag-Zalesinska M., Kulbacka J., Saczko J., Wysocka T., Zabel M., Surowiak P., Drag M. (2009), Esters of betulin and betulinic acid with amino acids have improved water solubility and are selectively cytotoxic toward cancer cells. *Bioorganic & medicinal chemistry letters,* **19**, 16, pp. 4814-7.

Ebel R. (2010), Terpenes from marine-derived fungi. *Marine Drugs,* **8**, 8, pp. 2340-68.

Ehrlich P. (page consultée le 27 Septembre 2012), Partial cell functions. *http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1908/ehrlich-lecture.pdf*.

Eisenreich W., Bacher A., Arigoni D., Rohdich F. (2004), Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cellular & Molecular Life Sciences : CMLS,* **61**, 12, pp. 1401-26.

Eiznhamer D. A., Xu Z. Q. (2004), Betulinic acid: a promising anticancer candidate. *IDrugs : the investigational drugs journal,* **7**, 4, pp. 359-73.

El Ghoul Y., Blanchemain N., Laurent T., Campagne C., El Achari A., Roudesli S., Morcellet M., Martel B., Hildebrand H. F. (2008), Chemical, biological and microbiological evaluation of cyclodextrin finished polyamide inguinal meshes. *Acta biomaterialia,* **4**, 5, pp. 1392-400.

Eschenmoser, Ruzicka, Jeger, Arigoni (1955), kenntnis der Triterpenes. *Helvetica chimica acta,* **38**, pp. 1890–904.

Fedorka-Cray P. J., Cray W. C., Jr., Anderson G. A., Nickerson K. W. (1988), Bacterial tolerance of 100% dimethyl sulfoxide. *Canadian journal of microbiology,* **34**, 5, pp. 688-9.

Fleurette J., Freney J., Reverdy M. E. (1995), Antiseptie et désinfection. ESKA, Paris, 639 p.

Fujioka T., Kashiwada Y., Kilkuskie R. E., Cosentino L. M., Ballas L. M., Jiang J. B., Janzen W. P., Chen I. S., Lee K. H. (1994), Anti-AIDS agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from Syzigium claviflorum, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. *Journal of natural products,* **57**, 2, pp. 243-7.

Fujishima, Kusaka, UMino, Urushinata, Terumi (2001), Flour based foods containing highly branched cyclodextrins. . Japan.

Fulda S. (2008), Betulinic Acid for cancer treatment and prevention. *International Journal of Molecular Sciences,* **9**, 6, pp. 1096-107.

Fulda S. (2009), Betulinic acid: a natural product with anticancer activity. *Molecular Nutrition & Food Research,* **53**, 1, pp. 140-6.

Fusenig N. E., Boukamp P. (1998), Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Molecular Carcinogenesis,* **23**, 3, pp. 144-58.

Gao D., Li Q., Li Y., Liu Z., Fan Y., Zhao H., Li J., Han Z. (2009), Antidiabetic and antioxidant effects of oleanolic acid from Ligustrum lucidum Ait in alloxan-induced diabetic rats. *Phytotherapy Research : PTR,* **23**, 9, pp. 1257-62.

Gao D., Li Q., Li Y., Liu Z., Fan Y., Zhao H., Li J., Han Z. (2009), Antidiabetic and antioxidant effects of oleanolic acid from Ligustrum lucidum Ait in alloxan-induced diabetic rats. *Phytother Res,* **23**, 9, pp. 1257-62.

Gauthier C. (2006), Glycosidation de triterpènes pentacycliques de type lupane et évaluation in vitro de leur potentiel anticancéreux, UQAC, Chicoutimi,

Gauthier C., Legault J., Lebrun M., Dufour P., Pichette A. (2006), Glycosidation of lupane-type triterpenoids as potent in vitro cytotoxic agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters,* **14**, 19, pp. 6713-25.

Geller C. (2011), Antisepsie-désinfection antivirale : Pertinence du choix des modèles viraux pour un usage en Etablissements de Soins. THESE pour le DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR en PHARMACIE, UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY 1, NANCY, 131p.

Geller C., Fontanay S., Finance C., Duval R. E. (2009), A new Sephadex™-based method for removing microbicidal and cytotoxic residues when testing antiseptics against viruses: Experiments with a human coronavirus as a model. *Journal of virological methods,* **159**, 2, pp. 217-26.

Geller C., Fontanay S., Finance C., Duval R. E. (2009), A new Sephadex™-based method for removing microbicidal and cytotoxic residues when testing antiseptics against viruses: Experiments with a human coronavirus as a model. *Journal of virological methods,* **159**, 2, pp. 217-226.

Genet C., Strehle A., Schmidt C., Boudjelal G., Lobstein A., Schoonjans K., Souchet M., Auwerx J., Saladin R., Wagner A. (2010), Structure-activity relationship study of betulinic acid, a novel and selective TGR5 agonist, and its synthetic derivatives: potential impact in diabetes. *Journal of Medicinal Chemistry,* **53**, 1, pp. 178-90.

Germonprez N., Maes L., Van Puyvelde L., Van Tri M., Tuan D. A., De Kimpe N. (2005), *In vitro* and *in vivo* anti-leishmanial activity of triterpenoid saponins isolated from *Maesa balansae* and some chemical derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry,* **48**, 1, pp. 32-7.

Gil E. S., Li J., Xiao H., Lowe T. L. (2009), Quaternary ammonium beta-cyclodextrin nanoparticles for enhancing doxorubicin permeability across the in vitro blood-brain barrier. *Biomacromolecules,* **10**, 3, pp. 505-16.

Giles P. M. (1999), Revised section F: Natural products and related compounds - IUPAC Recommendations 1999. *Pure and Applied Chemistry,* **71**, 4, pp. 587-643.

Gintl W. H. (1893), Über das Urson. *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly,* **14**, 1, pp. 255-69.

Gomez-Garcia M., Benito J. M., Rodriguez-Lucena D., Yu J. X., Chmurski K., Ortiz Mellet C., Gutierrez Gallego R., Maestre A., Defaye J., Garcia Fernandez J. M. (2005), Probing secondary carbohydrate-protein interactions with highly dense cyclodextrin-centered heteroglycoclusters: the heterocluster effect. *Journal of the American Chemical Society,* **127**, 22, pp. 7970-1.

Gould S., Scott R. C. (2005), 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP-beta-CD): a toxicology review. *Food and Chemical Toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association,* **43**, 10, pp. 1451-9.

Gould S., Scott R. C. (2005), 2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-β-CD): A toxicology review. *Food and Chemical Toxicology,* **43**, 10, pp. 1451-9.

Grare M., Fontanay S., Cornil C., Finance C., Duval R. E. (2008), Tetrazolium salts for MIC determination in microplates: why? Which salt to select? How? *Journal of microbiological methods,* **75**, 1, pp. 156-9.

Guo Y. E., Wang L. L., Li Z. L., Niu S. L., Liu X. Q., Hua H. M., Chen H., Chu J., Zhang T. C. (2011), Triterpenes and xanthones from the stem bark of Garcinia tetralata. *Journal of Asian Natural Products Research,* **13**, 5, pp. 440-3.

Gutierrez-Lugo M.-T., Singh M. P., Maiese W. M., Timmermann B. N. (2002), New Antimicrobial Cycloartane Triterpenes from Acalypha communis. *Journal of natural products,* **65**, 6, pp. 872-875.

Han S. K., Ko Y. I., Park S. J., Jin I. J., Kim Y. M. (1997), Oleanolic acid and ursolic acid stabilize liposomal membranes. *Lipids,* **32**, 7, pp. 769-73.

Hao M., Wang W., Zhao Y., Zhang R., Wang H. (2011), Pharmacokinetics and tissue distribution of 25-hydroxyprotopanaxadiol, an anti-cancer compound isolated from Panax ginseng, in athymic mice bearing xenografts of human pancreatic tumors. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics,* **35**, 3-4, pp. 109-13.

He Z. D., Ma C. Y., Zhang H. J., Tan G. T., Tamez P., Sydara K., Bouamanivong S., Southavong B., Soejarto D. D., Pezzuto J. M., Fong H. H. (2005), Antimalarial constituents from Nauclea orientalis (L.) L. *Chemistry & Biodiversity,* **2**, 10, pp. 1378-86.

Hedges A. R. (1998), Industrial Applications of Cyclodextrins. *Chemical Reviews,* **98**, 5, pp. 2035-44.

Hemmerlin A., Harwood J. L., Bach T. J. (2011), A raison d'etre for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis? *Progress in lipid research*, pp. 1466–70.

Henseleit U., Zhang J., Wanner R., Haase I., Kolde G., Rosenbach T. (1997), Role of p53 in UVB-induced apoptosis in human HaCaT keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology,* **109**, 6, pp. 722-7.

Higuchi T., Connors K. A. (1965), Phase-solubility techniques. *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation,* **4**, pp. 117-2.

Hill R. A., Connolly J. D. (2011), Triterpenoids. *Natural Product Reports,* **28**, 6, pp. 1087-117.

Hipler U. C., Schonfelder U., Hipler C., Elsner P. (2007), Influence of cyclodextrins on the proliferation of HaCaT keratinocytes in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A,* **83**, 1, pp. 70-9.

Holvoet C., Heyden Y. V., Plaizier-Vercammen J. (2007), Development of an omeprazole parenteral formulation with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Pharmaceutical Development and Technology,* **12**, 3, pp. 327-36.

Horiuchi K., Shiota S., Hatano T., Yoshida T., Kuroda T., Tsuchiya T. (2007), Antimicrobial activity of oleanolic acid from Salvia officinalis and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Biol Pharm Bull,* **30**, 6, pp. 1147-9.

Hu J. F., Garo E., Goering M. G., Pasmore M., Yoo H. D., Esser T., Sestrich J., Cremin P. A., Hough G. W., Perrone P., Lee Y. S., Le N. T., O'Neil-Johnson M., Costerton J. W., Eldridge G. R. (2006), Bacterial biofilm inhibitors from Diospyros dendo. *Journal of natural products,* **69**, 1, pp. 118-20.

Hui R. C., Francis R. E., Guest S. K., Costa J. R., Gomes A. R., Myatt S. S., Brosens J. J., Lam E. W. (2008), Doxorubicin activates FOXO3a to induce the expression of multidrug resistance gene ABCB1 (MDR1) in K562 leukemic cells. *Molecular cancer therapeutics,* **7**, 3, pp. 670-8.

Ibrahim A., Khalifa S. I., Khafagi I., Youssef D. T., Khan S., Mesbah M., Khan I. (2008), Microbial metabolism of biologically active secondary metabolites from Nerium oleander L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo),* **56**, 9, pp. 1253-8.

Irie T., Otagiri M., Sunada M., Uekama K., Ohtani Y., Yamada Y., Sugiyama Y. (1982), Cyclodextrin-induced hemolysis and shape changes of human erythrocytes in vitro. *Journal of Pharmacobio-dynamics,* **5**, 9, pp. 741-4.

Irie T., Uekama K. (1997), Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *Journal of Pharmaceutical Sciences,* **86**, 2, pp. 147-62.

Irie T., Uekama K. (1997), Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J Pharm Sci,* **86**, 2, pp. 147-62.

Irie T., Uekama K. (1999), Cyclodextrins in peptide and protein delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews,* **36**, 1, pp. 101-23.

Isaka M., Hywel-Jones N. L., Sappan M., Mongkolsamrit S., Saidaengkham S. (2009), Hopane triterpenes as chemotaxonomic markers for the scale insect pathogens Hypocrella sensus lato. and Aschersonia. *Mycological Research*, pp.

Isaka M., Yangchum A., Rachtawee P., Komwijit S., Lutthisungneon A. (2010), Hopane-type triterpenes and binaphthopyrones from the scale insect pathogenic fungus Aschersonia paraphysata BCC 11964. *Journal of natural products,* **73**, 4, pp. 688-92.

Ismaili H., Milella L., Fkih-Tetouani S., Ilidrissi A., Camporese A., Sosa S., Altinier G., Della Loggia R., Aquino R. (2004), *In vivo* topical anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of two extracts of *Thymus satureioides* leaves. *Journal of Ethnopharmacology,* **91**, 1, pp. 31-6.

Jacobs J. P., Jones C. M., Baille J. P. (1970), Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature,* **227**, 5254, pp. 168-70.

Jäger S., Trojan H., Kopp T., Laszczyk M., Scheffler A. (2009), Pentacyclic Triterpene Distribution in Various Plants – Rich Sources for a New Group of Multi-Potent Plant Extracts. *Molecules,* **14**, 6, pp. 2016-2031.

Jager S., Trojan H., Kopp T., Laszczyk M. N., Scheffler A. (2009), Pentacyclic triterpene distribution in various plants - rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules,* **14**, 6, pp. 2016-31.

Jager S., Winkler K., Pfuller U., Scheffler A. (2007), Solubility studies of oleanolic acid and betulinic acid in aqueous solutions and plant extracts of Viscum album L. *Planta Medica,* **73**, 2, pp. 157-62.

Jain S. K., Gupta Y., Jain A., Amin S. (2008), Elastic liposomes bearing meloxicam-beta-cyclodextrin for transdermal delivery. *Current Drug Delivery,* **5**, 3, pp. 207-14.

Jehl F., Chomarat M., Weber M., Gérard A. (2003), De l'antibiogramme à la prescription. 2nd éd., biomérieux, Marcy l'étoile, 136 p.

Jeulin H., Venard V., Carapito D., Finance C., Kedzierewicz F. (2009), Effective ribavirin concentration in mice brain using cyclodextrin as a drug carrier: evaluation in a measles encephalitis model. *Antiviral Research,* **81**, 3, pp. 261-6.

Ji H. Y., Shin B. S., Jeong D. W., Park E. J., Park E. S., Yoo S. D., Lee H. S. (2009), Interspecies scaling of oleanolic acid in mice, rats, rabbits and dogs and prediction of human pharmacokinetics. *Archives of Pharmacal Research,* **32**, 2, pp. 251-7.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting (40th : 1992 : Geneva Switzerland) (1993), Residues of some veterinary drugs in animals and foods : monographs prepared by the fortieth Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva, 9-18 June 1992. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, xiii, 177 p. p. (FAO Food and Nutrition Paper).

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting (44th : 1995 : Rome Italy), Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. (1995), Evaluation of certain food additives and contaminants : forty-fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organization, Geneva, viii, 54 p. p. (WHO Technical Report Series).

JORF (2010), Arrêté du 22 juin 2010 concernant l'interdiction d'utilisation de certains produits biocides.

JORF (2011), Avis aux producteurs, importateurs et distributeurs de substances actives et de produits biocides et autres responsables de la mise sur le marché de produits biocides et aux utilisateurs de produits biocides concernant l'interdiction d'utilisation de certains produits biocides
DEVP1101771V

Kahlmeter G., Brown D. F. J., Goldstein F. W., MacGowan A. P., Mouton J. W., Odenholt I., Rodloff A., Soussy C. J., Steinbakk M., Soriano F., Stetsiouk O. (2006), European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Technical Notes on antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection,* **12**, 6, pp. 501-503.

Kashiwada Y., Chiyo J., Ikeshiro Y., Nagao T., Okabe H., Cosentino L. M., Fowke K., Morris-Natschke S. L., Lee K. H. (2000), Synthesis and anti-HIV activity of 3-alkylamido-3-deoxy-betulinic acid derivatives. *Chemical & pharmaceutical bulletin,* **48**, 9, pp. 1387-90.

Kashiwada Y., Wang H. K., Nagao T., Kitanaka S., Yasuda I., Fujioka T., Yamagishi T., Cosentino L. M., Kozuka M., Okabe H., Ikeshiro Y., Hu C. Q., Yeh E., Lee K. H. (1998), Anti-AIDS agents. 30. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids. *Journal of natural products,* **61**, 9, pp. 1090-5.

Kayaci F., Uyar T. (2012), Encapsulation of vanillin/cyclodextrin inclusion complex in electrospun polyvinyl alcohol (PVA) nanowebs: Prolonged shelf-life and high temperature stability of vanillin. *Food chemistry,* **133**, 3, pp. 641-49.

Khan S. A., Patil K. S., Yeole P. G. (2008), Intranasal mucoadhesive buspirone formulation: in vitro characterization and nasal clearance studies. *Die Pharmazie,* **63**, 5, pp. 348-51.

Kikuchi M., Uemura Y., Hirayama F., Otagiri M., Uekama K. (1984), Improvement of some pharmaceutical properties of carmoful by cycrodextrin complexation. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry,* **2**, 3, pp. 623-630.

Kim D. K., Baek J. H., Kang C. M., Yoo M. A., Sung J. W., Chung H. Y., Kim N. D., Choi Y. H., Lee S. H., Kim K. W. (2000), Apoptotic activity of ursolic acid may correlate with the inhibition of initiation of DNA replication. *International Journal of Cancer,* **87**, 5, pp. 629-36.

Knapp D. J., Harrigan P. R., Poon A. F., Brumme Z. L., Brockman M., Cheung P. K. (2011), *In vitro* selection of clinically relevant bevirimat resistance mutations revealed by "deep" sequencing of serially passaged, quasispecies-containing recombinant HIV-1. *Journal of Clinical Microbiology,* **49**, 1, pp. 201-8.

Kondo H., Nakatani H., Hiromi K. (1990), *In vitro* action of human and porcine [alpha]-amylases on cyclomalto-oligosaccharides. *Carbohydrate Research,* **204**, pp. 207-13.

Kowalski R. (2007), Studies of selected plant raw materials as alternative sources of triterpenes of oleanolic and ursolic acid types. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **55**, 3, pp. 656-62.

Kozai K., Miyake Y., Kohda H., Kametaka S., Yamasaki K., Suginaka H., Nagasaka N. (1987), Inhibition of glucosyltransferase from Streptococcus mutans by oleanolic acid and ursolic acid. *Caries Research,* **21**, 2, pp. 104-8.

Kuiate J. R., Mouokeu S., Wabo H. K., Tane P. (2007), Antidermatophytic triterpenoids from Syzygium jambos (L.) Alston (Myrtaceae). *Phytotherapy Research,* **21**, 2, pp. 149-52.

Kulkarni A., DeFrees K., Hyun S.-H., Thompson D. H. (2012), Pendant Polymer:Amino-β-Cyclodextrin:siRNA Guest:Host Nanoparticles as Efficient Vectors for Gene Silencing. *Journal of the American Chemical Society,* **134**, 18, pp. 7596-99.

Kulkarni A., Deng W., Hyun S.-H., Thompson D. H. (2012), Development of a Low Toxicity, Effective pDNA Vector Based on Noncovalent Assembly of Bioresponsive Amino-β-cyclodextrin:Adamantane–Poly(vinyl alcohol)–Poly(ethylene glycol) Transfection Complexes. *Bioconjugate Chemistry,* **23**, 5, pp. 933-40.

Kurek A., Nadkowska P., Pliszka S., Wolska K. I. (2012), Modulation of antibiotic resistance in bacterial pathogens by oleanolic acid and ursolic acid. *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology,* **19**, 6, pp. 515-9.

Kwon S.-H., Park H.-Y., Kim J.-Y., Jeong I.-Y., Lee M.-K., Seo K.-I. (2010), Apoptotic action of ursolic acid isolated from Corni fructus in RC-58T/h/SA#4 primary human prostate cancer cells. Elsevier, Amsterdam, PAYS-BAS, 4 p.

Lacroix C., Dubach M., Feuilhade M. (2003), Les échinocandines : une nouvelle classe d'antifongiquesEchinocandins: a new class of antifungal agents. *Medecine et maladies infectieuses,* **33**, 4, pp. 183-91.

Lanza V., Vecchio G. (2009), New conjugates of superoxide dismutase/catalase mimetics with cyclodestrins. *Journal of Inorganic Biochemistry,* **103**, 3, pp. 381-8.

Laszczyk M. N. (2009), Pentacyclic Triterpenes of the Lupane, Oleanane and Ursane Group as Tools in Cancer Therapy. *Planta Medica*, pp. 1549-60

Li J., Guo W. J., Yang Q. Y. (2002), Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15. *World Journal of Gastroenterology,* **8**, 3, pp. 493-5.

Liao Q., Yang W., Jia Y., Chen X., Gao Q., Bi K. (2005), LC-MS determination and pharmacokinetic studies of ursolic acid in rat plasma after administration of the traditional chinese medicinal preparation Lu-Ying extract. *Yakugaku Zasshi,* **125**, 6, pp. 509-15.

Lina B. A. R., Bär A. (2004), Subchronic (13-week) oral toxicity study of α-cyclodextrin in dogs. *Regulatory Toxicology and Pharmacology,* **39, Supplement 1**, 0, pp. 27-33.

Lina B. A. R., Bär A. (2004), Subchronic oral toxicity studies with α-cyclodextrin in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology,* **39, Supplement 1**, 0, pp. 14-26.

Linas M. D. (2007), Pathologies d'origine mycosique. Groupe Liaisons SA, Rueil-Malmaisonp. (Infectiologie).

Liu J. (2005), Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. *Journal of Ethnopharmacology,* **100**, 1-2, pp. 92-4.

Liu L., Guo Q.-X. (2002), The Driving Forces in the Inclusion Complexation of Cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry,* **42**, 1, pp. 1-14.

Loftson T., Sigfusson S. D., SigurdssonI H. H., Masson M. (2003), The effects of cyclodextrins on topical delivery of hydrocortisone: the aqueous diffusion layer. Editions de santé, Paris, FRANCE, 7 p.

Loftsson T., Brewster M. E. (1996), Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences,* **85**, 10, pp. 1017-25.

Loftsson T., Duchene D. (2007), Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics,* **329**, 1-2, pp. 1-11.

Loftsson T., Hreinsdottir D., Masson M. (2005), Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *International Journal of Pharmaceutics,* **302**, 1-2, pp. 18-28.

Loftsson T., Vogensen S. B., Brewster M. E., Konradsdottir F. (2007), Effects of cyclodextrins on drug delivery through biological membranes. *Journal of Pharmaceutical Sciences,* **96**, 10, pp. 2532-46.

Lohmann F. (1988), Aromatisations microbiennes de triterpènes végétaux. , Strasbourg, Strasbourg, 105p.

Lozzio C. B., Lozzio B. B. (1975), Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood,* **45**, 3, pp. 321-34.

Lu W., Salzwedel K., Wang D., Chakravarty S., Freed E. O., Wild C. T., Li F. (2011), A single polymorphism in HIV-1 subtype C SP1 is sufficient to confer natural resistance to the maturation inhibitor bevirimat. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* **55**, 7, pp. 3324-9.

Lu Z. M., Lei J. Y., Xu H. Y., Shi J. S., Xu Z. H. (2011), Optimization of fermentation medium for triterpenoid production from Antrodia camphorata ATCC 200183 using artificial intelligence-based techniques. *Applied Microbiology and Biotechnology,* **92**, 2, pp. 371-9.

Lynen F. (page consultée le 27 Septembre 2012), The pathway from "activated acetic acid" to the terpenes and the fatty acids. *http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1964/lynen-lecture.pdf*.

Ma C.-M., Nakamura N., Hattori M. (2000), Chemical modification of oleanene type triterpenes and their inhibitory activity against HIV-1 protease dimerization. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo),* **48**, 11, pp. 1681-88.

Mallavadhani U. V., Mahapatra A., Jamil K., Reddy P. S. (2004), Antimicrobial activity of some pentacyclic triterpenes and their synthesized 3-O-lipophilic chains. *Biological & pharmaceutical bulletin,* **27**, 10, pp. 1576-9.

Mannila J., Jarvinen T., Jarvinen K., Jarho P. (2007), Precipitation complexation method produces cannabidiol/beta-cyclodextrin inclusion complex suitable for sublingual administration of cannabidiol. *Journal of Pharmaceutical Sciences,* **96**, 2, pp. 312-9.

Maragos C. M., Appell M., Lippolis V., Visconti A., Catucci L., Pascale M. (2008), Use of cyclodextrins as modifiers of fluorescence in the detection of mycotoxins. *Food Additives & Contaminants: Part A,* **25**, 2, pp. 164-71.

Markarian S. A., Poladyan A. A., Kirakosyan G. R., Trchounian A. A., Bagramyan K. A. (2002), Effect of diethylsulphoxide on growth, survival and ion exchange of Escherichia coli. *Letters in Applied Microbiology,* **34**, 6, pp. 417-21.

Marshall J. J., Miwa I. (1981), Kinetic difference between hydrolyses of gamma-cyclodextrin by human salivary and pancreatic alpha-amylases. *Biochimica et biophysica acta,* **661**, 1, pp. 142-7.

Martin R., Carvalho-Tavares J., Hernandez M., Arnes M., Ruiz-Gutierrez V., Nieto M. L. (2010), Beneficial actions of oleanolic acid in an experimental model of multiple sclerosis: a potential therapeutic role. *Biochem Pharmacol,* **79**, 2, pp. 198-208.

Mathur N., Heda L. C., Mathur V. K., Saxena P. (2011), Study of CLSI-M44-A Disk Diffusion Method for Determining the Susceptibility of Candida Species against Novel Complexes Derived from Copper Stearate with 2-Amino Benzothiazoles. *Tenside Surfactants Detergents,* **48**, 1, pp. 23-27.

Matthew A. Wikler, Franklin R. Cockerill, Karen Bush, Michael N. Dudley, George M. Eliopoulos, Dwight J. Hardy, David W. Hecht, Mary Jane Ferraro, Jana M. Swenson, Janet F. Hindler, Jean B. Patel, Mair Powell, John D. Turnidge, Melvin P. Weinstein, Barbara L. Zimmer (2009), M07-A8 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for BacteriaThat Grow Aerobically; Approved Standard—Eighth Edition. p.

Medina C., Santos-Martinez M. J., Radomski A., Corrigan O. I., Radomski M. W. (2007), Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *British Journal of Pharmacology,* **150**, 5, pp. 552-8.

Meng Y.-Q., Liu D., Cai L.-L., Chen H., Cao B., Wang Y.-Z. (2009), The synthesis of ursolic acid derivatives with cytotoxic activity and the investigation of their preliminary mechanism of action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry,* **17**, 2, pp. 848-854.

Menuel S., Duval R. E., Cuc D., Mutzenhardt P., Marsura A. (2007), Molecular recognition of nucleotides by a new bis(guanidinium)tetrakis([small beta]-cyclodextrin) tetrapod. *New Journal of Chemistry,* **31**, 6, pp. 995-1000.

Miao Q., Li S., Han S., Wang Z., Wu Y., Nie G. (2012), Construction of hydroxypropyl-β-cyclodextrin copolymer nanoparticles and targeting delivery of paclitaxel. *Journal of Nanoparticle Research,* **14**, 8, pp. 1-14.

Miro A., Rondinone A., Nappi A., Ungaro F., Quaglia F., La Rotonda M. I. (2009), Modulation of release rate and barrier transport of Diclofenac incorporated in hydrophilic matrices: role of cyclodextrins and implications in oral drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V,* **72**, 1, pp. 76-82.

Moeder C., O'Brien T., Thompson R., Bicker G. (1996), Determination of stoichiometric coefficients and apparent formation constants for α- and β-CD complexes of terpenes using reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A,* **736**, 1–2, pp. 1-9.

Mosheni R. M., Hurtubise R. J. (1990), Retention charachteristics of several compounds classes in reversed-phase liquid chromatography with β-cyclodextrin as a mobile phase modifier. *Journal of chromatography,* **499**, pp. 395-410.

Mosmann T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods,* **65**, 1-2, pp. 55-63.

Mullauer F. B., Kessler J. H., Medema J. P. (2009), Betulin Is a Potent Anti-Tumor Agent that Is Enhanced by Cholesterol. *PLoS One,* **4**, 4, pp. e1.

Munro I. C., Newberne P. M., Young V. R., Bar A. (2004), Safety assessment of gamma-cyclodextrin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology,* **39 Suppl 1**, pp. S3-13.

Muppaneni S., Sonpetkar J., Retinasamy S., Nitin Kumar Mishra (2012), Cyclodextrins for drug delivrery: applications and recent trends. In Inventi Impact: NDDS Vol. 2012

Murakami S., Takashima H., Sato-Watanabe M., Chonan S., Yamamoto K., Saitoh M., Saito S., Yoshimura H., Sugawara K., Yang J., Gao N., Zhang X. (2004), Ursolic acid, an antagonist for transforming growth factor (TGF)-beta1. *FEBS Letter,* **566**, 1-3, pp. 55-9.

Nagarsenker M. S., Amin L., Date A. A. (2008), Potential of cyclodextrin complexation and liposomes in topical delivery of ketorolac: in vitro and in vivo evaluation. *American Association of Pharmaceutical Scientists : PharmSci Tech,* **9**, 4, pp. 1165-70.

Napierska D., Rabolli V., Thomassen L. C., Dinsdale D., Princen C., Gonzalez L., Poels K. L., Kirsch-Volders M., Lison D., Martens J. A., Hoet P. H. (2012), Oxidative stress induced by pure and iron-doped amorphous silica nanoparticles in subtoxic conditions. *Chemical Research in Toxicology,* **25**, 4, pp. 828-37.

Nayebzadeh A. (2007), The effect of work practices on personal exposure to glutaraldehyde among health care workers. *Industrial health,* **45**, 2, pp. 289-95.

Niu X. F., Liu X., Pan L., Qi L. (2011), Oleanene triterpenes from Sedum lineare Thunb. *Fitoterapia*, pp.

Nuanyai T., Sappapan R., Vilaivan T., Pudhom K. (2011), Gardenoins E-H, Cycloartane Triterpenes from the Apical Buds of Gardenia obtusifolia. *Chem Pharm Bull (Tokyo),* **59**, 3, pp. 385-7.

Nyila M. A., Leonard C. M., Hussein A. A., Lall N. (2012), Activity of South African medicinal plants against Listeria monocytogenes biofilms, and isolation of active compounds from Acacia karroo. *South African Journal of Botany,* **78**, 0, pp. 220-7.

Oda Y., Kobayashi N., Yamanoi T., Katsuraya K., Takahashi K., Hattori K. (2008), Beta-cyclodextrin conjugates with glucose moieties designed as drug carriers: their syntheses, evaluations using concanavalin A and doxorubicin, and structural analyses by NMR spectroscopy. *Medicinal Chemistry,* **4**, 3, pp. 244-55.

Ogura K., Koyama T., Sagami H. (1997), Polyprenyl diphosphate synthases. *Sub-cellular Biochemistry,* **28**, pp. 57-87.

Ohtani Y., Irie T., Uekama K., Fukunaga K., Pitha J. (1989), Differential effects of α-, β- and γ-cyclodextrins on human erythrocytes. *European Journal of Biochemistry,* **186**, 1-2, pp. 17-22.

Opalchenova G., Obreshkova D. (1999), Antibacterial Action of Extracts of Clinopodium vulgare L. Curative Plant. *Drug Development and Industrial Pharmacy,* **25**, 3, pp. 323-8.

Ovesná Z., Kozics K., Slameňová D. (2006), Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis,* **600**, 1–2, pp. 131-7.

Ozcakmak S., Dervisoglu M., Pembec-Kodolba C., Sagdic O. (2010), Effects of thyme and rosemary essential oils on the growth of two aflatoxigenic Aspergillus flavus strains. Halm, Gottingen, ALLEMAGNE, 5 p.

Palem C. R., Patel S., Pokharkar V. B. (2009), Solubility and stability enhancement of atorvastatin by cyclodextrin complexation. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology,* **63**, 3, pp. 217-25.

Parrot-Lopez H., Perret F., Bertino-Ghera B. (2010), Les cyclodextrines amphiphiles et leurs applications. Élaboration de nanoparticules de cyclodextrines amphiphiles pour des applications biomédicales. *Annales Pharmaceutiques Françaises,* **68**, 1, pp. 12-26.

Paulidou A., Maffeo D., Yannakopoulou K., Mavridis I. M. (2008), Crystal structure of the inclusion complex of the antibacterial agent triclosan with cyclomaltoheptaose and NMR study of its molecular encapsulation in positively and negatively charged cyclomaltoheptaose derivatives. *Carbohydrate Research,* **343**, 15, pp. 2634-40.

Persat F., Gangneux J.-P. (2008),Résultats de l'enquête ANOFEL 2007 sur les sérologies fongiques; http://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00676863.

Petronelli A., Pannitteri G., Testa U. (2009), Triterpenoids as new promising anticancer drugs. *Anti-Cancer Drugs,* **20**, 10, pp. 880-92.

Ponou B. K., Teponno R. B., Ricciutelli M., Nguelefack T. B., Quassinti L., Bramucci M., Lupidi G., Barboni L., Tapondjou L. A. (2011), Novel 3-Oxo- and 3,24-Dinor-2,4-secooleanane-Type Triterpenes from Terminalia ivorensis A. Chev. *Chemistry & Biodiversity,* **8**, 7, pp. 1301-9.

Power F. B., Moore C. W. (1910), XCI.-The constituents of the leaves of Prunus serotina. *Journal of the Chemical Society, Transactions,* **97**, pp. 1099-1112.

Prades J., Vögler O., Alemany R., Gomez-Florit M., Funari S. S., Ruiz-Gutiérrez V., Barceló F. (2011), Plant pentacyclic triterpenic acids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes,* **1808**, 3, pp. 752-60.

Pralhad T., Rajendrakumar K. (2004), Study of freeze-dried quercetin-cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* **34**, 2, pp. 333-9.

Ragasa C. Y., Espineli D. L., Shen C. C. (2011), New triterpenes from Barringtonia asiatica. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin,* **59**, 6, pp. 778-82.

RAISIN (juin 2006), Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (Raisin) Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales, France, juin 2006 -Volume 1 - Méthodes, résultats, perspectives. Saint Maurice (Fra): Institut de veille sanitaire, mars 2009, 81 p. Disponible sur: www.invs.sante.fr. pp. 0-81.

Ramirez-Espinosa J. J., Rios M. Y., Lopez-Martinez S., Lopez-Vallejo F., Medina-Franco J. L., Paoli P., Camici G., Navarrete-Vazquez G., Ortiz-Andrade R., Estrada-Soto S. (2011),

Antidiabetic activity of some pentacyclic acid triterpenoids, role of PTP-1B: in vitro, in silico, and in vivo approaches. *European Journal of Medicinal Chemistry,* **46**, 6, pp. 2243-51.

Redenti E., Pietra C., Gerloczy A., Szente L. (2001), Cyclodextrins in oligonucleotide delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews,* **53**, 2, pp. 235-44.

Reed L. J., Muench H. (1938), A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American journal of epidemiology,* **27**, 3, pp. 493-497.

Reinert D. J., Balliano G., Schulz G. E. (2004), Conversion of squalene to the pentacarbocyclic hopene. *Chemistry & Biology,* **11**, 1, pp. 121-6.

Rhim J. S., Schell K., Creasy B., Case W. (1969), Biological characteristics and viral susceptibility of an African green monkey kidney cell line (Vero). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine,* **132**, 2, pp. 670-8.

Robertson A., Soliman G., Owen E.-C. (1939), *Journal of the Chemical Society*, pp. 1267-73.

Rocha A. D., de Oliveira A. B., de Souza Filho J. D., Lombardi J. A., Braga F. C. (2004), Antifungal constituents of Clytostoma ramentaceum and Mansoa hirsuta. *Phytotherapy Research,* **18**, 6, pp. 463-7.

Rohmer M. (1999), The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Natural Product Reports,* **16**, 5, pp. 565-74.

Rohmer M., Vandecasteele J. P. (2007), Microbiologie pétrolière: Concepts. Implications environnementales. Applications industrielles. IFP energie nouvelle éd., IFP, 787 p.

Rowe E. J., Orr J. E., Uhl A. H., Parks L. M. (1949), Isolation of oleanolic acid and ursolic acid from Thymus vulgaris, L. *Journal of the American Pharmaceutical Association,* **38**, 3, pp. 122-124.

Rukmani A., Sundrarajan M. (2012), Inclusion of antibacterial agent thymol on β-cyclodextrin-grafted organic cotton. *Journal of Industrial Textiles,* **42**, 2, pp. 132-44.

Ruzicka (1959), History of the isoprene rule. Proc. Chem. Soc.p. (Faraday lecture).

Ruzicka L. (page consultée le 27 Septembre 2012), Multimembered rings, higher terpene compounds and male sex hormones. *http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1939/ruzicka-lecture.pdf*.

Ruzicka L., Jeger, Redel J., Volli E. (1945), . *Helvetica chimica acta,* **28**, pp. 1999.

Ruzicka L., Prelog V., Meister P. (1945), *Helvetica chimica acta,* **28**, 7, pp. 1651-60.

Sabin A. B. (1957), Present status of attenuated live virus poliomyelitis vaccine. *Bulletin of the New York Academy of Medicine,* **33**, 1, pp. 17-39.

Sando C. E. (1931), Ursolic acid. *Journal of Biological Chemistry,* **90**, 2, pp. 477-95.

Saravanan R., Viswanathan P., Pugalendi K. V. (2006), Protective effect of ursolic acid on ethanol-mediated experimental liver damage in rats. *Life Science,* **78**, 7, pp. 713-8.

Sautour M., Sixt N., Dalle F., L'Ollivier C., Calinon C., Fourquenet V., Lafoon I., Aho S., Couillault G., Vagner O., Cuisenier B., Besancenot J.-P., Caillot D., Bonnin A. (2008),Evaluation prospective de la contamination fongique dans deux services hospitaliers au cours d'un chantier de construction. http://cclin-est.fr/UserFiles/File/divers/journee_inf_fungiques/M_Sautour_evaluatio_prospective_periode_travaux.pdf

Scalia S., Tursilli R., Iannuccelli V. (2007), Complexation of the sunscreen agent, 4-methylbenzylidene camphor with cyclodextrins: effect on photostability and human stratum corneum penetration. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* **44**, 1, pp. 29-34.

Schiller R. L., Lincoln S. F., Coates J. H. (1987), The inclusion of pyronine Y by [small beta]- and [gamma]-cyclodextrin. A Kinetic and equilibrium study. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases,* **83**, 11, pp. 3237-48.

Schneider H.-J., Kacket F., Rüdiger V. (1998), NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Chemical Reviews,* **98**, pp. 1755–85.

Setzer W. N., Rozmus G. F., Setzer M. C., Schmidt J. M., Vogler B., Reeb S., Jackes B. R., Irvine A. K. (2006), Bioactive principles in the bark of Pilidiostigma tropicum. *Journal of Molecular Modeling,* **12**, 5, pp. 703-11.

Shai L. J., McGaw L. J., Aderogba M. A., Mdee L. K., Eloff J. N. (2008), Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from Curtisia dentata (Burm.f) C.A. Sm. leaves. *Journal of Ethnopharmacology,* **119**, 2, pp. 238-44.

Shen X., Belletête M., Durocher G. (1998), Spectral and Photophysical Studies of the 1:3 (Guest/Host) Rotaxane-like Inclusion Complex Formed by a 3H-Indole and β-Cyclodextrin. *The Journal of Physical Chemistry B,* **102**, 11, pp. 1877-83.

Shikov A. N., Djachuk G. I., Sergeev D. V., Pozharitskaya O. N., Esaulenko E. V., Kosman V. M., Makarov V. G. (2011), Birch bark extract as therapy for chronic hepatitis C--a pilot study. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology,* **18**, 10, pp. 807-10.

Simon A., Delage C., Saux M., Chulia A. J., Najid A., Rigaud M. (1992), Structure of ursolic acid ethanol solvate. *Acta Crystallographica Section C,* **48**, 4, pp. 726-28.

Simonet J. (2007), Inactivation et dégradation du génome des bactériophages ARNF-spécifiques et du Poliovirus 1 par le rayonnement ultraviolet, Henri Poincaré, Nancy 1, Nancy,

Skalko-Basnet N., Pavelic Z., Becirevic-Lacan M. (2000), Liposomes Containing Drug and Cyclodextrin Prepared by the One-Step Spray-Drying Method. *Drug Development and Industrial Pharmacy,* **26**, 12, pp. 1279-84.

Smith P. F., Ogundele A., Forrest A., Wilton J., Salzwedel K., Doto J., Allaway G. P., Martin D. E. (2007), Phase I and II study of the safety, virologic effect, and pharmacokinetics/pharmacodynamics of single-dose 3-o-(3',3'-dimethylsuccinyl)betulinic acid (bevirimat) against human immunodeficiency virus infection. *Antimicrobial Agents Chemotherapy,* **51**, 10, pp. 3574-81.

Somova L. I., Shode F. O., Ramnanan P., Nadar A. (2003), Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from Olea europaea, subspecies africana leaves. *Journal of Ethnopharmacology,* **84**, 2-3, pp. 299-305.

Somova L. O., Nadar A., Rammanan P., Shode F. O. (2003), Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. *Phytomedicine,* **10**, 2-3, pp. 115-21.

Stella V. J., He Q. (2008), Cyclodextrins. *Toxicologic Pathology,* **36**, 1, pp. 30-42.

Stella V. J., He Q. (2008), Cyclodextrins. *Toxicol Pathol,* **36**, 1, pp. 30-42.

Stella V. J., Rajewski R. A. (1997), Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery. *Pharmaceutical Research,* **14**, 5, pp. 556-67.

Stella V. J., Rao V. M., Zannou E. A., Zia V. V. (1999), Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. *Advanced Drug Delivery Reviews,* **36**, 1, pp. 3-16.

Stevens D. A. (1999), Itraconazole in cyclodextrin solution. *Pharmacotherapy,* **19**, 5, pp. 603-11.

Stradonitz F. K. v. (1865), Sur la constitution des substances aromatiques. In Bulletin de la Societe Chimique de Paris, pp. 98-110.

Stuenkel C. A., Dudley R. E., Yen S. S. (1991), Sublingual administration of testosterone-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex simulates episodic androgen release in hypogonadal men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,* **72**, 5, pp. 1054-9.

Suresh C., Zhao H., Gumbs A., Chetty C. S., Bose H. S. (2012), New ionic derivatives of betulinic acid as highly potent anti-cancer agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters,* **22**, 4, pp. 1734-8.

Swiech O., Mieczkowska A., Chmurski K., Bilewicz R. (2012), Intermolecular Interactions between Doxorubicin and β-Cyclodextrin 4-Methoxyphenol Conjugates. *The Journal of Physical Chemistry B,* **116**, 6, pp. 1765-71.

Szejtli J. (1988), Cyclodextrin Technology. Kluwer Academic Publishersp.

Szejtli J. (1997), Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes. *Journal of Materials Chemistry,* **7**, 4, pp. 575-87.

Szejtli J. (2004), Past, present, and future of cyclodextrin research. *Pure and Applied Chemistry,* **76**, 10, pp. 1825-1845.

Szejtli J., Szente L. (2005), Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* **61**, 3, pp. 115-25.

Szejtli J., Szente L. (2005), Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. *Eur J Pharm Biopharm,* **61**, 3, pp. 115-25.

Tan Y., Yu R., Pezzuto J. M. (2003), Betulinic acid-induced programmed cell death in human melanoma cells involves mitogen-activated protein kinase activation. *Clinical Cancer Research,* **9**, 7, pp. 2866-75.

Taylor R. F. (1984), Bacterial triterpenoids. *Microbiological reviews,* **48**, 3, pp. 181-98.

Tennant J. R. (1964), Evaluation of the Trypan Blue Technique for Determination of Cell Viability. *Transplantation,* **2**, 6, pp. 685-694.

Tewes F., Brillault J., Couet W., Olivier J. C. (2008), Formulation of rifampicin-cyclodextrin complexes for lung nebulization. *Journal of Controlled Release : official journal of the Controlled Release Society,* **129**, 2, pp. 93-9.

Theodoridis A. (1985), Studies on bovine herpesviruses. Part 1. Isolation and characterization of viruses isolated from the genital tract of cattle. *Onderstepoort J Vet Res,* **52**, 4, pp. 239-54.

Thurnher D., Turhani D., Pelzmann M., Wannemacher B., Knerer B., Formanek M., Wacheck V., Selzer E. (2003), Betulinic acid: a new cytotoxic compound against malignant head and neck cancer cells. *Head Neck,* **25**, 9, pp. 732-40.

Trapp S. C., Croteau R. B. (2001), Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics,* **158**, 2, pp. 811-32.

Trofimova S. F., Synzynys B. I., Gotlib V., Saenko A. S., Pelevina, II (1983), [Mechanism of the cytotoxic action of formaldehyde on cultured mammalian cells]. *Tsitologiia,* **25**, 10, pp. 1166-72.

Trommsdorff H. (1854), *Archiv der Pharmazie,* **80**, pp. 273-5.

Uekama K. (2004), Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin,* **52**, 8, pp. 900-15.

Uekama K., Hirayama F., Irie T. (1978), The new method for determination of the stability constants of cyclodextrin-prostaglandin inclusion complexes by liquid chromatography. *Chemistry Letters*, pp. 661-64.

Ulloth J. E., Almaguel F. G., Padilla A., Bu L., Liu J. W., De Leon M. (2007), Characterization of methyl-beta-cyclodextrin toxicity in NGF-differentiated PC12 cell death. *Neurotoxicology,* **28**, 3, pp. 613-21.

Villiers A. (1891), Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique. *Comptes Rendus de l'Acaddémie des Sciences,* **112**, pp. 536–38.

von Mach M., Burhenne J., Weilemann L. (2006), Accumulation of the solvent vehicle sulphobutylether beta cyclodextrin sodium in critically ill patients treated with intravenous voriconazole under renal replacement therapy. *BMC clinical pharmacology,* **6**, 1, pp. 6.

Wacker (page consultée le. *http://www.wacker.com/cms/en/products-markets/products/product.jsp?product=8972*.

Wallach O. (page consultée le 27 Septembre 2012), Alicyclic compounds. *http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1910/wallach-lecture.pdf*.

Wallach O. (1914), Terpene und Campher. 2 éd., Veit and Co., Leipzig p.

Wan J., Yuan S., Mak K., Chen J., Li T., Lin L., Lu X. (2009), Enhanced washing of HCB contaminated soils by methyl-beta-cyclodextrin combined with ethanol. *Chemosphere,* **75**, 6, pp. 759-64.

Watson R. J. (2006), Isolation and characterisation of the potential immunomodulatory principles from Astragalus membranaceus.

Wen X., Tan F., Jing Z., Liu Z. (2004), Preparation and study the 1:2 inclusion complex of carvedilol with β-cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* **34**, 3, pp. 517-523.

Wendt K. U., Feil C., Lenhart A., Poralla K., Schulz G. E. (1997), Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of squalene-hopene cyclase from Alicyclobacillus acidocaldarius. *Protein science : a publication of the Protein Society,* **6**, 3, pp. 722-4.

Wendt K. U., Poralla K., Schulz G. E. (1997), Structure and function of a squalene cyclase. *Science,* **277**, 5333, pp. 1811-5.

Wendt K. U., Schulz G. E. (1998), Isoprenoid biosynthesis: manifold chemistry catalyzed by similar enzymes. *Structure,* **6**, 2, pp. 127-33.

Wilkinson K., Boyd J. D., Glicksman M., Moore K. J., El Khoury J. (2011), A high-content drug screen identifies ursolic acid as an inhibitor of amyloid-{beta} interactions with its receptor CD36. *The Journal of biological chemistry*, pp. 34914-22.

Wilson J. R., Mills J. G., Prather I. D., Dimitrijevich S. D. (2005), A toxicity index of skin and wound cleansers used on in vitro fibroblasts and keratinocytes. *Advances in skin & wound care,* **18**, 7, pp. 373-8.

Wood D. C., Wood J. (1975), PHARMACOLOGIC AND BIOCHEMICAL CONSIDERATIONS OF DIMETHYL SULFOXIDE. *Annals of the New York Academy of Sciences,* **243**, 1, pp. 7-19.

Wu C., Qi H., Chen W., Huang C., Su C., Li W., Hou S. (2007), Preparation and evaluation of a Carbopol/HPMC-based in situ gelling ophthalmic system for puerarin. *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan,* **127**, 1, pp. 183-91.

Wu H.-Y., Chang C.-I., Lin B.-W., Yu F.-L., Lin P.-Y., Hsu J.-L., Yen C.-H., Liao M.-H., Shih W.-L. (2011), Suppression of Hepatitis B Virus X Protein-Mediated Tumorigenic Effects by Ursolic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **59**, 5, pp. 1713-22.

Wu Q., He J., Fang J., Hong M. (2010), Antitumor effect of betulinic acid on human acute leukemia K562 cells in vitro. *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medecine Science,* **30**, 4, pp. 453-7.

Wu Q., He J., Fang J., Hong M. (2010), Antitumor effect of betulinic acid on human acute leukemia K562 cells in vitro. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci,* **30**, 4, pp. 453-7.

Wutzler P., Sauerbrei A. (2004), Virucidal activity of the new disinfectant monopercitric acid. *Letters in Applied Microbiology,* **39**, 2, pp. 194-8.

Xu H. X., Zeng F. Q., Wan M., Sim K. Y. (1996), Anti-HIV triterpene acids from Geum japonicum. *Journal of natural products,* **59**, 7, pp. 643-5.

Xu R., Fazio G. C., Matsuda S. P. (2004), On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry,* **65**, 3, pp. 261-91.

Xue C. B., Chai D. W., Jin X. J., Bi Y. R., Yao X. J., Wu W. S., Zhu Y. (2011), Triterpenes and neolignans from the roots of Nannoglottis carpesioides. *Phytochemistry,* **72**, 14-15, pp. 1804-13.

Yang J., Wiley C. J., Godwin D. A., Felton L. A. (2008), Influence of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on transdermal penetration and photostability of avobenzone. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V,* **69**, 2, pp. 605-12.

Yang N. Y., Chen J. H., Zhou G. S., Tang Y. P., Duan J. A., Tian L. J., Liu X. H. (2011), Pentacyclic triterpenes from the resin of Liquidambar formosana. *Fitoterapia,* **82**, 6, pp. 927-31.

Yao D., Li H., Gou Y., Zhang H., Vlessidis A. G., Zhou H., Evmiridis N. P., Liu Z. (2009), Betulinic acid-mediated inhibitory effect on hepatitis B virus by suppression of manganese superoxide dismutase expression. *The FEBS journal,* **276**, 9, pp. 2599-614.

Yi J. E., Obminska-Mrukowicz B., Yuan L. Y., Yuan H. (2010), Immunomodulatory effects of betulinic acid from the bark of white birch on mice. *Journal of Veterinary Science,* **11**, 4, pp. 305-13.

Yogeeswari P., Sriram D. (2005), Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. *Current Medicinal Chemistry,* **12**, 6, pp. 657-66.

Yun Y., Han S., Park E., Yim D., Lee S., Lee C. K., Cho K., Kim K. (2003), Immunomodulatory activity of betulinic acid by producing pro-inflammatory cytokines and activation of macrophages. *Archives of Pharmacal Research,* **26**, 12, pp. 1087-95.

Zhang W., Hong D., Zhou Y., Zhang Y., Shen Q., Li J. Y., Hu L. H., Li J. (2006), Ursolic acid and its derivative inhibit protein tyrosine phosphatase 1B, enhancing insulin receptor phosphorylation and stimulating glucose uptake. *Biochimica et Biophysica Acta,* **1760**, 10, pp. 1505-12.

Zuco V., Supino R., Righetti S. C., Cleris L., Marchesi E., Gambacorti-Passerini C., Formelli F. (2002), Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Letters,* **175**, 1, pp. 17-25.

Annexes

Article 1 :

Ursolic, oleanolic and betulinic acids : Antibacterial spectra and selectivity indexes

Journal of Ethnopharmacology 120 (2008) 272–276

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharm

Ursolic, oleanolic and betulinic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes`

Stéphane Fontanay, Marion Grare, Joséphine Mayer, Chantal Finance, Raphaël Emmanuel Duval *

SRSMC, Nancy-University, CNRS, France

article info

Article history:
Received 16 July 2008
Received in revised form 26 August 2008
Accepted 3 September 2008
Available online 12 September 2008

Keywords:
Ursolic acid
Oleanolic acid
Betulinic acid
Antibacterial
Cytotoxicity
Selectivity index

abstract

Ethnopharmacological relevance: Ursolic acid (UA), oleanolic acid (OA) and betulinic acid (BA), three hydroxyl pentacyclic triterpenoic acids (HPTAs) naturally found in a large variety of vegetarian foods, medicinal herbs and plants have been investigated for antibacterial activity.
Aim of the study: To determine the antibacterial activity of UA, OA and BA, as well as the toxic impact on eukaryotic cells.
Materials and methods: Minimum inhibitory concentrations were determined against five reference strains (Escherichia coli ATCC 25922, Staphylococcus aureus ATCC 25923 & ATCC 29213, Enterococcus faecalis ATCC 29212 and Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853), as well as five antibiotic-resistant clinical isolates. Toxicity was evaluated against MRC-5 and HaCaT cell lines.
Results: No antibacterial activity was observed for BA; while OA and more particularly UA, did show a moderate to good antibacterial activity, but limited to Gram-positive bacteria. Nevertheless, OA and UA were devoid of antibacterial activities against clinical isolates. Moreover, viability and cytotoxic assays demonstrated that the three compounds induced a significant cytotoxicity.
Conclusions: Despite of a relative similar chemical structure; UA, OA and BA harboured different antibacterial activities, with more significant ones for UA. However, considering both viability and toxicity values, these compounds seem to have a significant impact on eukaryotic cell viability.
© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The dramatic increase in nosocomial infections (NIs) caused by resistant or multi-resistant bacteria is one of the most serious public-health challenges of the 21st century. Despite constant efforts, NI remains a leading cause of illness and death in developed countries (EARSS, 2004; Lepoutre et al., 2004; NNIS, 2004; JANIS, 2005). There is therefore a requirement for new classes of antibacterial compounds, which have activity against bacterial strains. Naturally occurring pure compounds as well as extracts from higher and lower forms of plants have indicated that inhibitory activity against numerous bacteria is widespread in nature (Cowan, 1999). Such preparations of plants are often used as antibacterial agents in traditional medicine. Among all those plant preparations we can quote as examples: Rosmarinus officinalis (Liu, 1995), Lythrum salicaria (Becker et al., 2005), Syzygium guineense (Djoukeng et al., 2005), Irvinga gabonensis (Kuete et al., 2007a), Newbouldia laevis (Kuete et al., 2007b) [for review see also Liu, 1995; Cowan, 1999; Liu, 2005]. Interestingly, terpenes and particularly hydroxyl pentacyclic triterpenoic acids (e.g., ursolic acid [UA], oleanolic acid [OA] and betulinic acid [BA]), are frequently found and closely associated with the potent antibacterial properties of such traditional medicine preparations. Those compounds are receiving, from biologists, more and more attention regarding their potential activities, since there has been strong evidence that they possess antimicrobial, anti-inflammatory, and anti-tumour activities (Liu, 2005; Yogeeswari and Sriram, 2005).

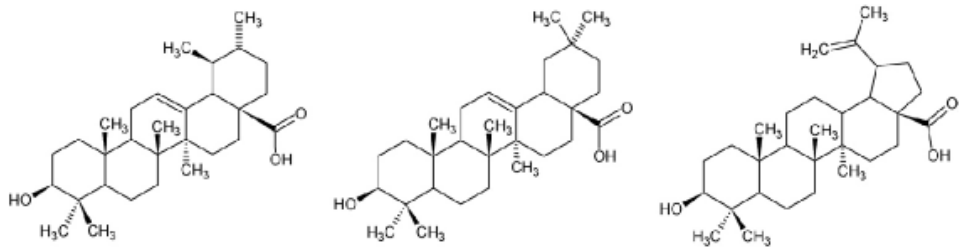
UA (also known as (3□)-3-hydroxyurs-12-en-28-oic acid), OA (3□-3-hydroxyolean-12-en-28-oic acid) and BA (3□-3-hydroxylup-20(29)-en-28-oic acid) were hydroxyl pentacyclic triterpenoic acids (HPTAs) of oleanan type for UA and OA and of lupan type for BA (Fig. 1).

Isolation and identification of those HPTAs are principally done by methanolic or chloroformic extraction (Cowan, 1999). More than

` The results of this study were presented, in part, at TERPNET 2007; 8th International Meeting: Biosynthesis and Function of Isoprenoids in Plants, Micro-organisms and Parasites, Strasbourg, France, April 30–May 4, 2007.

* Corresponding author at: Groupe d'Etude des Vecteurs Supramoléculaires du Médicament, UMR 7565 (SRSMC), Nancy-University, CNRS, Faculté de Pharmacie, 5 rue Albert Lebrun, BP 80403, 54001 Nancy Cedex, France. Tel.: +33 3 83 68 23 36; fax: +33 3 83 68 23 57.
E-mail address: raphael.duval@pharma.uhp-nancy.fr (R.E. Duval).

0378-8741/$ – see front matter © 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jep.2008.09.001



UA OA BA

Fig. 1. Semi-plane chemical structure of ursolic acid (UA) (CA Index Name: Urs-12-en-28-oic acid, 3-hydroxy-, (3β)-); oleanolic acid (OA) (CA Index Name: Olean-12-en-28-oic acid, 3-hydroxy-, (3β)-); betulinic acid (BA) (CA Index Name: Lup-20(29)-en-28-oic acid, 3-hydroxy-, (3β)-).

50,000 pentacyclic triterpenes are known for the time being, but the comparative antibacterial studies of their activities that could allow to understand and to enlighten a possible structure–activity relationship are still uncommon. The different antibacterial studies about UA, OA and BA have so far been principally performed from plant extracts and using more or less clearly defined bacterial strains. Here, we decided to estimate the potential antibacterial activity of "commercial form" of UA, OA and BA against five ATCC reference bacterial strains, as well as five antibiotic-resistant Gram-positive and Gram-negative strains, containing different resistance determinants (i.e., representative of clinical isolates currently encounter during NI), in order to determine whether or not the antibacterial activity of these three compounds is due to a synergic action with other plant's molecules. To our knowledge, these triterpenes have not previously been studied for their potential cytotoxic properties. Hence, in this study, their effect on viability were also tested by MTT assay, with determination of IC_{50}, and for cytotoxicity by neutral red assay, with evaluation of CC_{50}, in human keratinocytes (HaCaT) and human pulmonary embryonic fibroblasts (MRC-5) cell lines, in order to determine the selectivity indexes (SI).

2. Materials and methods

2.1. Drugs

Stock solutions of ursolic acid (U6753, Sigma, France), oleanolic acid (O5504, Sigma, France) and betulinic acid (85505-7 Aldrich, France) were prepared at 10^{-2} mol/L in 100% dimethyl sulfoxide (DMSO, D2438, Sigma, France). Final concentrations of DMSO never exceeded 5% (v/v). Freshly prepared solutions were sterilized on 0.22 m filter (Millex GP, SLGP033RS, Millipore, France).

These solutions were diluted in Mueller Hinton Broth (275730, Difco, France) for bacterial tests. For viability as well as cytotoxicity assays, stock solutions of UA, OA or BA were diluted in minimum essential medium (MEM, 41090, Invitrogen, France) for MRC-5 cells; or in Dulbecco's minimum Eagle's medium (DMEM, 61965, Invitrogen, France) for HaCaT cells. Both media were supplemented with 2% decomplemented foetal bovine serum (FBS, 10270, Lot 40Q5150K, Invitrogen, France).

2.2. Bacterial strains

Escherichia coli ATCC 25922, Staphylococcus aureus ATCC 25923 & ATCC 29213, Enterococcus faecalis ATCC 29212 and Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 were used as reference strains following guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI, formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003)] and of the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2006). Five previously described clinical isolates which were obtained from blood or rectal specimens were also tested in this study: penicillinase-producing Escherichia coli (EcR1), methicillin-resistant Staphylococcus aureus (mecA gene) (SaR1), vancomycin-resistant Enterococcus faecium (vanB gene) (ER1), vancomycin- and teicoplanin-resistant Enterococcus faecalis (vanA gene) (ER2), and Pseudomonas aeruginosa overexpressing efflux pumps (PaR1) (Grare et al., 2007). Antimicrobial resistances were determined by the automated instrument VITEK2 (BioMerieux, France). Strains were grown on Mueller Hinton Agar (Difco, 225250) or Mueller Hinton Broth (Difco, 275730).

2.3. MIC determination

MICs were determined by broth microdilution method recommended by the CLSI (NCCLS, 2003). For MIC determination, suspensions were prepared by suspending one isolated colony from Mueller Hinton plates in 5 mL of Mueller Hinton Broth. After 24 h of growth, the suspensions were diluted in distilled water to obtain a final inoculum of 5×10^5 to 5×10^6 cfu/mL. The purity of the isolates was checked throughout the study by examination of colony morphology and Gram stain procedure. Twofold serial dilutions of drugs were prepared in Mueller Hinton Broth in 96-well plates (Greiner, 650161), starting from a stock solution of 1024 mg/L. An equal volume of bacterial inoculum was added to each well on the microtiter plate containing 0.05 mL of the serial compound dilutions. After incubation for 18–24 h at 35 °C, the MICs were determined with an ELISA reader (read at 540 nm, Multiskan EX, Thermo Electron Corporation, France) as the lowest concentration of compound whose absorbance was comparable with the negative control wells (broth only or broth with drug, without inoculum). Results were expressed by means of four independent determinations. Reference agents in clinical use were also tested in order to check susceptibility of strains: amoxicillin, ampicillin, oxacillin, penicillin G, ticarcillin and vancomycin.

2.4. Cell lines and cell culture

Human keratinocytes (Fusenig and Boukamp, 1998) were kindly provided by Pierre Fabre Institute (Toulouse, France) and human pulmonary embryonic fibroblasts were obtained from BioMerieux (Lyon, France). Cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, 61965, Invitrogen, France) for HaCaT and in modified Eagle's medium (MEM, 41090, Invitrogen, France) for MRC-5 supplemented with 10% decomplemented foetal bovine

serum (FBS, 10270, Lot 40Q5150K, Invitrogen, France) without antibiotics at 37 °C, 5% CO_2, under a humid atmosphere. HaCaT or MRC-5 cells were plated at 10^4 cells/well in 96-well plates (831835, Sarstedt, France). Forty-eight hours after plating, the growth medium was removed and replaced with the test solutions (100 L). After 24, 48 and 168 h exposure, viability and cytotoxicity tests were performed.

2.5. MTT assay

Viability tests were carried out using a commercially available cell proliferation reagent [3-(4,5-dimethylthiazolyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT) (135038, Sigma, France) as described previously (Mosmann, 1983; Grare et al., 2007). The assay is based on the cleavage of the tetrazolium salt MTT by active mitochondrial dehydrogenases to produce an insoluble purple formazan salt. Since this conversion only occurs with viable cells, it directly correlates with cell count. Experiments were performed in 100 L of medium in flat-bottom 96-well plates (831835, Sarstedt, France). After 24, 48 and 168 h of incubation, stock MTT solution (5 mg/mL MTT in PBS) was added (10 L per well) and plates were incubated in a humidified atmosphere with 5% CO_2 at 37 °C for 4 h. Then, insoluble purple formazan was dissolved by adding 100 L sodium dodecyl sulfate (SDS, L-5750, Sigma, France) (0.1 g/mL SDS in PBS, with 445 L HCl 0.01 M) to each well, and incubated for 4 h more. The absorbance at $A_{540\,nm}$ was measured with a reference wavelength of $A_{690\,nm}$, using an ELISA reader (Multiskan EX, Thermo Electron Corporation, France). Eight wells per dose and time point were counted in three different experiments.

2.6. Neutral red assay

The cytotoxicity assay was based on the incorporation of the supravital dye, neutral red [3-amino-7-(dimethylamino)-2-methylphenazine hydrochloride] (113K0792, Sigma, France) into the lysosomes of viable cells after incubation with drugs. The amount of dye, after extraction from the lysosomes, is quantified spectrophotometrically and compared with neutral red recovered from untreated control cultures. The test was performed as described previously (Borenfreund and Puerner, 1985; Grare et al., 2007). Experiments were performed in 100 L of medium in flat-bottom 96-well plates (831835, Sarstedt, France).

After 24, 48 and 168 h of incubation, the medium was removed and cells were washed once with PBS; then 200 L MEM were added without phenol red (MEM, 51200, Invitrogen, France) containing 50 g/mL neutral red for an additional incubation time of 3 h. Then, cultures were rinsed three times with PBS. To quantify the dye storage inside the cellular lysosomes, cells were lysed (in order to extract the dye from viable cells) by adding 200 L of a 1%(v/v) acetic acid and 50%(v/v) ethanol solution. After an incubation of 20 min in a humidified atmosphere with 5%CO_2 at 37 °C, the amount of neutral red released was estimated by scanning with an ELISA reader (Multiskan EX, Thermo Electron Corporation, France) at a wavelength of 540 nm. Eight wells per dose and time point were counted in three different experiments.

Table 1
MICs (mg/L) obtained by broth microdilution method, according to CLSI and CA-SFM guidelines.

MIC (mg/L)	UA	OA	BA	ATB
Reference strains				
Escherichia coli ATCC 25922	>256	>256	>256	4[a]
Staphylococcus aureus ATCC 25923	8	64	>256	<1[b]
Staphylococcus aureus ATCC 29213	8	32	>256	<1[b]
Enterococcus faecalis ATCC 29212	4	8	>256	<1[c]
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	256	256	256	16[d]
Clinical isolates				
Penicillinase-producing Escherichia coli	>256	>256	>256	>256[a]
MRSA (mecA gene)	>256	>256	>256	256[b]
Enterococcus faecium (vanB gene)	256	>256	>256	64[c]
Enterococcus faecalis (vanA gene)	256	>256	>256	256[c]
Pseudomonas aeruginosa (overexpression of efflux pumps)	>256	>256	>256	64[d]

MICs values are representative of three independent determinations. UA: ursolic acid; OA: oleanolic acid; BA: betulinic acid; ATB: reference antibiotics, a: amoxicillin; b: oxacillin; c: vancomycin; d: ticarcillin. Values in bold are of therapeutical interest.

3. Results

MIC values are listed in Table 1. Considering our experimental conditions, we did not demonstrate any antibacterial activity for BA (MIC≥ 256 mg/L). UA as well as OA showed a quiet similar antibacterial spectrum only expressed against Gram-positive bacteria: 4 mg/L against Enterococcus faecalis, and 8 mg/L against both strains of Staphylococcus aureus, for UA; 8 mg/L against Enterococcus faecalis, 32 mg/L Staphylococcus aureus ATCC 29213 and 64 mg/L against Staphylococcus aureus ATCC 25923, for OA. Both compounds, UA and OA, were devoid of activity against Gram-negative bacteria (≥ 256 mg/L, for Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa).

For clinical isolates (Table 1), MICs obtained for the three compounds were ≥ 256 mg/L, whatever the considered bacterial strains (Gram-positive as well as Gram-negative bacteria), or the mechanism of resistance.

Viability and cytotoxicity results are summarized in Table 2. When the viability and the cytotoxicity assays are compared, the IC_{50} and CC_{50} values obtained are in accordance. The results from the two assays indicate that there are no differences between the two cell lines in regards to their sensitivity to three compounds. After 24 h of treatment, IC_{50} values were contained between 15.1 mg/L on MRC-5 and 7.5 mg/L on HaCaT, for UA; 25.2 mg/L on MRC-5 and 52.4 mg/L on HaCaT, for OA. BA showed the higher cellular impact with an $IC_{50} \leq 1$ mg/L, on MRC-5, and contained between 1.4 mg/L on HaCaT.

On the basis of the MIC and IC_{50} values determined after 24 h of exposure, the SI (IC_{50}/MIC) was calculated (Table 3). SI values obtained with two cell lines (HaCaT and MRC-5) were in good agree-

Table 2
IC_{50} and CC_{50} values were determined from the data obtained with viability assay (MTT) and cytotoxicity assay (NR), respectively.

Time (h)	UA				OA				BA			
	IC_{50} (mg/L)		CC_{50} (mg/L)		IC_{50} (mg/L)		CC_{50} (mg/L)		IC_{50} (mg/L)		CC_{50} (mg/L)	
	HaCaT	MRC-5	HaCaT	MRC-5	HaCaT	MRC-5	HaCaT	MRC-5	HaCaT	MRC-5	HaCaT	MRC-5
24	7.5	15.1	3.9	8	52.4	25.2	23.9	31.9	1.4	1	4.4	4.5
48	6	11.2	2.9	5.6	44.1	24.7	32.9	30.8	1	<1	2.3	4
168	5.1	11.3	4.2	7.2	50.8	19.9	40.5	40.6	<1	<1	1<	2.73

HaCaT and MRC-5 cell lines were grown as adherent-culture in a 96-well microplate. Compounds were added at concentrations from 256 to 1 mg/L for 24, 48 and 168 h. IC_{50} and CC_{50} values are representative of three independent determinations. UA: ursolic acid; OA: oleanolic acid; BA: betulinic acid.

Table 3
Selectivity index (SI) obtained for five reference bacterial strains after 24 h exposure to three compounds, on MRC-5 or HaCaT cell lines.

Reference strains	UA		OA		BA	
	HaCaT	MRC5	HaCaT	MRC5	HaCaT	MRC5
Escherichia coli ATCC 25922	<0.03	0.06	<0.2	<0.09	<0.005	<0.004
Staphylococcus aureus ATCC 25923	0.9	1.9	0.8	0.4	<0.005	<0.004
Staphylococcus aureus ATCC 29213	0.9	1.9	1.6	0.8	<0.005	<0.004
Enterococcus faecalis ATCC 29212	1.9	3.8	6.6	3.2	<0.005	<0.004
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	0.03	0.06	0.2	0.09	0.005	0.004

UA: ursolic acid; OA: oleanolic acid; BA: betulinic acid.

ment. Unsurprisingly, due to its higher toxicity and its concomitant poor antibacterial activity, BA has the weaker SI (i.e., 0.005) for all bacterial strains, while UA and OA SI values were similar (≈ 1–2), as we determined a better MIC for UA, but conversely a better IC_{50} for OA (Table 3).

4. Discussion

In the last decade, many reports have tempted to demonstrate the potent antibacterial activities of terpenes, and more particularly UA, OA and BA (Cowan, 1999; Chattopadhyay et al., 2002; Chandramu et al., 2003; Horiuchi et al., 2007). In such studies, most of the researchers have evaluated first the antibacterial spectra of plant extracts; secondly they have determined the chemical composition of the extracts, and thirdly they have retroactively attributed such activity to such molecule (Cowan, 1999; Chattopadhyay et al., 2002; Chandramu et al., 2003; Horiuchi et al., 2007). As a result, we could not except that the measured antibacterial activity demonstrated by several authors was not due to a pure molecule but to a synergistic effect between different plant components (triterpenes, tannins, sterols, etc.). Authors came to the conclusion that those HPTAs have "good" to "moderate" antibacterial activities, excepting BA, which is systematically described as a very poor antibacterial agent, with MIC≥ 128 mg/L (Alakurtti et al., 2006). Finally, they speculated that such molecules could be of interest in antibacterial chemotherapy, despite the fact that such experiments were rarely performed on well-defined bacterial strains or bacterial strains of interest in Human Public Health, like for example NIs. But nowadays, firstly only one study has evaluated the antibacterial spectra of such molecules on antibiotic-resistant bacteria (Horiuchi et al., 2007); and secondly, no viability or cytotoxic in vitro studies were performed to evaluate the impact of such compounds on eukaryotic cells.

The aim of our work was to determine the potent antimicrobial activity of UA, OA and BA; as well as their possible use as new agent or as auxiliary in antimicrobial chemotherapy. Consequently, in order to investigate the antibacterial activity as well as the true interest in therapy of such compounds, we used (i) commercial molecules; (ii) "ATCC" bacterial strains as well as (iii) well-defined antibiotic-resistant bacterial strains, representative of those currently encounter during NI; and (iv) we performed viability (MTT) as well as cytotoxic (NR) assays and determined selectivity indexes.

First, considering ATCC strains, our results demonstrated that UA and OA showed a quiet similar antibacterial spectrum, only expressed against Gram-positive bacteria, with a better antibacterial activity for UA. We could therefore emphasize, like other authors, that the presence of an outer membrane in Gram-negative bacteria might be responsible of the effectiveness of UA and OA (Horiuchi et al., 2007). Under the same experimental conditions, it appeared that BA was devoid of any antibacterial activity (Table 1). Interestingly, we can notice that active compounds harboured a structural homology (i.e., same E cycle for UA and OA comparatively to BA). BA is an HPTAs of lupan type which is structurally quite similar of HTPAs hopan type. The biosynthesis and the presence of hopan type HPTAs in bacterial membranes are widely documented (Taylor, 1984); this could explain the lack of antibacterial activity for HPTAs of lupan type, like BA. It was of interest to evaluate others HTPAs of lupan type to confirm this hypothesis, this is under current investigation. Nevertheless, this can allow us to assume that the precise skeleton or structure of E cycle seems to be responsible of the antibacterial activity of UA and OA, as the difference between UA and OA only comes from the position of one methyl group on the E cycle.

Second, when antibacterial activity of these HPTAs was evaluated on clinical isolates, BA was still devoid of interest; but, intriguingly, UA and OA became inactive. Our results clearly demonstrated that UA and OA are ineffective against antibiotic-resistant isolates, especially methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and vancomycin-resistant enterococci (VRE). Hence, our results disagree with those from a previous study, who noticed that both UA and OA still remained active against antibiotic-resistant strains they tested (Horiuchi et al., 2007). It is however important to mention that (i) we used standardized CLSI protocol whereas there are some shadow zones in their protocol (e.g., bacteria were incubated at 32 °C, we have no information about the preparation of molecules which are not hydro-soluble, etc.); (ii) we tested both vanA and vanB clinical isolates (while they only used vanA Enteroccoccus spp.) and both were resistant to UA and OA; (iii) we also systematically compared antibacterial spectra on antibiotic-sensitive and -resistant bacteria, while they did not; it was therefore difficult to appreciate the antibacterial activity, if necessary; (iv) these authors noticed that they had discrepancies with previous study in which Kowalewski and colleagues failed to demonstrate any activity of UA on Enterococcus faecalis (Kowalewski et al., 1976). Horiuchi and colleagues concluded that such discrepancies "are due to differences in assay conditions and in strains used", hypothesis which we cannot evade (Horiuchi et al., 2007).

Third, we have also evaluated cellular impact of those compounds onto two eukaryotic cell lines (HaCaT and MRC-5) by using a MTT viability test as well as neutral red cytotoxicity test (Table 2), respectively. After 24 h of treatment, each HPTAs show IC_{50} and CC_{50} values of same rate of magnitude, on both cell lines. BA had the higher cellular impact, while OA and UA were less toxic, even if their impact on eukaryotic cell viability was far from being insignificant (Table 2). We can conclude that the use of such compounds, purified, is not harmless, in opposition to what had been previously suggested (Horiuchi et al., 2007).

Finally, we determinate selectivity indexes ($SI = IC_{50}/MIC$) for those drugs. Unsurprisingly, BA has the weaker SI (i.e., 0.005), while for UA and OA SI values were of the same kind (i.e., ≈ 1–2), as we determined better MIC values for UA (Table 3), but conversely better IC_{50} values for OA. In conclusion, we can assume that these compounds are of limited interest as antibacterial agents in topical or internally use in a modern therapy context. But we could not expect (i) a possible topical use, and (ii) above all a synergistic effect between HPTAs and others herbals substances, which could explain antibacterial activity demonstrated for plant extract by numerous authors (Cowan, 1999; Chattopadhyay et al., 2002;

Chandramu et al., 2003). It would therefore be interesting to directly test plant extracts with the same bacterial strains that we have used in order to determine antibacterial activity as well as cellular impact (i.e., viability and cytotoxicity) and define the real interest of such ethnopharmacology approaches in the treatment of bacterial infections.

Acknowledgments

We are grateful to the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and CNRS for financial support. The authors thank Pr. A. Lozniewski for reference strains and clinical isolates (Bacteriology Laboratory, CHU Nancy, France).

References

Alakurtti, S., Mäkelä, T., Koskimies, S., Yli-Kauhaluoma, J., 2006. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. European Journal of Pharmaceutical Sciences 29, 1–13.

Becker, H., Scher, J.M., Speakman, J.B., Zapp, J., 2005. Bioactivity guided isolation of antimicrobial compounds from Lythrum salicaria. Fitoterapia 76, 580–584.

Borenfreund, E., Puerner, J.A., 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Letters 24, 119–124.

CA-SFM, Communiqué 2008 (Edition janvier 2008). http://www.sfm.asso.fr/publi/general.php?pa=1.

Chandramu, C., Manohar, R.D., Krupadanam, D.G., Dashavantha, R.V., 2003. Isolation, characterization and biological activity of betulinic acid and ursolic acid from Vitex negundo L. Phytotherapy Research 17, 129–134.

Chattopadhyay, D., Arunachalam, G., Mandal, A.B., Sur, T.K., Mandal, S.C., Bhattacharya, S.K., 2002. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: Mallotus peltatus leaf extract. Journal of Ethnopharmacology 82, 229–237.

Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews 12, 564–582.

Djoukeng, J.D., Abou-Mansour, E., Tabacchi, R., Tapondjou, A.L., Bouda, H., Lontsi, D., 2005. Antibacterial triterpenes from Syzygium guineense (Myrtaceae). Journal of Ethnopharmacology 101, 283–286.

European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). Annual Report 2004. Data summary from January 1999 through December 2005, issued October 2006. http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%202005_tcm61-34899.pdf.

Fusenig, N.E., Boukamp, P., 1998. Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. Molecular Carcinogenesis 23, 144–158.

Grare, M., Mourer, M., Fontanay, S., Regnouf-de-Vains, J.B., Finance, C., Duval, R.E., 2007. In vitro activity of par-guanidinoethylcalix[4]arene against susceptible and antibiotic-resistant Gram-negative and Gram-positive bacteria. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 60, 575–581.

Horiuchi, K., Shiota, S., Hatano, T., Yoshida, T., Kuroda, T., Tsuchiya, T., 2007. Antimicrobial activity of oleanolic acid from Salvia officinalis and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). Biological and Pharmaceutical Bulletin 30, 1147–1149.

Japanese Nosocomial Infection Surveillance (JANIS) System. The 2005 Report of Health and Labour Sciences Research Grant. http://idsc.nih.go.jp/index.html.

Kowalewski, Z., Kortus, M., Kedzia, W., Koniar, H., 1976. Antibiotic action of beta-ursolic acid. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warszawa) 24, 115–119.

Kuete, V., Wabo, G.F., Ngameni, B., Mbaveng, A.T., Metuno, R., Etoa, F.X., Ngadjui, B.T., Beng, V.P., Meyer, J.J., Lall, N., 2007a. Antimicrobial activity of the methanolic extract, fractions and compounds from the stem bark of Irvingia gabonensis (Ixonanthaceae). Journal of Ethnopharmacology 114, 54–60.

Kuete, V., Eyong, K.O., Folefoc, G.N., Beng, V.P., Hussain, H., Krohn, K., Nkengfack, A.E., 2007b. Antimicrobial activity of the methanolic extract and of the chemical constituents isolated from Newbouldia laevis. Pharmazie 62, 552–556.

Lepoutre, A., Branger, B., Garreau, N., Boulétreau, A., Ayzac, L., Carbonne, A., Maugat, S., Gayet, S., Hommel, C., Parneix, P., Tran, B., 2004. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales en France (2001) reported through the Réseau National de Surveillance et d'Investigation des Infections Nosocomiales (RAISIN). Institut de Veille Sanitaire (InVS). http://www.invs.sante.fr/publications/2005/snmi/pdf/infections_noso_enquete.pdf.

Liu, J., 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. Journal of Ethnopharmacology 49, 57–68.

Liu, J., 2005. Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. Journal of Ethnopharmacology 100, 92–94.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods 65, 55–63.

National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard M7-A6. NCCLS, Wayne, PA, USA.

National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, 2004. Data summary from January 1992 through June 2004. American Journal of Infection Control 32, 470–485.

Taylor, R.F., 1984. Bacterial triterpenoids. Microbiological Reviews 48, 181–198.

Yogeeswari, P., Sriram, D., 2005. Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. Current Medicinal Chemistry 12, 657–666.

Article 2 :

A new Sephadex™-based method for removing microbicidal and cytotoxic residues when testing antiseptics against viruses: Experiments with a human coronavirus as a model.

Journal of Virological Methods 159 (2009) 217–226

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Virological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jviromet

A new Sephadex™-based method for removing microbicidal and cytotoxic residues when testing antiseptics against viruses: Experiments with a human coronavirus as a model

Chloé Geller, Stéphane Fontanay, Chantal Finance, Raphaël E. Duval *

SRSMC, Nancy-University, CNRS, Nancy, France

Article history:
Received 18 December 2008
Received in revised form 23 March 2009
Accepted 25 March 2009
Available online 5 April 2009

Keywords:
Antiseptic evaluation
Sephadex™
Gel filtration
Human coronavirus
Chlorhexidine
Hexamidine

A B S T R A C T

The relative lack of efficient methods for evaluating antiseptic antiviral activity, together with weaknesses in the existing European Standard (i.e. NF EN 14476+A1), underlines the need to seek a new method which could allow a more precise evaluation of the antiseptic antiviral activity of chemical agents.

This protocol is based on an original gel-based filtration method, using "in-house" G-25 and G-10 Sephadex™ columns. This method allows the neutralization of both the activity and the cytotoxicity of a large range of molecules, according to their molecular size, in only 1 min.

The viral model used was the human coronavirus (HCoV) 229E chosen for (i) its increasing medical interest, (ii) its potential resistance and (iii) its representing enveloped viruses mentioned in the European Standard.

First, the protocol was validated and it was demonstrated that it was fully operational for evaluating antiviral antiseptic potentiality and useful to screen potentially antiseptic molecules.

Second, chlorhexidine (CHX) and hexamidine (HXM) were assessed for their potential anti-HCoV 229E antiseptic activities. It was demonstrated clearly that (i) HXM had no activity on the HCoV 229E and (ii) CHX showed a moderate anti-HCoV 229E activity but insufficient to be antiseptic.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Antiviral antisepsis and disinfection are crucial for preventing the environmental spread of viral infections. Indeed, very few efficient and specific treatments are available to control most of these infections. Furthermore, emerging viruses and associated diseases as well as nosocomial viral infections have become an important issue in medical fields.

The *Coronaviridae* family, an enveloped RNA virus family, is a representative example of this issue. Since the 1960s, only two human pathogen members of this family have been identified: the *Human coronavirus*, strain 229E (HCoV 229E) and the *Human coronavirus*, strain OC43 (HCoV OC43). Known to be responsible for a large proportion of common colds (Hamre and Procknow, 1966; Holmes, 2001; Larson et al., 1980), they have been implicated in more serious diseases, along with the newly identified HCoV: the NL63 strain (Van der Hoek et al., 2004) and the HKU1 strain (Woo et al., 2005). Indeed, these viruses have been recognized as causing lower respiratory tract infections, (Vabret et al., 2003; Van Elden et al., 2004). They have also been involved in nosocomial viral infections, especially in young children and neonates (Gagneur et al., 2002a,b; Moes et al., 2005; Vabret et al., 2008), in the elderly (Falsey et al., 2002; Nicholson et al., 1997) and in immunocompromised patients (Pene et al., 2003).

Furthermore, the outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS) in 2002–2003, responsible for the first worldwide epidemic of the 21st century, was due to a newly discovered coronavirus, the SARS associated coronavirus (SARS-CoV) (Drosten et al., 2003; Ksiazek et al., 2003; Peiris et al., 2003). This outbreak led to a new awareness of the medical importance of the *Coronaviridae* family.

Another interesting feature of coronaviruses is their potential environmental resistance, despite the accepted fragility of enveloped viruses. Indeed, a HCoV 229E survival of 70% after 72 h at 20 °C and 50% relative humidity has been observed, as well as

Abbreviations: ATS–D, antiseptics–disinfectants; BSA, bovine serum albumin; CC_{50}, 50% cytotoxic concentration; $CCID_{50}$, 50% cell culture infective dose; CHX, chlorhexidine; CPE, cytopathic effect; EBSS, Earle's balanced salt solution; EDTA, ethylene diamine tetracetic acid; FCS, fetal calf serum; FW, formula weight; HCoV, human coronavirus; HXM, hexamidine; IC_{50}, 50% inhibitory concentration; MEM, minimum essential medium; MTT, methyl thiazol tetrazolium; NR, neutral red; PBS, phosphate buffered saline; SARS-CoV, severe acute respiratory syndrome associated coronavirus; TB, trypan blue.

* Corresponding author at: Groupe d'Etude des Vecteurs Supramoléculaires du Médicament (GEVSM), SRSMC, Nancy-University, CNRS, Faculté de Pharmacie, 5 rue Albert Lebrun, BP 80403, 54001 Nancy Cedex, France. Tel.: +33 3 83 68 23 36; fax: +33 3 83 68 23 57.
E-mail address: raphael.duval@pharma.uhp-nancy.fr (R.E. Duval).

0166-0934/$ – see front matter © 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jviromet.2009.03.023

a HCoV 229E survival of 90% at 6 °C and a relative humidity ≥50%, which could account for airborne transmission and for winter epidemics of HCoV 229E, respectively (Ijaz et al., 1985). Another study showed 30% and 50% of virus residual infectivity for the HCoV 229E and the HCoV OC43, respectively, after 6 days in suspension in phosphate buffered saline (PBS) at 37 °C and 30% of residual HCoV 229E infectivity after 3 h of drying on different supports found in hospital settings, i.e. aluminium, sterile sponges or latex surgical gloves (Sizun et al., 2000). More recently, numerous studies have underlined an important SARS-CoV survival under various conditions: in serum, in 1:20 diluted sputum, in faeces for at least 96 h and in urine for at least 72 h. SARS-CoV also retained infectivity at 4 °C, at room temperature and at 37 °C for at least 2 h (Duan et al., 2003; Rabenau et al., 2005). Furthermore, some studies have shown the transfer of viruses from contaminated hosts (hands, nasal mucosa) to surfaces and from environmental surfaces to hands and therefore a potential contamination of susceptible hosts (Sattar et al., 1993; Winther et al., 2007). Another study has also shown a longer survival of a herpesvirus on human skin than on an inanimate carrier (i.e. a stainless steel disk) (Graham et al., 1996). Thus, considering the potential resistance of HCoV for some hours in the environment, their pathogenesis and the absence of specific treatment, an efficient skin antisepsis, to stop eventual dissemination by the hands of healthcare workers, is a meaningful way to fight virus transmission and associated diseases.

A fundamental point is to evaluate the efficiency of antiseptics–disinfectants (ATS-D) on viruses properly. The principle of antiseptic antiviral activity evaluation is (i) to collect viruses and the product under test for an appropriately defined and precise contact time, (ii) to neutralize product activity, i.e. stopping product activity and removing its potential cytotoxicity, and (iii) to estimate the loss of viral infectivity due to the product activity. These tests require appropriate controls especially to check the absence of interference due to the test itself on viral infectivity, the efficiency of neutralization, the removal of cytotoxicity, and also, to establish reproducible and well defined conditions, e.g. contact time, temperature, interfering substances (Fig. 1).

To date, only one European Standard (NF EN 14476+A1) on virucidal ATS-D activity testing in human Medicine was published in January 2007 (AFNOR, 2007). It specifies the test method and minimum requirements to establish virucidal activity according to the potential use of the products tested, e.g. disinfection of surfaces and instruments, hygienic hand wash or thermo-chemical disinfection. Virus strains, temperatures, contact times, interfering substances are specified for each potential use. According to this standard, a product is considered to have an ATS-D antiviral activity if it induces a loss of infectivity of at least 4 $\log_{10}$ in viral titers during an accurate contact time.

Some parameters need to be extended to improve antiviral ATS-D activity testing. For instance, one proposed method in the European Standard to neutralize product activity is a 1:10 dilution of product/virus mix in iced medium. However, considering the very large range of ATS-D nature (single molecules or a mixture of different ones), this method is not always reliable and furthermore, it may lengthen contact time. The European Standard suggests other methods, based on gel-filtration techniques, using products as Sephadex™ LH-20, Microspin™ columns S400HR or Minicon® concentrators, but they lead to problems of contact times, separation capacity and cost (supplementary data, Fig. 1).

With these aims in mind, a protocol was developed that allows neutralization, in only 1 min, of the activity and cytotoxicity of a large range of molecules, according to their molecular size. This procedure also involves a gel-filtration-based method but uses 2 other types of Sephadex™ gels: Sephadex™ G-10 and G-25. Their retention capacities are [100–1000] g mol^{-1} and [900–5000] g mol^{-1}, respectively, which is consistent with the molecular mass of most ATS-D (supplementary data, Fig. 1B). To validate this protocol and establish its potential limits, antiseptic antiviral activities of two ATS-D, the chlorhexidine (CHX) and the hexamidine (HXM), were tested on HCoV 229E.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and disposable materials

Minimum essential medium (MEM; 41090.093, fetal calf serum (FCS; 10270098), trypsine-EDTA (25300-054), Earle's balanced salt solution (EBSS; 24010043), trypan blue (TB; 15250-061) and MEM without glutamine and without phenol red (51200-046) were purchased at Invitrogen (Cergy Pontoise, France). For culturing cells, 75 cm^2 cell culture flasks (831813) and 96-well flat-bottom culture plates (831835) were purchased at Sarstedt (Marnay, France). May-Grünwald solution (1014240500) and Giemsa solution (1092040500) were bought from Merck (Darmstadt, Germany). Chemicals as dimethylsulfoxyde (D2438), neutral red (NR; N4638), sodium dodecyl sulfate (S9625) and formaldehyde at 36.5% (v/v) (533998) were bought at Sigma (Saint Quentin Fallavier, France); calcium chloride ($CaCl_2$, 33604.261) at Prolabo, (Fontenay sous Bois, France) and acetic acid (45726) at Fluka biochemical (Saint Quentin Fallavier, France). One milliliter syringes (300013) were from Becton Dickinson (Le Pont de Claix, France) and 0.22 μm filters (SLGP033RS) from Millipore Express (Saint Quentin en Yvelines, France). Sephadex™ G-25 and the Sephadex™ G-10 (17-0010-01 and 17-0033-01, respectively) were purchased at GE Healthcare (Saclay, France). Finally, CHX digluconate and HXM diisethionate were kindly provided by J.-B. Regnouf-de-Vains (SRSMC, Nancy-University, France).

2.2. Cell culture and virus

Human embryonic pulmonary epithelial cells, L-132 cells (ATCC CCL-5), kindly provided by Dr H.F. Hildebrand (Faculty of Medicine, Lille, France), were grown in MEM supplemented with 5% of FCS, at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2. They were split 2–3 times a week. Cells, grown in 75 cm^2 cell culture flasks were washed 3 times with Phosphate Buffered Saline (PBS) and 0.5 mL of trypsine-EDTA was added. Flasks were incubated for a few minutes at 37 °C with 5% CO_2 and 4.5 mL of MEM 5% FCS were added to achieve cell dissociation. Stock cells were prepared with the cellular suspension obtained after trypsinization and mixed with MEM containing 10% (v/v) FCS and 10% (v/v) dimethylsulfoxyde. They were then aliquoted and conserved at −196 °C in liquid nitrogen.

Human coronavirus, strain 229E (ATCC VR 740), kindly provided by Dr. S.A. Sattar (Faculty of Medicine, Ottawa, Canada) was cultivated on L-132 cells, in MEM supplemented with 2% FCS, at 33 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2. 33 °C has been shown to be the optimal growth temperature for the HCoV 229E (Bradburne, 1972). Stock viruses were prepared by infection of 75 cm^2 cell culture flasks with a confluent monolayer of L-132 cells, not much older than 3 days. When confluence was reached, medium was removed and cells were washed 3 times with PBS. Cells were then inoculated with 1 mL of stock virus suspension diluted at 1:5 in EBSS and incubated for adsorption virus time (i.e. 1 h), at 33 °C with 5% CO_2. Culture flasks were then filled out with 11 mL of MEM 2% FCS and re-incubated at 33 °C with 5% CO_2 for 48 h, before the cytopathic effect (CPE, i.e. cell lysis), was completely achieved. Three cycles of freezing/thawing of 15 min each were performed in order to liberate virions. Media were centrifuged at 2000 × *g* for 5 min to eliminate cellular fragments and, supernatants containing viruses were aliquoted in cryotubes and conserved at −80 °C.

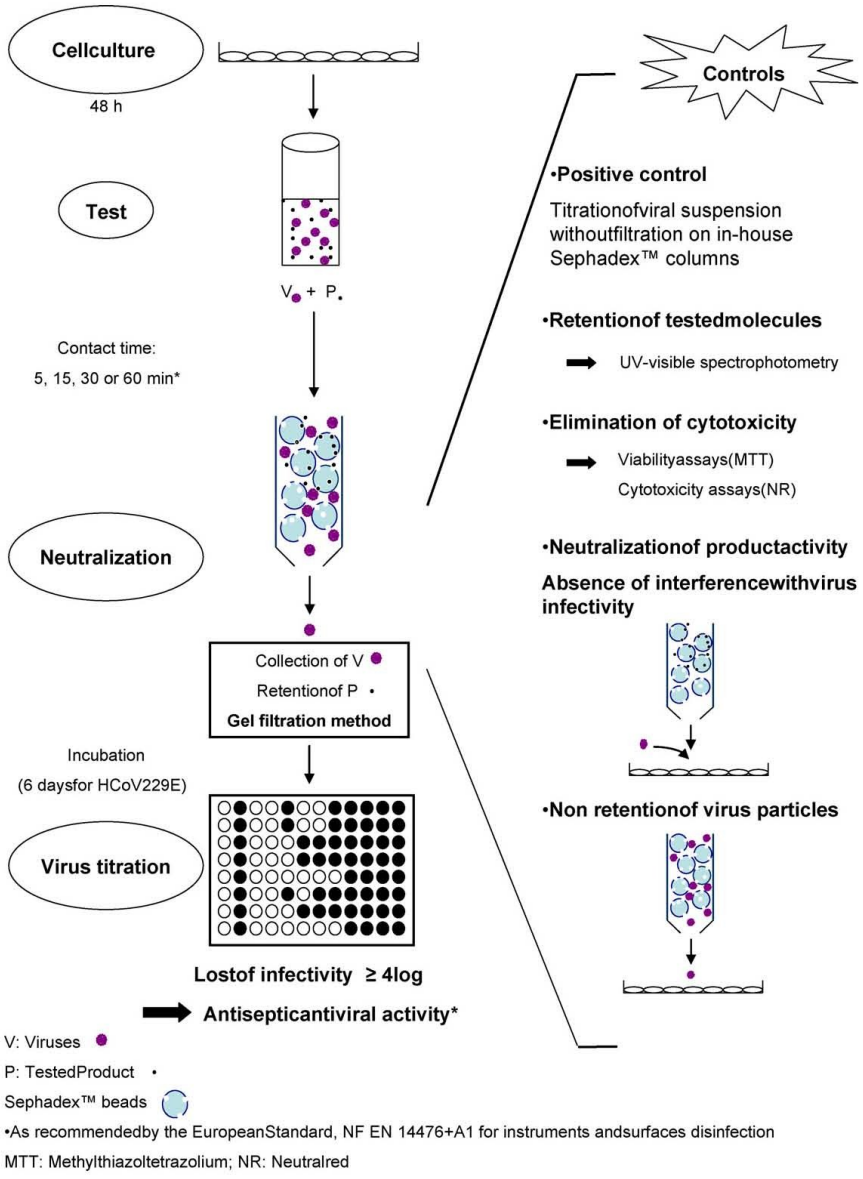


Fig. 1. Principle of the evaluation of antiviral antiseptic activity.

2.3. End point dilution method for virus titration

L-132 cells were seeded at 5×10^3 cells/well in 96-well flat-bottom culture in MEM 5% FCS. Cell counts were performed with the TB exclusion method. Cells were incubated at 37 °C in 5% CO_2, for 48 h to obtain a confluent monolayer. After removing medium, 180 μL of fresh MEM 2% FCS were added to each well. Cells were then infected at a multiplicity of 0.2, and 10-fold serial dilutions were carried out. Infected cells were incubated at 33 °C in 5% CO_2 for 6 days to obtain the optimal CPE. At the end of the incubation period, cells were fixed and stained with May-Grünwald and Giemsa. Fifty microliters/well of May-Grünwald solution were allowed to fix and stain cells for 5 min and after a washing step with tap water, 50 μL/well of Giemsa solution were added for 15 min to achieve the final staining before a last washing step with tap water. Infected wells were counted under a phase-contrast inverted microscope (Olympus, Rungis, France) and viral titers or 50% cell culture infective dose ($CCID_{50}$), expressed as viral infectious particles mL^{-1}, were estimated according to the Reed and Muench method (Reed and Muench, 1938).

2.4. Molecules tested

All molecules tested were prepared, extemporaneously, as aqueous solutions and filter-sterilized on 0.22 μm filters.

2.4.1. Chlorhexidine

Chlorhexidine (CHX) is a bisbiguanide, used widely as antiseptic and disinfectant. It has been used at concentrations from 0.05% (m/v), i.e. 5.6×10^{-4} mol L^{-1}, in aqueous solutions for skin damage disinfection to 0.5% (m/v), i.e. 5.6×10^{-3} mol L^{-1}, in alcoholic solutions for pre-operative skin disinfection. A CHX salt, the CHX digluconate, was used because of its greater water solubility and its commercial use under this form. Its molecular weight is 897.80 g mol^{-1}. The aqueous solution is colourless.

2.4.2. Hexamidine

Hexamidine (HXM) is also used widely for skin disinfection and external use. It belongs to the aromatic diamidine group. HXM is insoluble in water; therefore a HXM diisethionate salt solution, of which the water solubility limit is 55 g L^{-1} (Fleurette, 1995), is also used in commercial formulations as in this study. In commercial formulations, HXM is used at 0.1% (m/v), i.e. 1.6×10^{-3} mol L^{-1}, or at 0.15% (m/v), i.e. 2.4×10^{-3} mol L^{-1}. Its molecular weight is 606.72 g mol^{-1}. The aqueous solution is colourless.

2.5. Cytotoxicity and viability tests

MTT viability assays and NR cytotoxicity assays were carried out to evaluate the cellular impact of molecules tested on L-132 cells. In both assays, L-132 cells were seeded into 96-well culture plates in MEM with 5% FCS. They were incubated at 37 °C with 5% CO_2 for 48 h prior to the addition of the appropriate dilutions of the product to be tested and then re-incubated for 24 h, 48 h and 168 h.

For MTT tests, a modified Mosmann's protocol was used (Mosmann, 1983). After medium removal, 100 μL/well of PBS and 10 μL of MTT solution at 5 mg mL^{-1} in PBS were added. After 4 h of incubation at 37 °C in 5% CO_2, 100 μL of sodium dodecyl sulfate were added to dissolve formazan dark blue crystals produced by reduction of MTT by succinate mitochondrial deshydrogenase. Plates were re-incubated for 4 h and measurements were performed with a scanning multiwell spectrophotometer (ELISA reader, Multiscan EX, Thermo Fisher Scientific, Saint Herblain, France) using a test wavelength of 540 nm and a reference wavelength of 690 nm. Cell viability was validated, which is proportional to the produced quantity of formazan crystals and expressed as 50% inhibitory concentration (IC_{50}, mol L^{-1}).

NR assays were performed according to a modified Borenfreund's protocol (Borenfreund and Puerner, 1985). An aqueous stock solution at 4 mg mL^{-1} of NR, subjected to a centrifugation at 405 × *g* for 10 min to eliminate eventual aggregates, was prepared. For the assay, a "ready to use" solution of NR at 50 μg mL^{-1} in MEM without glutamine and without phenol red was prepared extemporaneously to avoid fine precipitates which could form when NR is mixed with medium. After medium removal, cells were rinsed with 200 μL of PBS/well prior to the addition of 200 μL/well of "use" NR solution. Plates were re-incubated for 3 h at 37 °C in 5% CO_2 to allow the uptake of the dye by living cells. The dye-medium was then taken off and cells were washed with 200 μL/well of "A" solution ["A" solution: 4% (v/v) formaldehyde at 36.5% (v/v), 1% (m/v) $CaCl_2$ in distilled water]. To release NR accumulated in lysosomes of living cells, 200 μL/well of "B" solution were added ["B" solution: 1% (v/v) acetic acid, 50% (v/v) absolute ethanol in distilled water]. The quantity of NR released was estimated by spectrophotometric measurement at 540 nm in a scanning multiwell spectrophotometer. It was proportional to the cytotoxicity of molecules tested and expressed as 50% cytotoxic concentration (CC_{50}, mol L^{-1}).

These tests were also performed with solutions of CHX and HXM at various concentrations and after their filtration on the "in-house" Sephadex™ columns to evaluate their retention and the elimination of potential cytotoxicity.

2.6. Evaluation of antiviral antiseptic activity

2.6.1. Preparation of Sephadex™ media

Sephadex™ media are a range of cross-linked dextran gels of variable porosity according to the degree of cross-linking. This property, based on the principle of exclusion-diffusion, allows the separation of different molecules according to their molecular size. They are manufactured in a bead form and need to be suspended in a buffer. Two different kinds of Sephadex™ were used in this protocol, the Sephadex™ G-25 and the Sephadex™ G-10, which have resolution capacities of 900–5000 g mol^{-1} and 100–1000 g mol^{-1}, respectively.

According to the manufacturer's instructions, Sephadex™ G-10 and G-25 should be suspended for minimum 3 h at room temperature, in at least 20 times their volume in PBS (i.e. about 30 g L^{-1}), to equilibrate the pH at 7 and to allow the gel to swell. Suspensions were sterilized by autoclaving and excess of PBS was eliminated to obtain a suspension with a volume ratio of Sephadex™/PBS of 1/1.

2.6.2. Preparation of the "in-house" Sephadex™ columns

Columns were made up with a 1 mL syringe, stuffed with carded cotton, associated with a drilled Eppendorf type 1.5 mL microtube; each part was sterilized by autoclaving. The body of the syringe was filled with 1 mL of sterile Sephadex™ gel, prepared as described above. The system with the syringe and the Eppendorf tube was placed into a 50 mL conic bottom centrifuge tube to conserve sterility and centrifuged at 4500 × *g* for 1 min. The definitive "in-house" Sephadex™ column was then ready (supplementary data, Fig. 2).

2.6.3. Assay for antiviral antiseptic activity

Ninety-six-well flat bottom culture plates were seeded at 5×10^3 cells/well in MEM 5% FCS and incubated at 37 °C in humidified atmosphere with 5% CO_2 for 48 h to obtain a confluent monolayer.

After 2 days of incubation, the appropriate dilution of the product to be tested was prepared in distilled water and filter-sterilized on a 0.22 μm filter.

Viral suspensions of HCoV 229E were allowed to thaw; 200 μL were mixed with 1.8 mL of the diluted product and allowed to stay in contact for the desired contact time. To separate viruses and the product, 500 μL of this mixture were placed into the "in-house" Sephadex™ column, 30 s before the end of the contact time, to leave sufficient time to centrifuge. The system was placed in a 50 mL centrifuge tube to maintain sterility and centrifuged at 405 × *g* for 1 min. This centrifugation retained the product according to its molecular size and the kind of Sephadex™ used and to recover viruses in the filtrates. Viral titers were then evaluated with the end point dilution method (Section 2.3). The potential loss of HCoV infectivity was estimated by the difference between viral titer of positive control, which was also subjected to filtration on the "in-house" Sephadex™ columns but without the presence of the product; and viral titer obtained after contact with the product tested for desired contact time and neutralization by filtration on the "in-house" Sephadex™ columns.

2.6.4. Control experiments

Three types of controls were performed in each experiment to validate the results: (i) non-retention of viruses after filtration on Sephadex™ columns, (ii) neutralization of the potential antiviral activity of the product tested, and (iii) elimination of its cytotoxicity. As the European Standard (NF EN 14476+A1) states, the difference in

viral titer before and after treatment, (i.e. in this case, gel filtration), without product tested, should not excess 0.5 $\log_{10}$. To assess the non-retention of viruses, e.g. HCoV 229E, viral suspensions were mixed with sterile distilled water for the contact time defined for the experiment, filtered on the "in-house" Sephadex™ columns and titrated as describe above (Section 2.3).

Neutralization assays were performed by filtration of 500 μL of the solution to be tested on the "in-house" Sephadex™ columns and 180 μL of the filtrates were mixed with 20 μL of viral suspension. This mixture was then inoculated to the L-132 cells monolayers. The viral titer obtained should be equivalent to viral titer without filtration (i.e. a $\log_{10}$ difference $\leq$0.5), since the product should be retained in the column. This experiment also verified that filtrates did not have any influence on virus infectivity.

Cytotoxicity controls were also carried out for each experiment, as a complement to MTT and NR assays undertaken previously. These controls were performed by filtration of 500 μL of the product tested and then filtrates were inoculated on L-132 cells. After 6 days of incubation, cells monolayers were observed under an inverted microscope and any sign of cytotoxicity should be visible.

2.7. UV-spectrophotometry

Retention of the molecules tested by the "in-house" Sephadex™ columns was also confirmed by UV–visible spectrophotometry. The range of dilutions was assayed to establish specific spectrophotometric parameters: maximum absorption wavelength λ_{max}, molar absorption coefficient ε and detection limits, for each molecule.

Dilutions were prepared in distilled water to mimic the test conditions. Spectra were performed on a UV–visible spectrophotometer (UVmc2, Safas, Monaco) within a 180–640 nm window. Calibration curves ($A\lambda_{max} = f(c)$) were established to determine the molar absorption coefficient (ε) for each molecule. Different dilutions of products tested were prepared in distilled water and filtered through the "in-house" Sephadex™ columns. Their absorbances were then measured at λ_{max} to determine the residual concentration.

2.8. Statistical analysis

To validate this process, statistical analysis of the different steps was undertaken using Statview® Version 5.0. For all tests, the maximum acceptable risk was 5%. To assess homogeneity of columns, i.e. volumes of gel after the first centrifugation and volumes of filtrate after the second centrifugation, Kolmogorov–Smirnov tests were used to assure distribution normality of each independent tested batch, and then Bartlett's tests were used to compare variances. In case of variances in homogeneity, an ANOVA test was used to compare means of the different batches; in case of non-homogeneity of variances, a non-parametric test of Kruskall–Wallis was used to compare averages. Finally, correlation studies, using a Fisher transformation, were realised to estimate whether there was an association gel volumes and either filtrates volumes or residual concentrations after filtration on Sephadex™.

For UV-spectrophotometry, regression analysis ($A = f(c)$) was carried out to establish specific spectrophotometric parameters of each molecule tested.

3. Results

3.1. Validation of the protocol for antiseptic antiviral activity testing

3.1.1. Reproducibility of the "in-house" Sephadex™ column fabrication and retention of dye molecules

As specified in Section 2.6.2, two centrifugation steps were needed: (i) to prepare optimized columns of 0.5 mL of gel, whether for Sephadex™ G-25 or Sephadex™ G-10 and (ii) to filter the drug-virus mixture to achieve the neutralization step with retention of molecules tested, non-retention of viruses and homogeneous quantity of filtrates. Different speeds and times of centrifugation were then tested and best parameters were determined: 1 min at 4500 × *g* for the first centrifugation and 1 min at 405 × *g* for the second centrifugation.

The homogeneity of (i) gel volumes obtained after the first centrifugation and (ii) filtrate volumes obtained after the second centrifugation; was first established on 4 independent batches of

Table 1
UV–visible spectrophotometric parameters of molecules tested and retention rates. Molecules tested were suspended in sterile distilled water (pH 7). Calibration curves were established for each molecule on a UV–visible spectrophotometer within a 180–640 nm wavelength window. The concentrations tested ranged from 10^{-7} mol L^{-1} to 10^{-2} mol L^{-1} except for trypan blue (TB) and neutral red (NR) for which concentrations ranged from 10^{-7} mol L^{-1} to 4.1×10^{-4} mol L^{-1} and from 5×10^{-4} mol L^{-1} to 5×10^{-4} mol L^{-1}, respectively. Regression analyses were then performed to determine specific spectrophotometric parameters: (i) linearity limits (mol L^{-1}), (ii) minimum detection limits (mol L^{-1}); within these limits, (iii) the specific maximal absorption wavelength (λ_{max}, nm) and (iv) the specific molar absorption coefficient (ε, L mol^{-1} cm^{-1}). Retention rates (see formula in Section 3.1.1) of each molecule by the specified type of Sephadex™ media are indicated, i.e. TB and chlorhexidine (CHX) Retention rates by Sephadex™ G-25; NR and hexamidine (HXM) Retention rates by Sephadex™ G-10. Ci corresponds to the initial concentration or concentration before filtration. Absorption wavelength used to estimate the retention rate is specified each time it was necessary.

Molecules tested	Specific spectrophometric parameters for each molecule tested				Retention rate	
	λ_{max} (nm)	ε (L cm^{-1} mol^{-1})	Linearity limits (mol L^{-1})	Detection limit (mol L^{-1})	Ci (mol L^{-1})	Retention rates (%)
Sephadex™ G-25						
TB	234	2.0×10^4	[2.5×10^{-6} to 10^{-4}]	5×10^{-7}	4.1×10^{-4}	589 nm: 95.11 ± 2.35 (n = 20)
	317	1.1×10^4	[2.5×10^{-6} to 10^{-4}]	7.5×10^{-7}	4.1×10^{-3}	589 nm: 92.06 ± 3.43 (n = 20)
	589	2.9×10^4	[5×10^{-7} to 7.5×10^{-5}]	5×10^{-7}		
CHX	232	2.6×10^4	[10^{-6} to 2.5×10^{-4}]	10^{-6}	10^{-4}, 10^{-3}	232 nm, 255 nm: >99[a] (n = 6)
	255	2.5×10^4	[10^{-6} to 10^{-4}]	10^{-6}	10^{-2}	232 nm: 79.73 ± 4.37 (n = 6) 255 nm: 81.27 ± 1.28 (n = 6)
Sephadex™ G-10						
NR	276	3.5×10^4	[5×10^{-7} to 5×10^{-5}]	5×10^{-7}	10^{-4}, 10^{-3}	276 nm, 452 nm: >99.5 a (n = 20)
	452	1.0×10^4	[5×10^{-7} to 5×10^{-5}]	5×10^{-7}		
HXM	261	2.1×10^4	[10^{-6} – 10^{-4}]	10^{-6}	10^{-4}, 10^{-3} 10^{-2}	261 nm: >99[a] (n = 6) 261 nm: <90[b] (n = 6)

[a] Below the detection limit.
[b] Above the linearity limits.

10 columns for each Sephadex™ gel, by statistical analysis using Statview® V. 5.0 (Section 2.8).

Retention rates of 2 dye molecules were measured: the TB (960.83 g mol^{-1}) for the Sephadex™ G-25 and the NR (288.78 g mol^{-1}) for the Sephadex™ G-10. To determine this rate, the spectrophotometric parameters of TB and NR (Table 1) were established by measuring absorbances of concentrations ranging from 10^{-7} mol L^{-1} to 4.1×10^{-4} mol L^{-1} for TB and from 5×10^{-7} mol L^{-1} to 5×10^{-4} mol L^{-1} for NR, followed by a regression analysis (Section 2.8). The residual concentrations of filtrates were estimated by measuring absorbances in UV–visible and calculating the retention rate according to the formula: retention rate = [(Ci − Cf)/Cf] × 100, where Ci was the initial concentration or concentration before filtration and Cf was the final concentration or the residual concentration after filtration.

Retention rates obtained for TB after filtration on Sephadex™ G-25 were (95.11 ± 2.35)% and (92.06 ± 3.43)% after filtration of TB solutions at 4.1×10^{-4} mol L^{-1} and 4.1×10^{-3} mol L^{-1} (which was the commercial concentration), respectively. For NR solutions, either at 10^{-4} mol L^{-1} or 10^{-3} mol L^{-1}, after filtration on Sephadex™ G-10, concentrations were under the detection threshold. Thus, the retention rates obtained were >99.5% after filtration of NR solutions at 10^{-4} mol L^{-1} and 10^{-3} mol L^{-1}.

It was found that, within a range of [450–550] μL of gel volumes after the first centrifugation, there was no significant variation in filtrate volumes and in retention rates. In further experiments, all gel volumes were included within these limits.

3.1.2. *Non-retention of virus particles by the "in-house" Sephadex™ columns*

Basically, the "in-house" Sephadex™ columns should retain the product but not viruses. According to the European Standard NF EN 14476+A1 (AFNOR, 2007), the difference between viral titer before and after treatment, i.e. here, after filtration, should not exceed 0.5 $\log_{10}$. To ensure this non-retention of viruses, 3 independent experiments for each Sephadex™ type and for each contact time tested, were performed. The HCoV 229E stock suspension was diluted 1:10 in sterile distilled water and filtered on the "in-house" Sephadex™ columns. The viral titers were compared with and without filtration (Table 2). For Sephadex™ G-10, $\log_{10}$ differences between viral titers were 0.1 ± 0.1, 0.3 ± 0.4 and 0.2 ± 0.2 for contact times of 0 min, 30 min and 60 min, respectively (n = 3 for each contact time). For Sephadex™ G-25, $\log_{10}$ differences between viral titers were 0.2 ± 0.2, 0.4 ± 0.2, 0.1 ± 0.3, 0.1 ± 0.2 and 0.0 ± 0.2 for contact times of 0 min, 5 min, 15 min, 30 min and 60 min, respectively (n = 6 for each contact time). Consequently, Sephadex™ columns of each Sephadex™ type did not retain HCoV 229E and did not induce a loss of infectivity.

3.1.3. *Elimination of cytotoxicity of molecules tested (CHX and HXM) by filtration on the "in-house" Sephadex™ columns*

Elimination of cytotoxicity was a crucial control before inoculation of filtrates onto the cells. It allowed the assessment of antiviral activity, eliminating an eventual cellular impact of the product on L-132 cells. MTT and NR assays were carried out to determine IC_{50} and CC_{50}, respectively. The IC_{50} and CC_{50} of CHX and HXM solutions (without filtration) were first determined on L-132 cells (Section 2.4). Then, IC_{50} and CC_{50} of CHX and HXM solutions, at different concentrations and after filtration on the "in-house" Sephadex™ columns, were determined to make sure of the elimination of the eventual cytotoxicity by the filtration on the "in-house" Sephadex™ columns. Each experiment was repeated 3 times independently to find the IC_{50} and CC_{50} corresponding to the average results of those 3 experiments. As shown in Table 3, IC_{50} of CHX on L-132 cells were $(4.3 \pm 0.6) \times 10^{-6}$ mol L^{-1}, $(2.4 \pm 1.3) \times 10^{-6}$ mol L^{-1} and $(3.9 \pm 0.2) \times 10^{-6}$ mol L^{-1} at 24 h, 48 h and 168 h, respectively, and CC_{50} were $(5.6 \pm 1.1) \times 10^{-6}$ mol L^{-1}, $(2.9 \pm 1.3) \times 10^{-6}$ mol L^{-1} and $(3.4 \pm 0.5) \times 10^{-6}$ mol L^{-1} at 24 h, 48 h and 168 h, respectively. After filtration of CHX solutions at 10^{-3} mol L^{-1} and 10^{-4} mol L^{-1} on Sephadex™ G-25 columns, CC_{50} and IC_{50} were >10^{-4} mol L^{-1}, according to the detection limit of the method, except at 168 h, where IC_{50} was >5.6×10^{-5} and CC_{50} >5.4×10^{-5} mol L^{-1} after filtration of 10^{-3} mol L^{-1} CHX solution.

The same experiments were carried out with HXM. IC_{50} of HXM without filtration were $(3.8 \pm 1.0) \times 10^{-5}$ mol L^{-1}, $(1.2 \pm 1.4) \times 10^{-5}$ mol L^{-1} and $(3.8 \pm 2.5) \times 10^{-6}$ mol L^{-1} at 24 h, 48 h and 168 h, respectively, and CC_{50} were $(6.2 \pm 1.4) \times 10^{-5}$ mol L^{-1}, $(2.5 \pm 1.5) \times 10^{-5}$ mol L^{-1} and $(5.6 \pm 0.1) \times 10^{-6}$ mol L^{-1} at 24 h, 48 h and 168 h, respectively. After filtration of HXM solution at 10^{-3} mol L^{-1} on the Sephadex™ G-10 columns, IC_{50} and CC_{50} were >10^{-4} mol L^{-1}, except at 168 h where CC_{50} was >5.5×10^{-5} mol L^{-1}.

Table 3
Elimination of potential cytotoxicity by filtration on the "in-house" Sephadex™ columns. 50% inhibitory concentration (IC_{50}) and 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) of chlorhexidine (CHX) and hexamidine (HXM), without filtration, on L-132 cells were evaluated with methyl thiazol tetrazolium (MTT) assays and neutral red (NR) assays, respectively (in bold). IC_{50} and CC_{50} of (i) CHX solutions at 10^{-3} mol L^{-1} and 10^{-4} mol L^{-1}, and (ii) of HXM solutions at 10^{-2} mol L^{-1} and 10^{-3} mol L^{-1}, after filtration on the "in-house" Sephadex™ G-25 and Sephadex™ G-10 columns, respectively, were then evaluated. Results, expressed in mol L^{-1}, represent the average of 3 independent experiments.

	Ci	24 h	48 h	168 h
CHX				
IC_{50}	Without filtration	**$(4.3 \pm 0.6) \times 10^{-6}$**	**$(2.4 \pm 1.3) \times 10^{-6}$**	**$(3.9 \pm 0.2) \times 10^{-6}$**
	10^{-3} mol L^{-1}	>10^{-4}	>10^{-4}	>5.6×10^{-5}
	10^{-4} mol L^{-1}	>10^{-5}	>10^{-5}	>10^{-5}
CC_{50}	Without filtration	**$(5.6 \pm 1.1) \times 10^{-6}$**	**$(2.9 \pm 1.3) \times 10^{-6}$**	**$(3.4 \pm 0.5) \times 10^{-6}$**
	10^{-3} mol L^{-1}	>10^{-4}	>10^{-4}	>5.4×10^{-5}
	10^{-4} mol L^{-1}	>10^{-5}	>10^{-5}	>10^{-5}
HXM				
IC_{50}	Without filtration	**$(3.8 \pm 1.0) \times 10^{-5}$**	**$(1.2 \pm 1.4) \times 10^{-5}$**	**$(3.8 \pm 2.5) \times 10^{-6}$**
	10^{-2} mol L^{-1}	$(5.3 \pm 1.4) \times 10^{-5}$	$(1.0 \pm 0.5) \times 10^{-5}$	$(5.9 \pm 1.4) \times 10^{-6}$
	10^{-3} mol L^{-1}	>10^{-4}	>10^{-4}	>10^{-4}
CC_{50}	Without filtration	**$(6.2 \pm 1.4) \times 10^{-5}$**	**$(2.5 \pm 1.5) \times 10^{-5}$**	**$(5.6 \pm 0.1) \times 10^{-6}$**
	10^{-2} mol L^{-1}	$(6.2 \pm 1.3) \times 10^{-5}$	$(3.2 \pm 2.2) \times 10^{-5}$	$(5.7 \pm 0.3) \times 10^{-6}$
	10^{-3} mol L^{-1}	>10^{-4}	>10^{-4}	>5.5×10^{-5}

Table 2
Non-retention of HCoV 229E by the "in-house" Sephadex™ columns. Results, expressed as $\log_{10}$ of 50% cell culture infective dose ($CCID_{50}$), represent the average of viral titers of at least 3 independent experiments. These assays allowed to evaluate the non-retention of the human coronavirus 229E (HCoV 229E), for each Sephadex™ type and each contact time tested. Viral suspensions were diluted at 1:10 in sterile distilled water for the specified contact time before filtration on the "in-house" Sephadex™ columns and inoculation to the L-132 cells. nd: not determined.

Contact time (min)	Sephadex™ G-10			Sephadex™ G-25		
	Without filtration	After filtration	Difference	Without filtration	After filtration	Difference
0	5.8 ± 0.5 (n = 3)	5.7 ± 0.6 (n = 3)	0.1 ± 0.1 (n = 3)	6.0 ± 0.6 (n = 6)	5.8 ± 0.6 (n = 6)	0.2 ± 0.2 (n = 6)
5	nd	nd	nd	5.9 ± 0.7 (n = 6)	5.6 ± 0.6 (n = 6)	0.4 ± 0.2 (n = 6)
15	nd	nd	nd	5.6 ± 0.5 (n = 6)	5.6 ± 0.4 (n = 6)	± 0.3 (n = 6)
30	6.7 ± 0.9 (n = 3)	6.4 ± 0.3 (n = 3)	0.3 ± 0.4 (n = 3)	6.1 ± 0.2 (n = 6)	6.0 ± 0.4 (n = 6)	0.1 ± 0.2 (n = 6)
60	6.7 ± 0.9 (n = 3)	6.4 ± 0.7 (n = 3)	0.2 ± 0.2 (n = 3)	6.1 ± 0.2 (n = 6)	6.1 ± 0.1 (n = 6)	0.0 ± 0.2 (n = 6)

HXM solution at 10^{-2} mol L^{-1} was also assayed. IC_{50} and CC_{50} were shown to be very close to those without filtration (Table 3) and thus retention was shown to be incomplete for this concentration.

Consequently, the "in-house" Sephadex™ columns clearly demonstrated that they efficiently eliminate cytotoxicity of solutions at concentrations $\leq 10^{-3}$ mol L^{-1}.

3.1.4. CHX and HXM retention rates (UV–visible spectrophotometry) after filtration on the "in-house" Sephadex™ columns

As for dye molecules (TB and NR), specific spectrophotometric parameters and retention rates of CHX and HXM were determined using UV–visible spectrophotometry (Section 2.7). Testing different dilutions of CHX, i.e. from 10^{-10} mol L^{-1} to 10^{-4} mol L^{-1}, the specific spectrophotometric parameters of CHX were established (Table 1). Two maximum absorption wavelengths (λ_{max}) at 232 nm and 255 nm were observed, with molecular absorption coefficients of 2.6×10^4 L cm^{-1} mol^{-1} and 2.5×10^4 L cm^{-1} mol^{-1}, respectively. These coefficients were obtained by means of a regression analysis realized with Statview® V.5.0 ($n = 15$ measurements, $p < 0.0001$). The relation $A = f(c)$ was linear between [10^{-6} to 2.5×10^{-4}] mol L^{-1} for λ_{max} = 232 nm (correlation coefficient = 0.998) and between [10^{-6} to 10^{-4}] mol L^{-1} for λ_{max} = 255 nm (correlation coefficient = 0.996). The detection limit was 10^{-6} mol L^{-1} for both of the $2\lambda_{max}$. These results were consistent with data from the literature (Bonazzi et al., 1995; European Pharmacopeia, 2007a; Ha and Cheung, 1996; Havlikova et al., 2007; Hebert et al., 2003), where UV detection, especially after high performance liquid chromatography, was done either at 235 nm or between 254 nm and 258 nm. The retention rates of CHX solutions were then evaluated at different concentrations by the "in-house" Sephadex™ G-25 columns (Table 1). Three independent experiments were realized in duplicate ($n = 6$). A retention rate >99% was observed for CHX solutions at 10^{-4} mol L^{-1} and 10^{-3} mol L^{-1}. CHX solution at 10^{-2} mol L^{-1} was not completely retained and retention rates were of (79.7 ± 4.4)% at 232 nm and (81.3 ± 1.3)% at 255 nm.

In the same way, HXM was assayed from 10^{-10} mol L^{-1} to 10^{-3} mol L^{-1} (Table 1). The λ_{max} was observed at 261 nm associated to a molar absorption coefficient of 2.1×10^4 L cm^{-1} mol^{-1}, with a linear relationship between [10^{-6} to 10^{-4}] mol L^{-1} ($n = 11$, $p < 0.0001$, correlation coefficient = 0.980). The detection limit of HXM with UV–visible spectrophotometry is 10^{-6} mol L^{-1}. These data were consistent with the European Pharmacopeia, which recommends HXM detection at 263 nm (European Pharmacopeia, 2007b). Hexamidine retention rates by the "in-house" Sephadex™ G-10 columns were evaluated. They were >99% for HXM at 10^{-4} mol L^{-1} and 10^{-3} mol L^{-1}. As for other molecules, retention limits were reached for HXM at 10^{-2} mol L^{-1} and retention rate could not be determined accurately because residual concentrations were above the linearity limits of detection, i.e. 10^{-4} mol L^{-1}. Thus, the retention rate was <90%.

3.1.5. Neutralization of potential antiviral antiseptic activity of products tested

Verifying neutralization control was essential to assess the stop of potential antiviral activity and the respect of the defined contact time. Furthermore, this test ensured that there was no interference of the filtrates with virus infectivity (Fig. 1). As recommended by the European Standard NF EN 14476+A1, the difference between virus control and neutralization control should not excess 0.5 log_{10} (Section 2.6.4). Neutralization controls were done for each independent experiment (each product concentration and each contact time). Neutralization assays were performed for CHX at 10^{-4} mol L^{-1} and 10^{-3} mol L^{-1}. The mean of log_{10} differences obtained ($n = 6$ independent assays for each concentration) were 0.2 ± 0.1 and 0.2 ± 0.2, respectively. The same assays were carried out with HXM at 10^{-3} mol L^{-1} and the mean of log_{10} difference obtained ($n = 3$ independent assays) was 0.2 ± 0.3. Thus, potential antiviral antiseptic activity was correctly neutralized for each molecule and for each concentration tested. Furthermore, no interference with virus infectivity was observed.

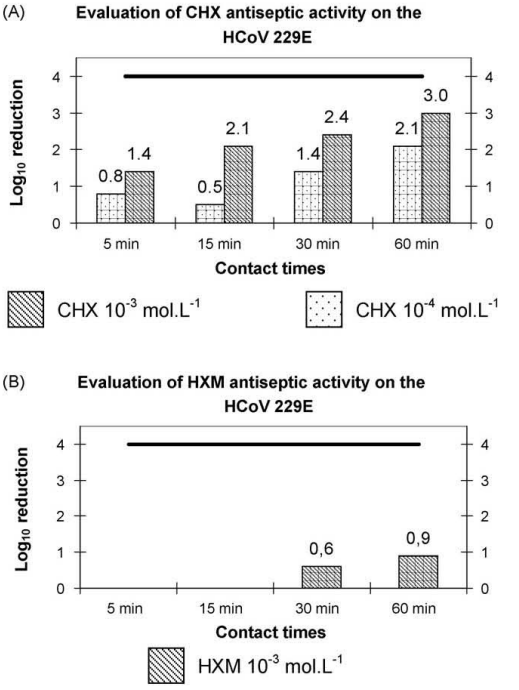


Fig. 2. Evaluation of antiseptic antiviral activity of CHX and HXM on the HCoV 229E. This figure shows the log_{10} reduction in viral titers obtained after the action of chlorhexidine (CHX) and hexamidine (HXM) at different concentrations and at specified contact times: (A) represents the log_{10} reduction in Human coronavirus 229E (HCoV 229E) titers obtained after action of CHX at 10^{-3} mol L^{-1} (▨) and 10^{-4} mol L^{-1} (▩) and (B) represents the log_{10} reduction in HCoV 229E titers obtained after action of HXM at 10^{-3} mol L^{-1} (▨). The bold line in both graphs represents the threshold of 4 log_{10} reduction to reach to pretend to an antiviral antiseptic activity.

3.2. Evaluation of the potential antiviral antiseptic activity of CHX and HXM

Assays were performed as described in Section 2.6.3. Each assay corresponded to the evaluation of potential ATS anti-HCoV activity of one concentration of each molecule tested and one contact time. Each assay was repeated 3 independent times and included necessary controls, i.e. positive virus control, non-retention of HCoV, efficiency of neutralization and elimination of cytotoxicity, to validate the test (Fig. 1).

CHX was tested at 2 concentrations, 10^{-4} mol L^{-1} and 10^{-3} mol L^{-1} and each concentration was tested during 4 different contact times, i.e. 5 min, 15 min, 30 min and 60 min (Fig. 2A). The log_{10} reduction in viral titers induced by the action of CHX at 10^{-4} mol L^{-1} was of 0.8 ± 0.7, 0.5 ± 0.4, 1.4 ± 1.5 and 2.1 ± 1.2 for 5 min, 15 min, 30 min and 60 min, respectively. At the concentration of 10^{-3} mol L^{-1}, CHX induced a reduction of 1.4 ± 0.8, 2.1 ± 0.4, 2.4 ± 0.6 and 3.0 ± 0.2 for contact times of 5 min, 15 min, 30 min and 60 min, respectively. According to the European Standard NF

EN 14476+A1, the log reduction is lower than 4 $\log_{10}$, so, even if CHX had a certain activity on the HCoV 229E, it had no ATS anti-HCoV 229E properties in these conditions.

HXM showed an even worse activity on the HCoV 229E. At 10^{-3} mol L^{-1}, it induced only a reduction of $0.6 \pm 0.5 \log_{10}$ and $0.9 \pm 0.8 \log_{10}$ for 30 min and 60 min of contact time, respectively, so very far from the threshold recommended by the European Standard (Fig. 2B). Given these results, concentration 10^{-4} mol L^{-1} and contact times of 5 min and 15 min were not tested.

4. Discussion

To fight viral infections, ATS-D seem crucial considering: (i) the relative lack of efficient treatments and vaccines available, and (ii) the risk of outbreak of new viral pathogens. Thus, it is essential to evaluate their antiviral activity properly and reliably. The major items proposed in the European Standard NF EN 14476+A1 were followed, such as (i) contact times, (ii) the maximum of 0.5 $\log_{10}$ differences between control viral titers (Section 2.6.4) to validate the assays and (iii) the 4 $\log_{10}$ reduction to assess an antiseptic antiviral activity of drugs tested.

However, some parameters of this standard needed to be intensified, especially the neutralization method and the choice of virus strain. Indeed, the neutralization step is fundamental: (i) to ensure a precise contact time and (ii) to remove any potential cytotoxicity before inoculation to the cells, which could involve confusion in product activity estimation. In the European Standard NF EN 14476+A1, two global techniques are proposed: dilution in iced medium and gel filtration techniques, but they involve different problems such as lengthening of contact times, efficiency and also cost. In the dilution method, the neutralization step requires 30 min, inconsistent with recommended contact times for the different applications mentioned in the European Standard. Also, not all contact times are suited to the potential use of the product, e.g. 60 min is the mandatory contact time for testing disinfectants for surfaces and instruments and facultative times are 5 min, 15 min and 30 min, but in practice, a surface would rarely be disinfected during 60 min. Furthermore, dilution has not always been shown to be efficient. For instance, the IC_{50} and CC_{50} of CHX on L-132 cells are higher than 2×10^{-6} mol L^{-1} at 24 h, 48 h and 168 h. So even after a 1:100 dilution of a 10^{-3} mol L^{-1} solution of CHX (the European Standard recommends a 1:10 dilution or 1:100 if not efficient), the solution remains cytotoxic.

Nonetheless, the European Standard also proposes gel filtration techniques to neutralize product activity, using Sephadex™ LH-20, an ultrafiltration system (Minicon® Millipore) or pre-packed columns Microspin™ S400 HR. The major problem of these methods is the lengthening of contact time. Indeed, they need at least 2 min to achieve the neutralization step, sometimes 10 min or more, depending on the techniques. Furthermore, separation capacities are not well adapted to the molecular mass of most ATS-D. Another drawback of Minicon® concentrators is that they are non-sterile devices and do not bear sterilization, so they cannot be used to filter viruses.

The American Standard (ASTM E 1482-04) recommends also a gel filtration method, using Sephadex™ LH-60 or Sephacryl™ superfine S-1000, to neutralize virucidal activity (ASTM, 2004). The virucidal efficacy criterion for the ASTM standard is a $\log_{10}$ reduction >3. The ASTM procedure is close to the one developed here. However, the centrifugation time: (i) to eliminate the void and (ii) to separate the product tested and viruses is 3 min instead of 1 min with the "in-house" Sephadex™ columns. The first gel proposed, Sephadex™ LH-60, has well adapted retention capacities to most ATS-D molecular mass (supplementary data, Fig. 1B). Unfortunately, it is not sold anymore. The other gel proposed, Sephacryl™ superfine S-1000, is commercialized in a suspension form in distilled water containing 20% ethanol as conservative. The presence of ethanol could affect the tests, emphasizing the effect of the ATS-D tested so leading to an overestimation of the product activity. The cost was also higher than the "in-house" Sephadex™ G-25 or G-10 columns and its retention capacity was not well adapted (supplementary data, Fig. 1).

The choice of virus strain could also be discussed and has recently been questioned by Ijaz and Rubino (2008). The European Standard NF EN 14476+A1 proposed 3 viruses: a poliovirus (type 1, LSc-2ab), an adenovirus (type 5) and a bovine parvovirus (Haden strain). Poliovirus was chosen for its potential high resistance to chemicals but taking into account the worldwide program of poliomyelitis eradication, the legitimacy of this choice is questionable. In the same way, the choice of B19 parvovirus and adenovirus is arguable. Although B19 parvovirus is responsible for serious but rare materno-foetal infections and also infections in immunocompromised patients and/or patients with a haemolytic anaemic disorder, it has not been shown to be a frequent nosocomial pathogen. Its interest, however, lies in its high resistance to chemicals and to a wide range of pH and temperatures and its potential blood transmission route (Morinet et al., 2003). However, the strain used in the European Standard is a bovine parvovirus, so there is a question of representativeness. In contrast, Human serovar 5 adenovirus is more interesting notably for its responsibility in mild upper respiratory tract infections, ophthalmologic infections and also gastro-enteritis, particularly in new-borns and young children. It can cause rare but serious (mortality up to 50%) infections in immunodepressed patients, especially in bone-marrow transplanted patients (Carret and Le Faou, 2001). It has also probably been chosen for its high resistance in environmental conditions. All these viruses are naked viruses and not always representative of majors risks encountered in community or in hospital settings.

When establishing this protocol, the first challenge was to elaborate a unique protocol for both Sephadex™ gels, in order to make assays easier to perform. The best parameters for the 2 needed centrifugation steps were determined for conserving the sterility during the entire assay. These parameters were first validated through statistical analysis, without drugs tested, to ensure the repeatability of columns yield and to fix the acceptability limits of the protocol. Thus, this protocol was made to perform neutralization in only 1 min, which was better than all the other methods.

Therefore, a different virus to those proposed in the European Standard was chosen: the HCoV 229E, not only for its medical interest but also for its presence in the annexe B of the European Standard NF EN 14476-A1 as potential contaminant for surfaces, instruments and hands. Furthermore, it belongs to enveloped viruses, which are absent from the standard and which may behave differently to naked viruses under the action of ATS-D. It was also chosen for its relative resistance in different conditions taking into account that enveloped viruses are most often considered fragile.

During the assays to show the non-retention of the HCoV 229E by the "in-house" Sephadex™ columns, whether G-25 or G-10, the importance of pH was highlighted as an important cause of variability in results, i.e. in viral titers. These difficulties were experienced, mainly with Sephadex™ G-10 that needed excess of solvent (i.e. PBS) when swelling to reach neutrality, and also with sterile distilled water, owing to the sterilization process, which often involved acidification. This could be due to a high sensitivity of the HCoV 229E to the pH. Rapid loss of infectivity and an aggregation of virions have been shown at pH 8 and 37 °C, whereas the virus was quite stable at pH 6 and 37 °C (Sturman et al., 1990). So pH should be verified and adjusted to the neutrality to allow a standardization of the protocol.

To test this protocol, anti-HCoV 229E activity of CHX and HXM were evaluated because of their wide use and their molecular size, which allowed testing both types of Sephadex™, G-25 and G-

10. First, they were shown to be retained through the "in-house" Sephadex™ columns and their potential cytotoxicity was removed. Furthermore, the neutralization technique did not interfere with virus infectivity.

At this stage, some limits of the gel filtration method in the concentration of the product tested appeared. Above concentrations of 10^{-2} mol L^{-1}, molecules were not retained completely and there was a phenomenon of column overloading. However, this did not seem serious, since products are used rarely at this concentration or above, notably because of their potential toxicity.

At this stage, the anti-coronavirus activity of CHX and HXM could be assessed. Thus, the results demonstrated clearly that HXM had no ATS-D activity on the HCoV 229E, but to our knowledge, little data concerning a possible ATS-D antiviral activity of HXM is available in the literature.

In addition the results showed that despite activity on the HCoV 229E, CHX could not pretend to have ATS-D activity on the HCoV 229E in testing conditions and according to the European Standard. However, according to the American Standard, of which the virucidal efficacy criterion is a 3 $\log_{10}$ reduction, CHX had an ATS-D antiviral activity at 10^{-3} mol L^{-1} and 60 min, but this activity is not really representative of field use conditions. In most studies, CHX has been shown: (i) to be inefficient against naked viruses (Bernstein et al., 1990; Kawana et al., 1997; Narang and Codd, 1983; Wood and Payne, 1998) and (ii) to be efficient at concentrations >10^{-3} mol L^{-1} on enveloped viruses but its activity depends on viruses tested and testing conditions (Bernstein et al., 1990; Kawana et al., 1997; Platt and Bucknall, 1985; Tyler and Ayliffe, 1987; Wood and Payne, 1998). For instance, CHX reduced Herpes simplex virus viral titers of >3 $\log_{10}$ in suspension tests for under 3 min (Kawana et al., 1997; Wood and Payne, 1998) and only of 1 $\log_{10}$ on a dried sample of HSV in 10 min (Tyler and Ayliffe, 1987). It is also important to note that most antiseptics and other chemicals are used as a mix of different molecules and the diluent, often ethanol, has its own virucidal activity. For instance, different formulations containing chlorhexidine digluconate were assayed for ATS antiviral activity. It did not respond to the American virucidal criterion when tested at 0.008% (m/v), i.e. 8.9×10^{-5} mol L^{-1} with cetrimide at 0.08% (m/v). However, it induced a $\log_{10}$ reduction >3 in HCoV viral titers when tested at 0.05% (m/v), i.e. 5.6×10^{-4} mol L^{-1}, with cetrimide at 0.5% (m/v) and ethanol at 70% (Sattar et al., 1989).

This data showed that testing conditions must be taken into account to compare the antiseptic antiviral activity, i.e. suspension or carrier tests, presence or not of interfering substances and the chosen criterion to assess a virucidal activity. The possibility of misestimating product activity due to different testing conditions makes it essential to determine the best parameters so as to be as close as possible to the real conditions of application.

The validation of this protocol was the first step in the improvement of antiviral ATS-D activity evaluation and there is still a long way to go to get the perfect test. As expected, the goal of this method is to eliminate or at least reduce to the lowest possible level, the concentration of products tested in order to evaluate, with precise contact time, their antiviral potentiality, without toxicity for host cell and without modifying virus infectivity.

Even if this protocol had been validated by means of an in vitro suspension test, it could be extrapolated to in vitro carrier tests, in vivo or ex vivo protocols. Such protocols can use support as plastic, steel disk (Sattar et al., 2003), fingertips (Sattar and Ansari, 2002) or disks of human skin removed during plastic surgery (Graham et al., 1996). Carrier tests are recommended in different Standards to simulate at best field situation, where viruses are dried and often embedded in organic material limiting the access to ATS-D and thus their potential activity. Ex vivo protocols are of importance to test antiviral ATS activity of either pathogenic viruses or toxic compounds that, for healthy and ethic reasons, could not be assayed with in vivo protocols, using for instance, fingertips of volunteers. Furthermore, they are also useful to evaluate pathogen survival on human skin. Carrier tests need a dilution step to recover the dried virus suspension from the support after action of a chemical. This dilution step plays the role of neutralizer and ensures the contact time. It could be achieved by addition of culture medium or any chemical, which could neutralize specifically product activity (e.g. use of sodium thiosulfate for neutralizing povidone-iodine). However, the diluent itself could be toxic for the cells. Thus, this method could be applied in such a case to eliminate the chemical neutralizer and inoculate the viral suspension safely. This potential is also found in the ASTM standard E 1482-04.

This study describes a global method of chemical neutralization when ensuring the non-retention of viruses and the maintenance of their infectivity, in 1 min. Therefore, this method could be used to test chemicals for different applications from surfaces to water disinfectants. It could be used in the human medical field, as well as in veterinary or industrial (e.g. food industry) applications and also to screen the antiseptic antiviral potency of new drugs.

Acknowledgements

We sincerely thank Dr. S.A. Sattar (Centre for Research on Environmental Microbiology, Faculty of Medicine, Ottawa, Canada) for kindly providing us with the HCoV 229E; Dr. H.F. Hildebrand (Groupe de Recherche sur les Biomatériaux, Laboratoire de Biophysique, UPRES EA 1049, Faculty of Medicine, Lille, France) who furnished us L-132 cells and also Pr. J.B. Regnouf-de-Vains and his team (Groupe d'Etude des Vecteurs Supramoléculaires du Médicament, UMR 7565, Faculté de Pharmacie, Nancy, France) for providing us with CHX and HXM molecules. We would also like to thank Mrs. N. Marshall for editing this manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found at doi:10.1016/j.jviromet.2009.03.023.

References

AFNOR, 2007. Chemical disinfectants and antiseptics—virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine—test method and requirements (phase 2, step 1).
ASTM, 2004. Standard test method for neutralization of virucidal agents in virucidal efficacy evaluations.
Bernstein, D., Schiff, G., Echler, G., Prince, A., Feller, M., Briner, W., 1990. In vitro virucidal effectiveness of a 0.12%-chlorhexidine gluconate mouthrinse. J. Dent. Res. 69, 874–876.
Bonazzi, D., Andrisano, V., Gatti, R., Cavrini, V., 1995. Analysis of pharmaceutical creams: a useful approach based on solid-phase extraction (SPE) and UV spectrophotometry. J. Pharm. Biomed. Anal. 13, 1321–1329.
Borenfreund, E., Puerner, J.A., 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicol. Lett. 24, 119–124.
Bradburne, A.F., 1972. An investigation of the replication of coronaviruses in suspension cultures of L132 cells. Arch. Gesamte Virusforsch. 37, 297–307.
Carret, A.S., Le Faou, A., 2001. Adénovirus. In: Pozzetto, B. (Ed.), Les Infections Nosocomiales Virales et à Agents Transmissibles Non Conventionnels. John Libbey Eurotext, Paris, pp. 237–245.
Drosten, C., Gunther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H.R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R.A., Berger, A., Burguiere, A.M., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J.C., Muller, S., Rickerts, V., Sturmer, M., Vieth, S., Klenk, H.D., Osterhaus, A.D., Schmitz, H., Doerr, H.W., 2003. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. N. Engl. J. Med. 348, 1967–1976.
Duan, S.M., Zhao, X.S., Wen, R.F., Huang, J.J., Pi, G.H., Zhang, S.X., Han, J., Bi, S.L., Ruan, L., Dong, X.P., 2003. Stability of SARS coronavirus in human specimens and environment and its sensitivity to heating and UV irradiation. Biomed. Environ. Sci. 16, 246–255.
European Pharmacopeia, 2007. Chlorhexidine digluconate (solution of).
European Pharmacopeia, 2007. Hexamidine diisethionate.
Falsey, A.R., Walsh, E.E., Hayden, F.G., 2002. Rhinovirus and coronavirus infection-associated hospitalizations among older adults. J. Infect. Dis. 185, 1338–1341.
Fleurette, J., 1995. Diamidines aromatiques. In: Fleurette, J., Freney, J., Reverdy, M.-E. (Eds.), Antisepsie et Désinfection. Edition ESKA, Paris, pp. 320–324.

Gagneur, A., Legrand, M.C., Picard, B., Baron, R., Talbot, P.J., de Parscau, L., Sizun, J., 2002a. Nosocomial infections due to human coronaviruses in the newborn. Arch. Pediatr. 9, 61–69.
Gagneur, A., Sizun, J., Vallet, S., Legr, M.C., Picard, B., Talbot, P.J., 2002b. Coronavirus-related nosocomial viral respiratory infections in a neonatal and paediatric intensive care unit: a prospective study. J. Hosp. Infect. 51, 59–64.
Graham, M.L., Springthorpe, V.S., Sattar, S.A., 1996. Ex vivo protocol for testing virus survival on human skin: experiments with herpesvirus 2. Appl. Environ. Microbiol. 62, 4252–4255.
Ha, Y., Cheung, A.P., 1996. New stability-indicating high performance liquid chromatography assay and proposed hydrolytic pathways of chlorhexidine. J. Pharm. Biomed. Anal. 14, 1327–1334.
Hamre, D., Procknow, J.J., 1966. A new virus isolated from the human respiratory tract. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121, 190–193.
Havlikova, L., Matysova, L., Novakova, L., Hajkova, R., Solich, P., 2007. HPLC determination of chlorhexidine gluconate and p-chloroaniline in topical ointment. J. Pharm. Biomed. Anal. 43, 1169–1173.
Hebert, V.R., Middleton, J.R., Tomaszewska, E., Fox, L.K., 2003. Methodology for quantifying residues of chlorhexidine in raw dairy milk. J. Agric. Food Chem. 51, 567–570.
Holmes, K.V., 2001. Coronaviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), Fields Virology, fourth ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 1187–1203.
Ijaz, M.K., Brunner, A.H., Sattar, S.A., Nair, R.C., Johnson-Lussenburg, C.M., 1985. Survival characteristics of airborne human coronavirus 229E. J. Gen. Virol. 66 (Pt. 12), 2743–2748.
Ijaz, M.K., Rubino, J., 2008. Should test methods for disinfectants use vertebrate viruses dried on carriers to advance virucidal claims? Infect. Control Hosp. Epidemiol. 29, 192–194.
Kawana, R., Kitamura, T., Nakagomi, O., Matsumoto, I., Arita, M., Yoshihara, N., Yanagi, K., Yamada, A., Morita, O., Yoshida, Y., Furuya, Y., Chiba, S., 1997. Inactivation of human viruses by povidone-iodine in comparison with other antiseptics. Dermatology 195, 29–35.
Ksiazek, T.G., Erdman, D., Goldsmith, C.S., Zaki, S.R., Peret, T., Emery, S., Tong, S., Urbani, C., Comer, J.A., Lim, W., Rollin, P.E., Dowell, S.F., Ling, A.E., Humphrey, C.D., Shieh, W.J., Guarner, J., Paddock, C.D., Rota, P., Fields, B., DeRisi, J., Yang, J.Y., Cox, N., Hughes, J.M., LeDuc, J.W., Bellini, W.J., Anderson, L.J., 2003. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. N. Engl. J. Med. 348, 1953–1966.
Larson, H.E., Reed, S.E., Tyrrell, D.A., 1980. Isolation of rhinoviruses and coronaviruses from 38 colds in adults. J. Med. Virol. 5, 221–229.
Moes, E., Vijgen, L., Keyaerts, E., Zlateva, K., Li, S., Maes, P., Pyrc, K., Berkhout, B., van der Hoek, L., Van Ranst, M., 2005. A novel pancoronavirus RT-PCR assay: frequent detection of human coronavirus NL63 in children hospitalized with respiratory tract infections in Belgium. BMC Infect. Dis. 5, 6.
Morinet, F., Pallier, C., Pillet, S., 2003. Parvoviridae. In: Huraux, J.M., Nicolas, J.C., Agut, H., Peigue-Lafeuille, H. (Eds.). Traité de Virologie Médicale, Paris, pp. 283–290.
Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65, 55–63.
Narang, H.K., Codd, A.A., 1983. Action of commonly used disinfectants against enteroviruses. J. Hosp. Infect. 4, 209– 212.
Nicholson, K.G., Kent, J., Hammersley, V., Cancio, E., 1997. Acute viral infections of upper respiratory tract in elderly people living in the community: comparative, prospective, population based study of disease burden. BMJ 315, 1060–1064.
Peiris, J.S., Lai, S.T., Poon, L.L., Guan, Y., Yam, L.Y., Lim, W., Nicholls, J., Yee, W.K., Yan, W.W., Cheung, M.T., Cheng, V.C., Chan, K.H., Tsang, D.N., Yung, R.W., Ng, T.K., Yuen, K.Y., 2003. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. Lancet 361, 1319–1325.
Pene, F., Merlat, A., Vabret, A., Rozenberg, F., Buzyn, A., Dreyfus, F., Cariou, A., Freymuth, F., Lebon, P., 2003. Coronavirus 229E-related pneumonia in immunocompromised patients. Clin. Infect. Dis. 37, 929–932.
Platt, J., Bucknall, R.A., 1985. The disinfection of respiratory syncytial virus by isopropanol and a chlorhexidine-detergent handwash. J. Hosp. Infect. 6, 89–94.
Rabenau, H.F., Cinatl, J., Morgenstern, B., Bauer, G., Preiser, W., Doerr, H.W., 2005. Stability and inactivation of SARS coronavirus. Med. Microbiol. Immunol. 194, 1–6.
Reed, L.J., Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hyg. 27, 493–497.
Sattar, S.A., Ansari, S.A., 2002. The fingerpad protocol to assess hygienic hand antiseptics against viruses. J. Virol. Methods 103, 171–181.
Sattar, S.A., Jacobsen, H., Springthorpe, V.S., Cusack, T.M., Rubino, J.R., 1993. Chemical disinfection to interrupt transfer of rhinovirus type 14 from environmental surfaces to hands. Appl. Environ. Microbiol. 59, 1579–1585.
Sattar, S.A., Springthorpe, V.S., Adegbunrin, O., Zafer, A.A., Busa, M., 2003. A disc-based quantitative carrier test method to assess the virucidal activity of chemical germicides. J. Virol. Methods 112, 3–12.
Sattar, S.A., Springthorpe, V.S., Karim, Y., Loro, P., 1989. Chemical disinfection of non-porous inanimate surfaces experimentally contaminated with four human pathogenic viruses. Epidemiol. Infect. 102, 493–505.
Sizun, J., Yu, M.W., Talbot, P.J., 2000. Survival of human coronaviruses 229E and OC43 in suspension and after drying on surfaces: a possible source of hospital-acquired infections. J. Hosp. Infect. 46, 55–60.
Sturman, L.S., Ricard, C.S., Holmes, K.V., 1990. Conformational change of the coronavirus peplomer glycoprotein at pH 8.0 and 37 °C correlates with virus aggregation and virus-induced cell fusion. J. Virol. 64, 3042–3050.
Tyler, R., Ayliffe, G.A., 1987. A surface test for virucidal activity of disinfectants: preliminary study with herpes virus. J. Hosp. Infect. 9, 22–29.
Vabret, A., Dina, J., Gouarin, S., Petitjean, J., Tripey, V., Brouard, J., Freymuth, F., 2008. Human (non-severe acute respiratory syndrome) coronavirus infections in hospitalised children in France. J. Paediatr. Child. Health 44, 176–181.
Vabret, A., Mourez, T., Gouarin, S., Petitjean, J., Freymuth, F., 2003. An outbreak of coronavirus OC43 respiratory infection in Normandy. France. Clin. Infect. Dis. 36, 985–989.
Van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M.F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R.J., Wolthers, K.C., Wertheim-van Dillen, P.M., Kaandorp, J., Spaargaren, J., Berkhout, B., 2004. Identification of a new human coronavirus. Nat. Med. 10, 368–373.
Van Elden, L.J., van Loon, A.M., van Alphen, F., Hendriksen, K.A., Hoepelman, A.I., van Kraaij, M.G., Oosterheert, J.J., Schipper, P., Schuurman, R., Nijhuis, M., 2004. Frequent detection of human coronaviruses in clinical specimens from patients with respiratory tract infection by use of a novel real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction. J. Infect. Dis. 189, 652–657.
Winther, B., McCue, K., Ashe, K., Rubino, J.R., Hendley, J.O., 2007. Environmental contamination with rhinovirus and transfer to fingers of healthy individuals by daily life activity. J. Med. Virol. 79, 1606–1610.
Woo, P.C., Lau, S.K., Chu, C.M., Chan, K.H., Tsoi, H.W., Huang, Y., Wong, B.H., Poon, R.W., Cai, J.J., Luk, W.K., Poon, L.L., Wong, S.S., Guan, Y., Peiris, J.S., Yuen, K.Y., 2005. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. J. Virol. 79, 884–895.
Wood, A., Payne, D., 1998. The action of three antiseptics/disinfectants against enveloped and non-enveloped viruses. J. Hosp. Infect. 38, 283–295.

Article 3 :

Physicochemical and thermodynamic characterisation of hydroxypentacyclic triterpenoic acid/γ-cyclodextrin inclusion complexes

J Incl Phenom Macrocycl Chem
DOI 10.1007/s10847-011-0063-y

ORIGINAL ARTICLE

Physicochemical and thermodynamic characterization of hydroxy pentacyclic triterpenoic acid/γ-cyclodextrin inclusion complexes

Stephane Fontanay · Francine Kedzierewicz · Raphael Emmanuel Duval · Igor Clarot

Received: 10 June 2011 / Accepted: 14 October 2011
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

Abstract Hydroxy pentacyclic triterpenoic acids (HPTAs) have been described to exhibit numerous pharmacological properties. They also exhibit poor hydrosolubility, thus affecting their potential clinical interest. The association of these active substances with cyclodextrins could be employed to improve some properties such as bioavailability and activity. 1:1 Inclusion complexes of ursolic, oleanolic and betulinic acids with γ-cyclodextrin were evaluated by DSC and ^{1}H NMR spectroscopy. The apparent formation constants (K_f) of the formed complexes were determined using RP-HPLC. Thermodynamic parameters ΔG°, ΔH° and ΔS° were calculated with temperatures ranging from 25 to 45 °C to evaluate the complexation process. Finally the influence of γ-CD on the HPTA water solubility was investigated by phase-solubility studies.

Keywords HPTA · γ-Cyclodextrin · HPLC · NMR · DSC

Introduction

Ursolic acid (UA), Oleanolic acid (OA) and Betulinic acid (BA) are natural hydroxy pentacyclic triterpenoic acids (HPTAs) extracted from *Arctosphylos uvaursi, Syzygium aromaticum* and *Ziziphus mauritiana lam*, respectively (Fig. 1).

Due to their ability to interact with many enzymes [1], nucleic acids and biological membranes [2], HPTAs display numerous pharmacological activities including, anti-tumoral [3–5], anti-inflammatory [6, 7], hepatoprotective [8], anti-oxidant [9], anti-ulcer, anti-hypertensive [10], anti-diabetic [11], antiviral [12], anti-hyperlipidemic [13], anti-parasitical [7, 14], inhibitor of biofilm [15] and antimicrobial activities [7, 16–19]. Isolation and identification of HPTAs are usually and essentially obtained via methanolic or chloroformic extraction [20], and to date more than 50,000 pentacyclic triterpenes have been characterized.

Although of high interest, the development of HPTAs for therapeutic usages has been limited by their poor hydrosolubility and complexation with hydro-soluble shuttle, like cyclodextrins (CDs) has been suggested to potentially solve this issue.

CDs belong to a family of torus shaped, enzymatically synthesized and naturally occurring molecules. CDs are cyclic oligosaccharides composed, for the most, of six, seven or eight α-1,4 linked D-glucopyrannose units per molecule (respectively α-, β- and γ-CD) [21]. The exterior of the molecule is hydrophilic and its relative non polar central cavity [22] may selectively complex numerous organic hydrophobic molecules. The encapsulation of a solute inside the CD cavity can change the physico-chemical properties of the guest molecule to a great extent [23]. Hence CD complexation can be used to protect hydrophobic molecules from atmospheric oxidation, light degradation, heat induced transformations or evaporation [24]. This complexation can also increase the bioavailability of drugs. When using CDs, inclusion complexes were not always observed and a self-aggregation mechanism in the aqueous solutions could also lead to a solubilizing effect without penetration of the guest molecule in the CD cavity [25].

To characterize inclusion complexes, several physic, spectrometric and spectrophotometric methodologies may be used. HPLC has also been used to describe and characterize CD-guest complexes. Modifications of solute

S. Fontanay · F. Kedzierewicz · R. E. Duval · I. Clarot (✉)
Faculty of Pharmacy, SRSMC, Nancy-University, CNRS, 5 Rue Albert Lebrun, BP 80403, 54001 Nancy Cedex, France
e-mail: Igor.clarot@pharma.uhp-nancy.fr

Published online: 05 November 2011

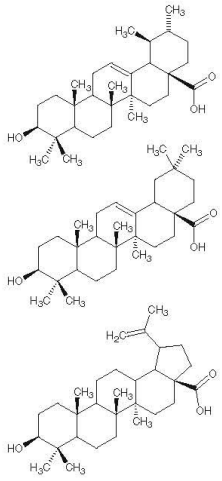


Fig. 1 Names and structures of the hydroxy pentacyclic triterpenoic acids investigated

retention with various CD concentrations in mobile phases were found to be related to the stoichiometry and stability of the complexes thus formed. In 2004, Claude et al. [26] have shown that hydroxy pentacyclic triterpenoic acids (UA, OA and BA) could be separated in RP-HPLC when using derivatized β and γ-cyclodextrins. They have observed that 1:1 complexes were obtained (apparent formation constant values ranging from 186 to 3469 M^{-1}) with acetonitrile/buffer mobile phases.

In this work, we studied and characterized γ-CD/HPTA complexes. We first evaluated the penetration of 3 HPTAs (UA, OA, BA) into the γ-CD cavity using differential scanning calorimetry (DSC) and nuclear magnetic resonance (NMR). Then, we described the retention of the three HPTAs on RP-18 chromatographic support using methanol-buffer mobile phases containing various concentrations of γ-CD and various temperatures. Apparent complex formation constant and thermodynamic data (enthalpy, entropy) were determined. Finally, the influence of γ-CD on the HPTA solubility was also investigated by phase-solubility studies.

Experimental

Reagents and chemicals

HPLC-grade methanol and HPLC-grade acetonitrile were commercially purchased from Prolabo (Paris, France) and water was freshly bidistilled. Na_2HPO_4, $2H_2O$ and H_3PO_4 were supplied by MERCK (France) and Riedel-de Haën (Sigma, France), respectively. Nylon filter membranes with 0.45 μm porosity were supplied from Macherey–Nagel (Germany).

γ-CD and D-glucose were supplied by Wacker (Werk Burghausen, Germany) and MERCK (France), respectively. UA ((3β)-3-hydroxyurs-12-en-28-oic acid; Acros Organic, France, ref. 290182500); OA (3β-hydroxyolean-12-en-28-oic acid; Sigma, France, ref. 093K0961) and BA (3β-hydroxylup-20(29)-en-28-oic acid; Aldrich, France, ref. 85,505–7) were commercially purchased.

Preparation of the complexes

The complexes were prepared by mixing (at 1:1 molar ratio) triterpene acid and γ-CD. Briefly, 100 mg of one of the HPTAs was dissolved in 160 μL of methanol and completed to 3 mL with water. A second solution containing 240 mg of γ-CD in 3 mL of water was prepared. Both solutions were left under stirring for 1 h at 37 °C (classical working temperature for biological purposes) in the dark under stirring conditions at 420 rpm in an Aerotron (Infors HT, Bottmingen, Switzerland). Preliminary studies on 24 h have showed that complexation process was completed in 1 h (when increasing the molar ratio to 1:2, half of the mass of the CD were lost during the filtration.) After reaction completeness, the complexes were filtered and air dried.

A physical mixture of HPTA and γ-CD (1:1 molar ratio) prepared by gently mixing the pulverized powders was used for analytical comparison.

HPLC analysis

The isocratic HPLC system consisted of a vacuum membrane degasser SCM100 (Thermo Electron Corporation, France), a HPLC Spectra System P100XR (Thermo Electron Corporation, France), a Rheodyne valve Model 8125 (Rheodyne, Cotati, CA, USA), fitted with a 20 μL sample loop and a UV detector Spectra System UV1000 (225 nm) model variable-wavelength monitor (Thermo Electron Corporation, France). A C18 silica Lichrospher® 100 RP-18 column (125 × 4 mm i.d., 5 μm particle size, MERCK, France) was used for all experiments. The column temperature was controlled with a column oven from Cluzeau (France) from 25 ± 1 to 45 ± 1 °C. The mobile phase flow-rate was set up at 1.00 ± 0.01 mL/min and systematically controlled throughout the experiments.

The phosphate buffer was composed of Na_2HPO_4, $2H_2O$ at 3.56 g/L, the pH was measured using a Tacussel PHM210 pHmeter (Radiometer, Netherland) and adjusted at 3.0 with the appropriate amount of H_3PO_4.

Mobile phases were prepared by mixing methanol, phosphate buffer (pH 3.0; 0.02 M) and phosphate buffer

(pH 3.0; 0.02 M) containing γ-CD to obtain the desired solvent and cyclodextrin concentrations (0–4 mM). Reasonable retentions of acids were obtained with mobile phases containing 88% of methanol. Lastly, these solutions were filtered through a 0.45 µm nylon filter membrane prior use. The column void volume, T_0, was determined using reagent grade copper sulphate solution (0.01 mg/mL) as described by Clarot et al. [27]. Sample solutions of HPTA (0.1 mg/mL) were prepared in pure MeOH without γ-CD and alpha D-glucose water solution (32.0 mM) was used as control probe.

Each solute was injected in triplicate and corresponding retention factors (k) were calculated (k ± SD). The validity of every linear relationship used in this report was systematically tested for linearity and non-linearity using classical statistical tests ($n = 3$, $\alpha = 5\%$). Tolerance curves leading to uncertainty scores on slopes and intercepts were used to describe apparent formation constant and thermodynamic parameters.

Differential scanning calorimetry

Thermal analysis was carried out with a Netzsch STA 409C (Geratebau, Germany) differential calorimeter calibrated with indium. All scans were performed between 30 and 350 °C with a heating rate of 10 °C/min in a dynamic argon atmosphere (50 mL min^{-1}). Samples (HPTAs, γ-CD, complexes and physical mixtures) were prepared weighing 5 mg of powder in aluminium open pans.

^{1}H NMR analysis

NMR sample solutions were prepared by dissolving excess amount of pure γ-CD or HPTA complexes in deuterium oxide. After filtration, ^{1}H-NMR spectroscopic experiments were performed at 300 K on a Bruker DRX-400 spectrophotometer (Wissembourg, France). Induced changes in the chemical shifts for γ-CD ($\Delta\delta$) by complexation were calculated. Spectra were acquired with number of scans = 32, number of dummy scans = 16, recycle delay = 1.5 s, acquisition size 1k × 512, processing size 2k × 2k, and mixing time 400 ms.

Solubility studies

Phase-solubility studies were carried out in water, according to Higuchi and Connors [28]. Briefly, excess amounts of HPTA were added to water containing increasing concentrations of γ-CD (2–8 mM) and suspensions were shaken at 30 °C for 7 days. After the equilibrium was reached, an aliquot of 100 µL was centrifuged and HPTA concentration was determined by HPLC analysis. Each experiment was carried out in triplicate (RSD < 5%).

Theory

Assuming that each HPTA forms a 1:1 complex with CD [26], the following equilibrium can occurred:

$$\text{HPTA} + \text{CD} \leftrightarrow \text{HPTA-CD} \quad (1)$$

When CD is added to the mobile phase, the solute retention factor, k, is affected as described by Eq. 2 for a 1:1 complex [29, 30]:

$$\frac{1}{k} = \frac{1}{k_0} + K_f \frac{[(CD)]}{k_0} \quad (2)$$

where k_0 is the retention factor without cyclodextrin, [(CD)] is the concentration of CD in the mobile phase, and K_f is the apparent formation constant of the formed complex.

As related by Matsui et al. [29], the complexation constant between cyclodextrin and methanol is related to the CD cavity size (0.93 M^{-1} for α-CD and 0.32 M^{-1} for β-CD). When considering a much larger γ-CD cavity, a much lower contact surface with methanol must lead to negligible apparent formation constant, as previously described for ethanolic mobile phases [31]. This weak interaction was not taken into account in the constant calculation.

As described by Eq. 2, when plotting 1/k versus [(CD)], a linear relationship reflects a solute-CD complex with a 1:1 stoichiometry and the (slope/intercept) ratio allows the determination of K_f.

To study the effect of the temperature on the complexation process of HPTAs by CD, the retention factors were determined for all CD concentrations tested at the following temperatures: 25, 30, 35, 40 and 45 °C. The well-known thermodynamic relationship shown in Eq. 3 was employed to determine the standard enthalpy (ΔH°) and the standard entropy (ΔS°) of transfer of HPTA from the mobile phase to the cyclodextrin cavity [27].

$$\text{Ln}K_f = \frac{-\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (3)$$

where K_f is the apparent formation constant of the inclusion complex, R is the gas constant and T the absolute temperature.

For a linear plot of ln K_f versus 1/T (Van't Hoff plot), the slope and intercept are respectively $-\Delta H^\circ/R$ and $\Delta S^\circ/R$.

For the determination of the Gibbs free energy which takes place during the inclusion process, Eq. 4 could be used.

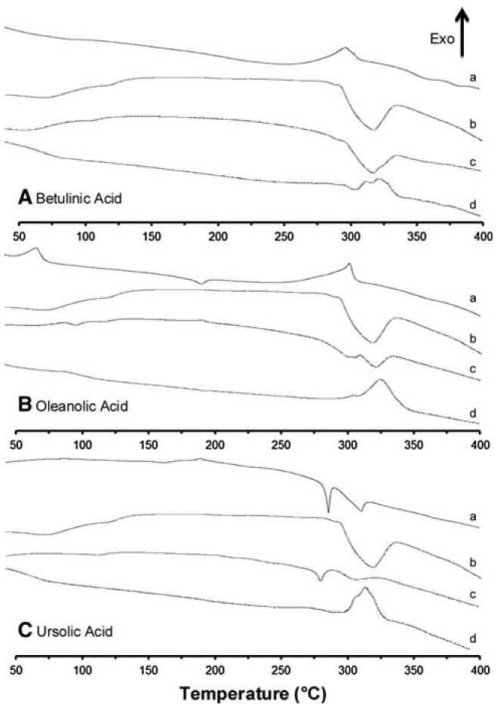


Fig. 2 DSC curves of betulinic (**A**), oleanolic (**B**) and ursolic acids (**C**): (*a*) acid alone, (*b*) γ-CD, (*c*) physical mixture (1:1) and (*d*) the complex

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (4)$$

Results and discussion

Differential scanning calorimetry studies

Thermal analysis has been reported to be a powerful analytical tool to characterize association complexes of drugs with cyclodextrins. DSC curves of HPTAs, γ-CD, their physical mixtures and the complexes are illustrated in Fig. 2. These thermograms revealed pronounced structural differences between pure substances, mixtures and association complexes.

For instance, the thermal profile of pure UA (Fig. 2Ca) showed an endothermic peak with a T_{max} temperature at about 283.5 °C, which was attributed to the melting of UA. The thermogram of the physical mixture (Fig. 2Cc) was similar to the superimposition of the thermograms of individual UA and γ-CD with the endothermic peak due to melting of UA. These curves indicated a lack of interactions in the physical mixture; suggesting that the complex was not obtained by simply mixing both powders. In the DSC curve of the inclusion complex (Fig. 2Cd), the melting peak of UA has disappeared. This may be attributed to a tight interaction between UA and γ-CD and suggests the formation of an inclusion complex [32].

^{1}H NMR studies

^{1}H NMR is a well-known technique to determine physicochemical interactions occurring in the formation of an inclusion complex [33].

The ^{1}H assignment of γ-CD is shown in Fig. 3 and the chemical shifts of the protons of free γ-CD or when complexed with HPTAs are given in Table 1.

Complexation of HPTAs with γ-CD, resulted in disappearing H-3 proton (due to peak overlap) and in a great shift of the H-5 proton, located inside the CD cavity. These results were consistent with the penetration of HPTAs inside the hydrophobic pocket of γ-CD indicating the formation of inclusion complexes.

Apparent formation constants K_f

The capacity factors of the three HPTAs (Table 2) on the C18 stationary phase were determined between 25 and 45 °C.

As expected by the classical theory of complexation applied to a reversed phase chromatographic system, we observed a decrease of retention factors paralleling an increased concentration of CD mobile phase. This phenomenon may be explained by the formation of a hydrophilic association complexes between cyclodextrin and triterpene acid. To examine the possible effect of γ-CD on solvent strength of the mobile phase, a 32.0 mM D-glucose methanol/phosphate buffer 88/12 (v/v) mobile phase was used (as γ-CD contains 8 glucoses equivalent). As no retention modifications were observed and with the hypothesis that no glucose-HPTAs complexes exist, the elution modifications observed in Table 2 in the presence of γ-CD cannot therefore be attributed to the solvent strength.

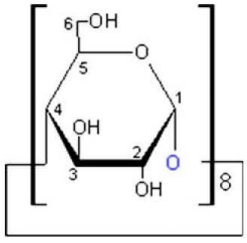


Fig. 3 Structure of γ-CD

Table 1 ^{1}H chemical shifts of the protons of γ-CD free or complexed with ursolic (UA), oleanolic (OA) or betulinic (BA) acids in D_2O

^{1}H assignment	δ γ-Cd_{free} (ppm)	Δ δ (ppm)		
		UA	OA	BA
H1	5.065	0.006	0.006	0.006
H3	3.890	*	*	*
H6	3.827	0.006	−0.008	0.000
H5	3.801	−0.024	−0.027	−0.023
H2	3.621	0.002	0.002	−0.003
H4	3.545	−0.006	−0.004	−0.012

* Not determined

The apparent formation constants of the different CD-HPTAs complexes formed were determined following the Eq. 1. Results are reported in Table 3. Good coefficients of correlation r were determined, thus reflecting the formation of 1:1 complexes independently of the HPTA derivatives tested.

Same order complexation constants were obtained for UA and OA (200–600 M^{-1}) compared to BA (600–1900 M^{-1}) due to their similar structures differing only by the position of two methyl groups (Fig. 1).

Thermodynamic parameters for the HPTA/γ-CD complexes

The retention factors, k, of the three HPTAs on the C18 stationary phase were determined between 25 and 45 °C (Table 2) in order to study mechanistic aspects of the affinity of HPTAs for γ-CD. When the temperature was increased, the retention factor decreased, as expected for a reversed phase system.

Linear Van't Hoff plots (Eq. 3) were obtained (data not shown) for all HPTAs tested, with good coefficients of correlation (r ranging between 0.95 and 0.99).

Free enthalpies (ΔG°), enthalpies (ΔH°) and entropies (ΔS°) of complex formation were calculated for each complex formed and described in Table 4. ΔG°, ΔH° and ΔS° were in the same range for UA and OA but increased for BA, the acid which allows for the most stable complex.

Negative enthalpies (ΔH°) values indicate that it is energetically more favorable for the solutes to be in the γ-CD cavity. These results suggested that the complexation process was essentially enthalpy-controlled ($\Delta H^\circ >> \Delta S^\circ$) and that dipolar and Van der Waals interactions between host and guest molecules are involved in the complex formation. As illustrated in Table 4, a higher exothermicity was obtained for BA (42585 kJ mol^{-1} vs. 21953 kJ mol^{-1} for UA and 23436 kJ mol^{-1} for OA). This result indicate that BA is more stronger included in the CD cavity and is consistent with K_f values shown in Table 3 (1881 M^{-1} vs. 584 M^{-1} for UA and 498 M^{-1} for OA). A contribution of hydrophobic interactions involves the breakdown and displacement of the highly ordered water molecules inside the cyclodextrin cavity. Whatever the triterpene acid under study, the binding mechanism is spontaneous (ΔG° from −15692 to −18435 kJ mol^{-1} at 298 K), whereas the negative entropy indicates greater order after complexation. It is mainly due to the loss of rotational and translational freedom degree of the molecules involved in the complexation process.

Table 2 Capacity factor k of UA, OA and BA for methanol/phosphate buffer (pH 3.0; 0.02 M) mobile phases (88/12 v/v) containing 0–4 mM of γ-CD and with temperature ranging from 25 °C to 45 °C

HPTA	Temp. (°C)	γ-CD concentration (mM)				
		0.0	1.0	2.0	3.0	4.0
UA	25.0	3.85 ± 0.03	3.71 ± 0.00	2.08 ± 0.02	1.72 ± 0.01	1.37 ± 0.00
	30.0	3.74 ± 0.12	3.71 ± 0.08	2.13 ± 0.05	1.89 ± 0.05	1.42 ± 0.05
	35.0	3.47 ± 0.01	2.87 ± 0.10	1.92 ± 0.01	1.71 ± 0.02	1.32 ± 0.05
	40.0	2.54 ± 0.01	2.39 ± 0.01	1.81 ± 0.01	1.64 ± 0.02	1.04 ± 0.02
	45.0	2.66 ± 0.00	2.40 ± 0.03	1.43 ± 0.01	1.46 ± 0.02	1.20 ± 0.02
OA	25.0	3.63 ± 0.01	3.59 ± 0.02	2.08 ± 0.03	1.76 ± 0.01	1.41 ± 0.01
	30.0	3.57 ± 0.13	3.66 ± 0.00	2.07 ± 0.01	1.99 ± 0.06	1.53 ± 0.03
	35.0	3.24 ± 0.01	2.74 ± 0.11	1.76 ± 0.06	1.69 ± 0.06	1.38 ± 0.03
	40.0	2.35 ± 0.02	2.20 ± 0.02	1.77 ± 0.02	1.65 ± 0.01	1.07 ± 0.01
	45.0	2.53 ± 0.04	2.26 ± 0.01	1.39 ± 0.01	1.43 ± 0.00	1.26 ± 0.02
BA	25.0	3.17 ± 0.05	2.36 ± 0.01	1.13 ± 0.03	0.78 ± 0.02	0.59 ± 0.00
	30.0	3.12 ± 0.04	2.44 ± 0.02	1.33 ± 0.04	0.92 ± 0.01	0.79 ± 0.05
	35.0	2.89 ± 0.03	1.96 ± 0.00	1.13 ± 0.02	0.92 ± 0.04	0.68 ± 0.02
	40.0	2.32 ± 0.02	1.99 ± 0.02	1.15 ± 0.00	0.82 ± 0.01	0.76 ± 0.00
	45.0	2.22 ± 0.03	1.67 ± 0.01	0.86 ± 0.01	0.80 ± 0.00	0.71 ± 0.02

Table 3 Apparent formation constant K_f (M^{-1}) and correlation coefficient r for HPTAs/γ-CD complexes of UA, OA and BA for methanol/phosphate buffer (pH 3.0; 0.02 M) mobile phases (88/12 v/v) containing 0–4 mM of γ-CD and with temperature ranging from 25 °C to 45 °C

Analyte	Temp. (°C)	K_f (M^{-1})	*r*
UA	25	584 ± 62	0.975
	30	512 ± 61	0.970
	35	418 ± 49	0.964
	40	413 ± 70	0.922
	45	324 ± 38	0.949
OA	25	498 ± 51	0.975
	30	400 ± 50	0.954
	35	351 ± 31	0.975
	40	323 ± 52	0.911
	45	264 ± 34	0.933
BA	25	1881 ± 418	0.985
	30	1010 ± 144	0.985
	35	966 ± 99	0.990
	40	670 ± 79	0.975
	45	557 ± 79	0.959

Table 4 Thermodynamic parameters for interaction of HPTA with γ-CD at 298 K

HPTA	ΔH° (J mol^{-1})	ΔS° (J $mol^{-1}.K^{-1}$)	ΔG° (J mol^{-1})
UA	−21953 ± 2812	−21 ± 9	−15692
OA	−23436 ± 1946	−27 ± 6	−15386
BA	−42585 ± 7690	−81 ± 25	−18435

Phase solubility study

HPTAs were practically insoluble in water. The phase solubility diagram of HPTAs with increasing γ-CD concentrations, is illustrated in Fig. 4. For each HPTA under study, a Bs curve type was observed [28]. From 0 to 1 mM γ-CD concentration, the apparent solubility of the three HPTAs is increased due to the formation of a soluble complex. The higher value with a five time coefficient was obtained for UA (from 0.015 mM without γ-CD to 0.090 mM with γ-CD). For OA and BA, the increase of solubility was limited to a two time coefficient. Further γ-CD addition results in the precipitation of the complex.

Conclusion

In this study, DSC and ^1H NMR experiments were used to demonstrate the formation of HPTAs/γ-cyclodextrin 1:1 inclusion complexes. Apparent formation constant K_f were determined with a C18 stationary phase and a thermodynamic study demonstrates an enthalpically driven mechanism and the spontaneity of the binding process, a step required for future medical applications. Finally, a non-negligible increase of the HPTAs water solubility using γ-CD was demonstrated by phase-solubility studies.

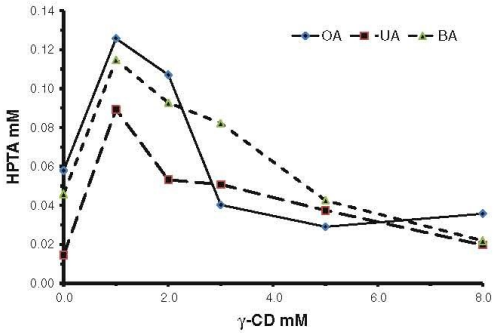


Fig. 4 Phase-solubility diagram of HPTA/γ-CD system

Acknowledgment The financial support of this work was provided by the French Ministry of Education and Research and the French National Scientific Research Centre.

References

1. Ali, Z., Khan, S.I., Ferreira, D., Khan, I.A.: Podocarpaside, a triterpenoid possessing a new backbone from *Actaea podocarpa*. Org. Lett. **8**, 5529–5532 (2006)
2. Han, S.K., Ko, Y.I., Park, S.J., Jin, I.J., Kim, Y.M.: Oleanolic acid and ursolic acid stabilize liposomal membranes. Lipids **32**, 769–773 (1997)
3. Li, J., Guo, W.J., Yang, Q.Y.: Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15. World J. Gastroenterol. **8**, 493–495 (2002)
4. Murakami, S., Takashima, H., Sato-Watanabe, M., Chonan, S., Yamamoto, K., Saitoh, M., Saito, S., Yoshimura, H., Sugawara, K., Yang, J., Gao, N., Zhang, X.: Ursolic acid, an antagonist for transforming growth factor (TGF)-beta1. FEBS Lett. **566**, 55–59 (2004)
5. Tan, Y., Yu, R., Pezzuto, J.M.: Betulinic acid-induced programmed cell death in human melanoma cells involves mitogen-activated protein kinase activation. Clin. Cancer Res. **9**, 2866–2875 (2003)
6. Altinier, G., Sosa, S., Aquino, R.P., Mencherini, T., Della Loggia, R., Tubaro, A.: Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis*. J. Agric. Food Chem. **55**, 1718–1723 (2007)
7. Chowdhury, A.R., Mandal, S., Mittra, B., Sharma, S., Mukhopadhyay, S., Majumder, H.K.: Betulinic acid, a potent inhibitor of eukaryotic topoisomerase I: identification of the inhibitory step, the major functional group responsible and development of more potent derivatives. Med. Sci. Monit. **8**, 254–265 (2002)
8. Saravanan, R., Pugalendi, V.: Impact of ursolic acid on chronic ethanol-induced oxidative stress in the rat heart. Pharmacol. Rep. **58**, 41–47 (2006)
9. Ismaili, H., Milella, L., Fkih-Tetouani, S., Ilidrissi, A., Camporese, A., Sosa, S., Altinier, G., Della Loggia, R., Aquino, R.:

In vivo topical anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of two extracts of *Thymus satureioides* leaves. J. Ethnopharmacol. **91**, 31–36 (2004)
10. Somova, L.I., Shode, F.O., Ramnanan, P., Nadar, A.: Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves. J. Ethnopharmacol. **84**, 299–305 (2003)
11. Liu, J.: Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. J. Ethnopharmacol. **49**, 57–68 (1995)
12. Xu, H.X., Zeng, F.Q., Wan, M., Sim, K.Y.: Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum*. J. Nat. Prod. **59**, 643–645 (1996)
13. Somova, L.O., Nadar, A., Rammanan, P., Shode, F.O.: Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. Phytomedicine **10**, 115–121 (2003)
14. Germonprez, N., Maes, L., Van Puyvelde, L., Van Tri, M., Tuan, D.A., De Kimpe, N.: In vitro and in vivo anti-leishmanial activity of triterpenoid saponins isolated from *Maesa balansae* and some chemical derivatives. J. Med. Chem. **48**, 32–37 (2005)
15. Hu, J.F., Garo, E., Goering, M.G., Pasmore, M., Yoo, H.D., Esser, T., Sestrich, J., Cremin, P.A., Hough, G.W., Perrone, P., Lee, Y.S., Le, N.T., O'Neil-Johnson, M., Costerton, J.W., Eldridge, G.R.: Bacterial biofilm inhibitors from *Diospyros dendo*. J. Nat. Prod. **69**, 118–120 (2006)
16. He, Z.D., Ma, C.Y., Zhang, H.J., Tan, G.T., Tamez, P., Sydara, K., Bouamanivong, S., Southavong, B., Soejarto, D.D., Pezzuto, J.M., Fong, H.H.: Antimalarial constituents from *Nauclea orientalis* (L.). Chem. Biodivers. **2**, 1378–1386 (2005)
17. Kashiwada, Y., Wang, H.K., Nagao, T., Kitanaka, S., Yasuda, I., Fujioka, T., Yamagishi, T., Cosentino, L.M., Kozuka, M., Okabe, H., Ikeshiro, Y., Hu, C.Q., Yeh, E., Lee, K.H.: Anti-AIDS agents. 30. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoides. J. Nat. Prod. **61**, 1090–1095 (1998)
18. Liu, J.: Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. J. Ethnopharmacol. **100**, 92–94 (2005)
19. Setzer, W.N., Rozmus, G.F., Setzer, M.C., Schmidt, J.M., Vogler, B., Reeb, S., Jackes, B.R., Irvine, A.K.: Bioactive principles in the bark of *Pilidiostigma tropicum*. J. Mol. Model. **12**, 703–711 (2006)
20. Cowan, M.M.: Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. **12**, 564–582 (1999)
21. Szejtli, J.: Cyclodextrin technology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1988)
22. Procyk, A.D., Bissell, M., Street Jr, K.W., Acree Jr, W.E.: Solubility in binary solvent systems: 8. Estimation of binary alkane plus p-dioxane solvent nonideality from measured anthracene solubilities. J. Pharm. Sci. **76**, 621–625 (1987)
23. Stella, V.J., He, Q.: Cyclodextrins. Toxicol. Pathol. **36**, 30–42 (2008)
24. Szejtli, J., Gerloczy, A., Szente, L., Benky-Elod, E., Sebestyen, G., Fonagy, A., Kurcz, M.: Enhancement of drug absorption with cyclodextrin inclusion complexes. Acta. Pharm. Hung. Acad. Sci. Hung. **49**, 207–221 (1979)
25. Jansook, P., Kurkov, S.V., Loftsson, T.: Cyclodextrins as solubilizers: formation of complex aggregates. J. Pharm. Sci. **99**, 719–729 (2010)
26. Claude, B., Morin, P., Lafosse, M., Andre, P.: Evaluation of apparent formation constants of pentacyclic triterpene acids complexes with derivatized beta- and gamma-cyclodextrins by reversed phase liquid chromatography. J. Chromatogr. A **1049**, 37–42 (2004)
27. Clarot, I., Clédat, D., Guillaume, Y.C., Cardot, P.J.P.: Chromatographic study of terpene-β-cyclodextrin complexes on porous graphitic carbon stationary phase. Chromatographia **54**, 447–453 (2001)
28. Higuchi, T., Connors, K.A.: Phase-solubility techniques. In: Reilly, C.N. (ed.) Advances in Analytical Chemistry Instrumentation, vol. 4, pp. 117–212. Wiley-Interscience, New York (1965)
29. Matsui, Y., Mochida, K.: Binding forces contributing to the association of cyclodextrin with alcohol in an aqueous solution. Bull. Chem. Soc. Jpn. **52**, 2808–2814 (1979)
30. Uekama, K., Hirayama, F., Irie, T.: New method for determination of the stability constants of cyclodextrin-prostaglandin inclusion complexes by liquid chromatography. Chem. Lett. **7**, 661–664 (1978)
31. Roussel, C., Favrou, A.: HPLC separation of the atropisomers of some substituted N-arylthiazoline-2-thiones with γ-cyclodextrin as a chiral mobile phase additive: size and lipophilicity effects of substituents. J. Incl. Phenom. Mol. **16**, 283–296 (1993)
32. Pralhad, T., Rajendrakumar, K.: Study of freeze-dried quercetin-cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis. J. Pharm. Biomed. Anal. **34**, 333–339 (2004)
33. Schneider, H.-J., Hacket, F., Rüdiger, V., Ikeda, H.: NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. Chem. Rev. **98**, 1755–1786 (1998)

Poster 1 :

RICAI 2006 – L'acide ursolique : spectre d'activité antibactérienne d'une molécule d'origine végétale.

L'acide ursolique: spectre d'activité antibactérienne d'une molécule d'origine végétale

FONTANAY S., GRARE M., MAYER J., FINANCE C., DUVAL R.E.

GEVSM, UMR 7565, Nancy Université, CNRS, SRSMC,
Faculté de Pharmacie, 5 rue Albert Lebrun, BP 80403, 54001 Nancy Cedex

INTRODUCTION

Isolé pour la première fois par Trommsdorff à partir de feuille d'*Arctostaphylos uva ursi (busserole)*, l'acide ursolique (AU), qu'il dénomme alors urson est un triterpène pentacyclique à structure oléanane (Figure 1). De nombreuses fois retrouvé dans des végétaux, il est tour à tour nommé prunol, micromerol, malol. En 1945 Ruzicka détermine sa structure plane, l'AU devient l'acide (3b)-3-hydroxyurs-12-en-28-oique.

L'occurrence de cette substance naturelle est grande dans de nombreux végétaux utilisés dans des contextes pharmacologiques. Certaines de ces plantes font même partie du régime alimentaire normal de l'Homme (le romarin, la menthe poivrée, la lavande, l'origan, le thym…).

De nombreux auteurs (plus de 700 articles ont été publiés sur ces acides ces 10 dernières années), souvent dans des contextes ethno pharmacologiques, ont décris des effets biologiques (anti-cancéreux, hépatoprotecteur, anti-inflammatoire, anti-ulcéreux, anti-hypertenseur, anti-diabétique, antiviral, hypolipémiant, anti-parasitaire et inhibiteur de biofilm) attribuables à l'AU (ou à ses formes modifiées: estérifiées par exemple), dont des activités antibactériennes. Dans la plus part des cas ces études se réfèrent à une pratique traditionnelle de la médecine en Asie (Vietnam, Chine, Corée…), plus rarement en Amérique du Sud (Chili), ou en Afrique.

La plus part du temps ces évaluations sont menées sur les fractions méthanolique ou chloroformique des extraits végétaux. Elles sont le plus souvent effectuées sur des souches bactériennes issues d'isolats cliniques et plus rarement sur des souches de références (ATCC, NCTC…). Nous pouvons tout de même noter, qu'une activité antibactérienne a été décrite sur les espèces suivantes : *Escherichia coli, Salmonella typhi, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas syringae, Proteus mirabilis, Klebsiella pneumoniae, Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Bacillus sphaericus, Streptococcus mutans, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Micrococcous luteus, Mycobacterium tuberculosis*. Les méthodes utilisées sont des plus variées (micro et macrodilution en milieux solides, dilution en milieux gélosés, méthode de disques…) ce qui rend toute corrélation et interprétation inter études impossibles, ou des plus hasardeuses en terme de résultats.

Ces tests, effectués sur divers extraits végétaux, nous ont amené à nous interroger sur l'activité propre de la molécule purifiée. Celle-ci n'ayant pas été systématiquement testée, nous avons voulu évaluer son activité antibactérienne et sa cytotoxicité propre.

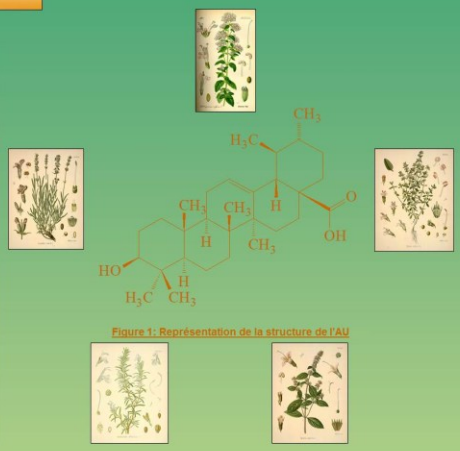


Figure 1: Représentation de la structure de l'AU

METHODE

Les bactéries sur lesquelles nous avons choisi de tester l'AU ont été sélectionné dans le cadre générale des recherches en cours au laboratoire. Ainsi ces bactéries appartiennent toutes à des espèces représentatives d'infections nosocomiales (2).

Nous avons déterminé les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'AU par la méthode de microdilution en suivant les recommandations du CA-SFM (3) et du CLSI (4) sur cinq souches de référence (*E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923 & ATCC 29213 et *P. aeruginosa* ATCC 27853) et sur cinq isolats cliniques présentant des résistances à certains antibiotiques (*E. coli* producteur de pénicillinase, *E. faecium vanB*, *E. faecalis vanA*, *S. aureus mecA*, *P. aeruginosa* surexprimant un système d'efflux).

De plus, nous avons évalué la viabilité de l'AU en déterminant la concentration inhibitrice à 50% (CI_{50}) par un test de viabilité MTT sur cellules eucaryotes MRC-5 (ATCC CCL-171). Les valeurs de CMI et de CI_{50} à 24 heures, nous permettant de calculer l'index de sélectivité (IS = CI_{50}/CMI).

Enfin, nous avons évalué la cytotoxicité de l'AU en déterminant la concentration cytotoxique à 50% (CC_{50}) par un test de toxicité au rouge neutre sur les cellules eucaryotes MRC5.

RESULTATS

L'AU ne présente aucune activité sur les bactéries de référence à gram négatif (CMI >256 µg.mL^{-1} pour *E. coli* et *P. aeruginosa*) ; mais il est actif sur les bactéries de référence à gram positif (CMI 16 µg.mL^{-1} pour *S. aureus* ATCC 29213, 8 µg.mL^{-1} pour *S. aureus* ATCC 25923 et 2 à 4 µg.mL^{-1} pour *E. faecalis*).

En revanche, l'AU ne présente aucune activité sur les isolats cliniques, et ce, quelque soit le mécanisme de résistance (CMI 256 µg.mL^{-1} pour *E. faecalis vanA*, et *E. faecium vanB* et >256 µg.mL^{-1} pour *S. aureus mecA*).

La CI_{50} de l'AU sur cellules MRC5 à 24 heures est de 16 µg.mL^{-1}.

La CC_{50} de l'AU sur cellules MRC5 à 24 heures est comprise entre 4 et 8 µg.mL^{-1}.

Les IS de l'AU sont compris entre 0,0625 et 8 µg.mL^{-1} selon les souches testées.

	CI_{50} (µg.mL^{-1})	CC_{50} (µg.mL^{-1})
24 heures	16	$4 < CC_{50} < 8$
48 heures	$8 < CI_{50} < 16$	$4 < CC_{50} < 8$
168 heures	$8 < CI_{50} < 16$	$4 < CC_{50} < 8$

Tableau 1 : Valeurs des CI_{50} et des CC_{50} obtenues pour l'acide ursolique sur cellules MRC5 (n=3).

		CMI (µg.mL^{-1})	IS
Escherichia coli	ATCC 25922	>256	<0,0625
Staphylococcus aureus	ATCC 25923	16	1
Staphylococcus aureus	ATCC 29213	8	2
Enterococcus faecalis	ATCC 29212	2-4	8 - 4
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 27853	256	0,0625
Escherichia coli	EcR1	>256	<0,0625
Staphylococcus aureus	SaR1	>256	<0,0625
Enterococcus faecium	EfR1	256	0,0625
Enterococcus faecalis	EfR2	256	0,0625
Pseudomonas aeruginosa	PaR1	>256	<0,0625

Tableau 2 : Valeurs des CMI et des IS obtenues pour l'acide ursolique sur les différentes souches de référence testées (n=3).

CONCLUSION

L'AU a un spectre d'activité étroit, limité aux cocci à gram positif avec, *a priori*, un intérêt limité en thérapeutique; compte tenu des faibles valeurs d'IS obtenues et de l'absence de sensibilité des isolats cliniques à l'AU.

La nature des mécanismes de résistance de ces isolats cliniques et l'absence d'activité de l'AU sur ces derniers, nous laisseraient penser que l'AU aurait une action ciblant les structures pariétales ou membranaires chez ces bactéries.

Dans l'avenir, il nous semble intéressant de: - tester d'autres composés de la famille des triterpènes pentacycliques
- tester l'acide ursolique sur des souches de bactéries présentant d'autre mécanismes de résistance que ceux étudiés ici

et ceci afin de confirmer le potentiel antibactérien de l'acide ursolique et de clarifier son mode d'action sur les cellules bactériennes.

REFERENCES

1. Seidel, 2006. Ursolic acid and ursolic acid-rich herbs. J. Ethnopharmacol. 105, 92-94.
2. Rapport de l'InVS sur les infections nosocomiales en 2001 – enquête ENNIS. Résultats publiés le 28/10/2003. www.invs.sante.fr/surveillance/ennis/
3. CA-SFM. Communiqué. Mai/Décembre, mettre 2006. http://www.sfm.asso.fr
4. NCCLS. 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically approved standard M7-A6, 6th ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, USA.

Poster 2 :

TERPNET 2007 - Ursolic, oleanolic and betulinic acids : Antibacterial spectra of natural pentacyclic triterpenoic acids.

Ursolic Acid, Oleanolic Acid and Betulinic Acid: Antibacterial spectra of natural pentacyclic triterpenoic acids

FONTANAY S., FINANCE C., DUVAL R.E.

GEVSM, UMR 7565, Nancy Université - CNRS,
Faculté de Pharmacie, 5 rue Albert Lebrun, BP 80403, 54001 Nancy Cedex

INTRODUCTION

Ursolic Acid [UA; Urs-12-en-28-oic acid, 3-hydroxy-, (3β)-], Oleanolic Acid [OA; Olean-12- en-28-oic acid, 3-hydroxy-, (3β)-] and Betulinic Acid [BA; lup-20(29)-en-28-oic acid, 3- hydroxy-, (3β)-] are pentacyclic triterpene acids, which occur in a large variety of vegetarian foods or medicinal vegetal.

UA was originally extract from *Arctostaphylos uva-ursi.*, and found to be medicinally active both topically and internally.

OA was originally isolated from *Syzygium aromaticum*, and extracted from various plants like *Olea europea*, *Viscum album L.*, *Rosmarinus officinalis L.*.

And finally, BA is a naturally occurring triterpene, originally extracted from the bark of an African tree, *Zizyphus mauritiana*, and also isolated from various plants as *Trifilium pellatum, Anclstocladuls heyeneaus, Diospyros leucomelas.*

Isolation and identification of triterpenoïs acids are principally done by methanolic or chloroformic extraction[1]. Several authors have shown that UA[2], OA[2] and BA[3] have a lot of different properties on biological systems. In effect, ethno-pharmacology studies, have described numerous biological activities for those molecules, especially anti-infectious ones, but mostly by testing plant's extracts, rather than purified compounds.

According to the orientation of our team, we decide to estimate the potential use of UA, OA and BA against well defined bacterial reference strains, representative of nosocomials infections, in order to define their interest in Therapy.

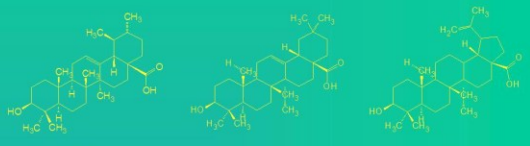


Figure 1: Semi-plane structure of Urs-12-en-28-oic acid, 3-hydroxy-, (3b) (UA), Olean-12-en-28-oic acid, 3-hydroxy-, (3b) (OA) and Lup-20(29)-en-28-oic acid, 3-hydroxy-, (3b)- (9Cl) (BA).

METHODS

Drugs

UA (U6753), OA (O5504) were form Sigma, and BA (85505-7) was from Aldrich. Molecules were prepared at 10^{-2} mol/L in 100% DMSO (D2438, Sigma).

Minimal Inhibitory Concentration (MIC) determination[4-6]

- Five reference strains tested : *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 & 29213, *E. faecalis* ATCC 29212 and *P. aeruginosa* ATCC 27853).
- Mueller Hinton broth (Difco 275730).
- Micro dilution method.

Viability & Cytotoxicity assays

- 2 cell lines: HaCaT (immortalized human keratinocytes) & MRC-5 (human embryonic lung fibroblasts)
- Minimum Essential Medium (MEM) or Dulbecco's (DMEM) with 2% decomplemented fetal calf serum
- Inhibitory Concentration 50% (IC_{50}): viability assay (MTT) [8]
- Cytotoxic Concentration 50% (CC_{50}): cytotoxicity assay (Neutral Red, NR) [7]

RESULTS

MIC (Table 1)

➢UA: antibacterial spectrum only against Gram-positive bacteria (MIC: 8, 8 and 2-4 µg/mL, respectively against *S. aureus* ATCC 25923 & ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212).

➢OA: moderate activity only against Gram-positive bacteria (MIC: 64, 32 and 8 µg/mL, respectively against *S. aureus* ATCC 25923 & ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212).

➢BA: no significant antibacterial activity (MIC ≥ 256 µg/mL) for all bacterial strains.

➢Antibacterial activity: UA ≈ OA, with better activities for UA

BA = 0

MIC (µg/mL)		UA	OA	BA
Escherichia coli	ATCC 25922	>256	>256	>256
Staphylococcus aureus	ATCC 25923	8	64	>256
Staphylococcus aureus	ATCC 29213	8	32	>256
Enterococcus faecalis	ATCC 29212	2-4	8	>256
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 27853	256	256	256

Table 1: MICs values (µg/mL) obtained by broth microdilution method [4-6] (n=3).

IC_{50} / CC_{50} (Tables 2)

➢IC_{50} and CC_{50} values were in agreement for two assays, viability (MTT assay) & cytotoxicity (NR assay).

➢Quite similar sensibilities to three compounds, of the two cell lines, HaCaT and MRC-5.

➢Cytotoxicity: BA > UA > OA.

(µg/mL)		UA		OA		BA	
		IC_{50}	CC_{50}	IC_{50}	CC_{50}	IC_{50}	CC_{50}
MRC-5	24 h	8-16	4-8	32-64	16-32	1	4-8
	48 h	8-16	4-8	16-64	16-32	<1	2-4
	168 h	8-16	4-8	16-32	32-64	<1	2-4
HaCaT	24 h	4-8	2-4	32-64	16-32	1-2	2-4
	48 h	4-8	2-4	32-64	32-64	1	1-2
	168 h	4-8	2-4	32-64	32-64	<1	1<

Table 2: IC_{50} & CC_{50} values (µg/mL) obtained respectively with viability assay (MTT test) and cytotoxicity assay (NR assay) on MRC-5 and HaCaT cell lines (n=3).

SI (IC_{50}/MIC) (Table 3)

Very weak SI values obtained whatever compound and strain considered: BA < UA < OA in a therapy context.

SI			UA	OA	BA
MRC-5	*E. coli*	ATCC 25922	0.031-0.062	0.125-0.25	0.003
	S. aureus	ATCC 25923	1-2	0.5-1	0.003
	S. aureus	ATCC 29213	1-2	1-2	0.003
	E. faecalis	ATCC 29212	4	4-8	0.003
	P. aeruginosa	ATCC 27853	0.031-0.062	0.1258-0.25	0.003
HaCaT	*E. coli*	ATCC 25922	0.015-0.031	0.125-0.25	0.003
	S. aureus	ATCC 25923	0.5-1	0.5-1	0.003
	S. aureus	ATCC 29213	0.5-1	1-2	0.003
	E. faecalis	ATCC 29212	2	4-8	0.003
	P. aeruginosa	ATCC 27853	0.015-0.031	0.125-0.25	0.003

Table 3: Selectivity Index (SI=IC_{50}/MIC) obtained for five reference bacterial strains after 24 hours exposure to three compounds, on MRC-5 or HaCaT cell lines.

CONCLUSION

➢UA & OA showed a Gram-positive antibacterial spectrum, while BA was devoid of any antibacterial activity.
➢UA & OA shown significant cytotoxicity against the two eukaryotic cell lines tested, HaCaT & MRC-5. Noteworthy BA had a more potent cytotoxic impact.
➢Hence, we can notice that compounds of interest have the same structural homology (*i.e.* same "E cycle" for UA & OA, comparatively to BA).

➢ But, considering SI values obtained, we showed a limited interest of these compounds as antibacterial agents, in topical or internally use in a modern therapy context.

REFERENCES

1. Cowan MM. 1998. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clin Microbiol Rev. 12: 564-582.
2. Liu J. 2005. Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. J Ethnopharmacol. 100: 92-94.
3. Cichewicz RH, Kouzi SA. 2004. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. Med Res Rev. 24: 90-114.
4. CA-SFM. Consensus 2007 (Edition janvier 2007). http://www.sfm.asso.fr
5. NCCLS. 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard M7-A6, Vol. 20, No. 2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA.
6. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65: 55-63.
7. Borenfreund E., Puerner JA. 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicol Lett. 24(2-3):119-24.

Poster 3 :

RICAI 2007 – Evaluation de l'activité antiseptique antivirale par une méthode de filtration sur gel.

EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTISEPTIQUE ANTIVIRALE PAR UNE METHODE DE FILTRATION SUR GEL

Chloé GELLER, Stéphane FONTANAY, Jean-Bernard REGNOUF-de-VAINS, Chantal FINANCE, Raphaël E. DUVAL

GEVSM, UMR 7565, Nancy Université, CNRS

Faculté de Pharmacie, 5 rue Albert Lebrun, BP 80403, 54001 Nancy Cedex, FRANCE

INTRODUCTION

La lutte contre les infections nosocomiales virales nécessite par une antisepsie-désinfection efficace et adaptée au risque viral.

A ce jour, seule une norme européenne, la norme NF EN 14476 [1], propose une méthodologie d'évaluation de l'activité antiseptique antivirale. Il s'agit d'un essai en suspension où les conditions telles que temps de contact, substances interférentes, températures, sont précisées en fonction de l'utilisation potentielle du produit. Cependant, les méthodes de neutralisation de l'activité antiseptique proposées peuvent être améliorées en matière d'efficacité et d'allongement du temps de contact.

C'est pourquoi nous avons développé un protocole de neutralisation par filtration sur gel de Séphadex® permettant une séparation efficace du produit et des virus en 1 min, en utilisant comme modèle d'étude le coronavirus humain, souche 229E (HCoV 229E), cultivé sur cellules L-132 (cellules épithéliales embryonnaires de poumon humain, transformées par HeLa).

MATERIEL ET METHODES

Étape préliminaire : Réalisation extemporanée et de façon aseptique des colonnes de Séphadex® G-25



- Percer un trou dans le couvercle d'un tube Eppendorf® et placer du coton cardé à la base d'une seringue de 1 mL.
- Stériliser cet ensemble.



- Ajouter 1 mL de suspension stérile de Séphadex® G-25/ PBS dans le corps de la seringue.
- La placer sur le tube Eppendorf®.
- Centrifuger ce système à 4500 G pendant 1 min.



- Eliminer le tube contenant l'excès de PBS
- Replacer la seringue sur un nouveau tube Eppendorf®.
- Le système de filtration est ainsi prêt à être utilisé.

Principe général de l'évaluation de l'activité antiseptique antivirale

Mise en contact du virus et du produit à tester

Temps de contact défini

Etape de neutralisation et d'élimination de la cytotoxicité

Dilution OU Neutralisation chimique OU Filtration sur gel

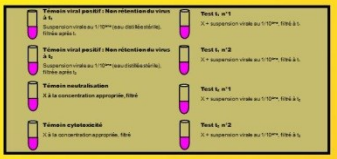
Titrage de la suspension virale résiduelle :

Évaluation de la $CCID_{50}$ (Cell Culture Infective Dose 50%)

Diminution du pouvoir infectieux de 4 log_{10} :

Produit ayant une activité antiseptique antivirale

Protocole





Filtration par centrifugation à 405 G pendant 1 min.



Inoculation des filtrats sur tapis cellulaires confluents ensemencés 48 h auparavant

(5.10^3 cellules/puits pour les L-132)



Révélation par coloration MGG et évaluation des titres viraux par la méthode de Reed et Muench [2]

Validation du protocole

Répétabilité de la fabrication des colonnes

Volume moyen de gel obtenu après centrifugation à 4500 G, 1 min :

493 ± 44 µL (n = 12)

Volume moyen des filtrats obtenus après dépôt de 500 µL d'une solution de bleu de Trypan à $4,1.10^{-4}$ M et centrifugation à 405 G, 1 min :

441 ± 55,5 µL (n = 10)

Rétention d'une molécule test: le bleu de Trypan (MM = 960,83 g/mol)



Taux de rétention d'une solution de bleu de Trypan à $4,1.10^{-4}$ M > 99,9% (n = 10)

Résultats obtenus par spectrophotométrie UV-visible à 540 nm

Non rétention du HCoV 229E par les colonnes de Séphadex® G-25

Moyenne des $CCID_{50}$ de la suspension virale sans filtration (n = 10)	$2,5.10^6$ particules infectieuses/mL
Moyenne des $CCID_{50}$ de la suspension virale après filtration sur colonne de Séphadex® G-25 (n = 11)	$2,4.10^6$ particules infectieuses/mL

RESULTATS

Evaluation de l'activité antivirale antiseptique sur le HCoV 229E d'une molécule de référence : le digluconate de chlorhexidine

Le digluconate de chlorhexidine (MM = 897,74 g/mol) est testé à une concentration de 10^{-4} M pour des temps de contact de 5, 15, 30 et 60 min, temps obligatoires et facultatifs recommandés par la norme NF EN 14476 pour tester les désinfectants de surface et d'instruments.

Validation physico-chimique (Spectrophotométrie UV-visible) de la rétention de la chlorhexidine

Taux de rétention d'une solution de chlorhexidine à 10^{-4} M : 99% (n = 3)

Taux de rétention d'une solution de chlorhexidine et à 10^{-3} M : 91,9% (n = 4)

Limite de détection de la chlorhexidine : 10^{-5} M

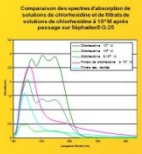


Figure 1

Validation biologique de la rétention de la chlorhexidine

Élimination de la cytotoxicité de la chlorhexidine par passage sur colonne de Séphadex® G-25 et évaluation des CI_{50} (Concentration Inhibitrice 50%) par tests de viabilité au MTT et des CC_{50} (Concentration Cytotoxique 50%) par des tests de cytotoxicité au rouge neutre

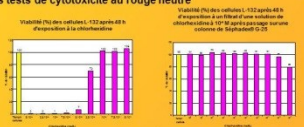


Figure 2

Diminution du pouvoir infectieux du HCoV 229E après exposition à la chlorhexidine (CCID50 exprimés en log10)



Figure 3

Les colonnes de Séphadex® G-25 sont capables de retenir le digluconate de chlorhexidine (Figures 1 et 2) et permettent ainsi l'évaluation de l'activité antiseptique antivirale de ce composé. De plus, la figure 3 montre que la différence de titre entre la suspension virale non filtrée et filtrée ne dépasse pas 0,5 log_{10} conformément aux recommandations de la norme NF EN 14476.

Cette méthode nous a ainsi permis de montrer que, même après un temps de contact de 60 min, la réduction du pouvoir infectieux du HCoV 229E par une solution de chlorhexidine à 10^{-4} M n'excède pas 1,2 log_{10} (Figure 3). Or, la norme NF EN 14476 impose une diminution de 4 log_{10} pour qu'un produit puisse être utilisé à des fins antiseptiques.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

- **Validation du protocole de neutralisation de l'activité antiseptique antivirale par une méthode de filtration sur gel de Séphadex® G-25 :**

  Reproductibilité, rétention des molécules testées, non rétention du virus étudié, le HCoV 229E.

- **Evaluation de l'activité antiseptique antivirale de la chlorhexidine :**

  La chlorhexidine, seule, à une concentration de 10^{-4} M et pour des temps de contact ≤ 60 min n'a pas d'activité antiseptique antivirale sur le HCV 229E. Toutefois, il a été montré qu'une solution alcoolique de chlorhexidine à 0,05% (soit $5,6.10^{-4}$ mol/L) associée au cétrimide avait une activité antiseptique sur le HCoV 229E en 1 min [3] . Ceci souligne l'importance des conditions d'expérience et des formulations testées lorsque l'activité antiseptique antivirale d'un produit doit être démontrée.

- **Amélioration de la norme NF EN 14476 et perspectives :**

  - Diminution de l'allongement du temps de contact (1 min seulement) alors que les protocoles proposés allongent les temps de contact de 30 min pour la dilution à froid et de 2 à 10 min pour les méthodes par filtration.
  - Extension de ce protocole au gel de Séphadex® G-10 permettant alors la possibilité de séparer des molécules de familles chimiques variées et de poids moléculaires de 100 à 5000 g/mol. Les travaux menés avec ce gel sont en cours et les premiers résultats sont très encourageants.
  - Extension de ce protocole à un virus nu, le poliovirus.

REFERENCES

[1] AFNOR. Antiseptiques et désinfectants chimiques. Essai virucide quantitatif de supension pour les antiseptiques et désinfectants chimiques utilisés en médecine humaine. Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1). Paris : AFNOR 2007. Norme Européenne et Française NF EN 14476+A1

[2] Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating 50 per cent end points. Am. J. Hyg. 1938 ; 27 : 493-497

[3] Sattar SA, Springthorpe VS, Karim Y, Loro P. Chemical disinfection of non-porous inanimate surfaces experimentally contaminated with four human pathogenic viruses. Epidemiol Infect. 1989 ; 102 : 493-505

Poster 4 :

X^{ème}JFV 2008 – Validation d'une méthode de filtration sur gel comme outil d'évaluation de l'activité antiseptique (ATS) antivirale.

Validation d'une méthode de filtration sur gel comme outil d'évaluation de l'activité antiseptique (ATS) antivirale

GELLER C, FONTANAY S, FINANCE C, DUVAL RE.
GEVSM, SRSMC, Nancy-Université, CNRS, Faculté de Pharmacie, Nancy, France.
CHLOE.GELLER.1@etumail.uhp-nancy.fr

Contexte médical

Emergence de nouveaux virus, franchissement de la barrière d'espèce → HCoV responsable du S.R.A.S

Infections nosocomiales (IN) virales → HCoV responsables d'IN respiratoires hautes et basses, bronchiolites Gériatrie, Pédiatrie +++

Modèle d'étude
HCoV 229E / cellules L-132
Virus enveloppé à ARN, ubiquitaire



Evaluation de l'activité ATS

1- Mise en contact du virus et du produit à tester
Temps de contact défini
Présence ou non de substances interférentes

2 - Neutralisation
de la potentielle activité antivirale du produit et de sa cytotoxicité

3 - Évaluation de la perte de pouvoir infectieux
Titrage du virus

Exigences réglementaires

Une seule norme européenne : la norme NF EN 14476+A1 [1]

- Essais en suspension
- Conditions précisées en fonction de l'utilisation potentielle du produit.

Activité antiseptique antivirale SI diminution de 4 log_{10} du titre viral en un temps défini.

Des insuffisances...

- Nature des substances interférentes
- Représentativité des conditions réelles d'utilisation
- **Neutralisation**

Pourquoi une nouvelle méthode de filtration sur gel ?



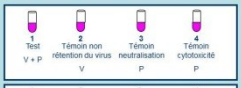
Différentes méthodes de neutralisation (* proposées dans la norme)	Durée nécessaire pour la neutralisation	Pouvoir de séparation	Coût
Dilution à froid*	30 min	X	X
Séphadex ™ LH20*	10 min	≤ 4000-5000 g/mol	300 € / 100 g
Microspin™ S 400 HR*	2 min	10000 – 5.10^5 g/mol	160 € / 50 colonnes
Séphadex ™ G-10	1 min	≤ 700 g/mol	189 € / 100 g Soit = 500 colonnes
Séphadex ™ G-25	1 min	1000 - 5000 g/mol	193 € / 100 g Soit = 500 colonnes

Matériel et méthode

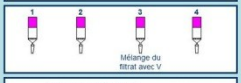
Fabrication des colonnes de Séphadex™



Mise en contact du virus (V) et du produit à tester (P) pendant un temps (t) et préparation des témoins



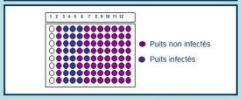
Neutralisation par filtration sur colonne de Séphadex™ par centrifugation à 405 G pendant 1 min



Inoculation des filtrats sur tapis cellulaires confluents ensemencés 48 h auparavant (5.10^3 cellules/puits pour les L-132) Incubation à 33°C, 6 jours



Révélation par coloration MGG et évaluation des titres viraux (exprimés en Cell Culture Infective Dose 50% ou $CCID_{50}$) par la méthode de Reed et Muench [2]



Validation de la méthode avec la Séphadex™ G-10

Reproductibilité de la fabrication des colonnes

Volume de gel après centrifugation	524 ± 33,4 µL (n = 16)
Volume des filtrats après centrifugation	483 ± 13,6 µL (n = 16)
Taux de rétention des colonnes	Rouge neutre 99,7% (n = 16)

Non rétention des particules virales

$Log_{10}(CCID_{50}$ témoin virus) – $Log_{10}(CCID_{50}$ témoins virus après filtration)

T = 0 min	T = 30 min	T = 60 min
0,4 (n = 4)	0,1 (n = 3)	0,4 (n = 3)

< 0,5 tel que recommandé par la norme NF EN 14476+A1

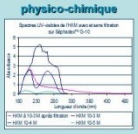
Rétention d'une molécule de référence : l'hexamidine (HXM)

Tests de neutralisation de l'HXM à 10^{-3} M

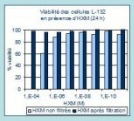
$Log_{10}(CCID_{50}$ témoin virus) – $Log_{10}(CCID_{50}$ témoins neutralisation) = 0,4 (n = 2)

< 0,5 tel que recommandé par la norme NF EN 14476+A1

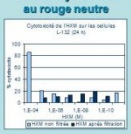
Validation physico-chimique



Tests de viabilité au MTT

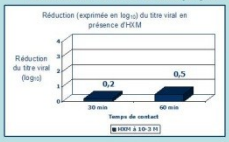


Tests de cytotoxicité au rouge neutre



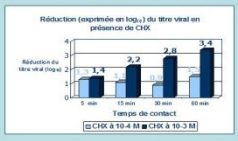
Résultats

Évaluation de l'activité antiseptique de l'HXM sur le HCoV 229E



Réduction du titre viral << 4 log_{10} :
Pas d'activité ATS antivirale de l'HXM sur le HCoV 229E
Concentrations ≤ 10^{-3} M
Temps de contact ≤ 60 min

Évaluation de l'activité antiseptique de la chlorhexidine (CHX) sur le HCoV 229E



Évaluation réalisée grâce à des colonnes de Séphadex™ G-25 validées précédemment [3]

Réduction du titre viral < 4 log_{10} :
Pas d'activité ATS antivirale de la CHX sur le HCoV 229E
Concentrations ≤ 10^{-3} M
Temps de contact ≤ 60 min

Conclusion

- Validation des protocoles avec Séphadex™ G-10 et G-25
- Evaluation de l'activité ATS antivirale de 2 molécules de référence sur le HCoV 229E : l'HXM et la CHX
- Evolution de la norme NF EN 14476 : Diminution de l'allongement du temps de contact (1 min seulement) par rapport aux méthodes proposées, diminution du coût
- Evaluation du potentiel antiviral de nouvelles molécules : Calix[4]arènes élaborés par l'équipe du GEVSM (En cours d'évaluation)



Structure générale d'un calix[4]arène

[1] AFNOR. Antiseptiques et désinfectants chimiques. Essai virucide quantitatif des suspensions pour les antiseptiques et désinfectants chimiques utilisés en médecine humaine. Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1). Paris : AFNOR 2007. Norme Européenne et Française NF EN 14476+A1
[2] Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating 50 per cent end points. Am J Hyg. 1938 ; 27 : 493-497
[3] Geller C et al. Evaluation de l'activité antiseptique antivirale par une méthode de filtration sur gel. RICAI. Paris. 6 et 7 Décembre 2007

Poster 5 :

Doctoriales de Lorraine 2008 – De la plante au médicament… vectorisation de triterpènes pentacycliques par la gamma cyclodextrine en vu de leur utilisation en thérapeutique.

De la plante au médicament…

Vectorisation de triterpènes pentacycliques par la gamma cyclodextrine en vue de leur utilisation en thérapeutique

Stéphane Fontanay
2° année
Sous la direction de Francine Kedzierewicz & Raphaël E. Duval

SRSMC, Nancy-Université, CNRS, Faculté de Pharmacie, Nancy, France



Les plantes, sources d'anti-infectieux…

Les **triterpènes pentacycliques** sont des molécules présentes dans de nombreux végétaux utilisés dans des contextes pharmacologiques.

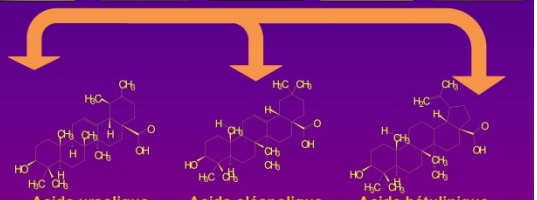
Certaines de ces plantes font même partie du régime alimentaire normal de l'Homme (le romarin, la menthe poivrée, la lavande, l'origan, le thym…).

Plus d'un millier d'articles décrivant des effets biologiques des triterpènes pentacycliques ont été publiés sur ces 10 dernières années (anti-bactérien, anti-cancéreux, hépatoprotecteur, anti-inflammatoire, anti-ulcéreux, anti-hypertenseur, anti-diabétique, antiviral, hypolipémiant, anti-parasitaire …).

Dans la plus part des cas, ces études se rapportent à une pratique traditionnelle de la médecine en Asie (Vietnam, Chine, Corée…), plus rarement en Amérique du Sud (Chili), ou en Afrique.

Malheureusement, du fait de leur structure chimique ces molécules ne sont pas solubles dans l'eau!





Acide ursolique — Acide oléanolique — Acide bétulinique

…non solubles dans l'eau !

Objectif 1 : Rendre ces molécules hydro-solubles

L'eau représente environ 60% à 70% du corps humain.

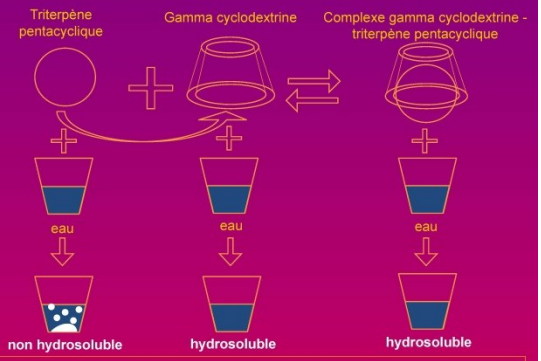
Si on souhaite qu'un médicament se répartisse facilement dans le corps Humain, le meilleur moyen est de le faire diffuser par le sang.

Le sang étant une solution à base d'eau, il est nécessaire que les médicaments soient solubles dans l'eau (hydrosolubles).

Pour rendre une molécule hydrosoluble nous pouvons :
- •Modifier le solvant ici, le sang.
- •Modifier la molécule et risquer de perdre ses activités.
- •Transporter la molécule en l'incluant dans un système hydrosoluble :

→ **la gamma-cyclodextrine.**

Pour confirmer la formation du complexe, nous avons recours à différentes méthodes physico-chimiques telles la RMN, la DSC-TG, l'HPLC… .



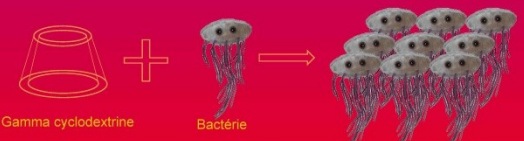
Objectif 2: Vérifier la conservation de l'activité anti-infectieuse

Les activités antibactériennes & antivirales, sont étudiées *in vitro*.

Celles des terpènes ont pu être mises en évidence.

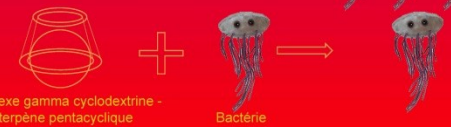
Nous avons montré l'absence d'activité de la gamma cyclodextrine.

Nous avons mesuré une faible activité antibactérienne pour les complexes.





Triterpène pentacyclique — Bactérie



Complexe gamma cyclodextrine - triterpène pentacyclique — Bactérie

Un potentiel thérapeutique non négligeable à optimiser

Nous avons réussi à obtenir des complexes entre les terpènes et la gamma cyclodextrine. Ces complexes sont plus hydrosolubles que les terpènes seuls.

Nous avons perdu une part non négligeable de l'activité antibactérienne des terpènes une fois ceux-ci complexés.

Par la suite, il faudra :

i)Déterminer si d'autres cyclodextrines permettent de rétablir les activités biologiques des terpènes initiaux.

ii) Vérifier si, dans le corps Humain, l'activité biologique n'est pas rétablie par la dégradation de la cyclodextrine dans l'organisme.

Poster 6 :

XI^{ème}JFV 2009 – Développement de protocoles d'essais virucides afin d'évaluer la norme NF EN 14476+A1.

Développement de protocoles d'essais virucides afin d'évaluer la norme NF EN 14476+A1

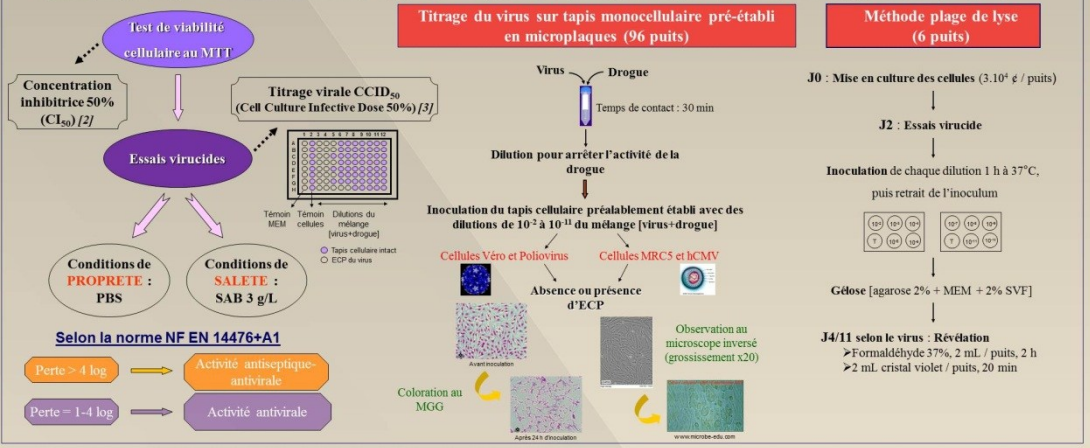
Christelle JOST, Stéphane FONTANAY, Chantal FINANCE, Raphaël E. DUVAL
GEVSM, UMR 7565, Nancy-Université, CNRS, Faculté de Pharmacie, Nancy, France

Introduction :

L'incidence des « infections virales associées aux soins » est actuellement en forte augmentation. Une des approches pour limiter leur incidence est l'utilisation d'agents antiseptiques/désinfectants. Toutefois, nous ne possédons qu'un nombre limité d'informations sur l'efficacité réelle et/ou les spectres d'activité de ces antiseptiques/désinfectants utilisés en routine en milieu hospitalier ou en ville. Il s'avère donc indispensable de disposer de protocoles qui nous permettent d'évaluer les propriétés antiseptiques-antivirales de ces produits et par conséquent de définir au mieux leur utilisation.
La certification de l'activité virucide est spécifiée par la norme AFNOR NF EN 14476+A1 (janvier 2007), seule norme disponible à ce jour [1]. Cette norme recommande d'effectuer les essais sur trois virus nus : le Poliovirus, l'Adénovirus et le Parvovirus B19. L'activité virucide est déterminée comme la différence entre le titre viral obtenu après l'exposition à la drogue à tester, et celui obtenu pour un témoin viral non traité. Le paramètre déterminant pour la validation de l'activité antiseptique/désinfectante est une réduction d'au moins 4 log du titre viral, ce qui correspond à une diminution de la charge virale de 99,99 %.
Nos objectifs ont donc été : i) de mettre au point des protocoles d'essai d'antisepsie antivirale, en adaptant deux des techniques proposées par la norme (le titrage du virus en tapis monocellulaire pré-établi et la méthode plage de lyse) sur le Poliovirus, « considéré » comme le virus le plus résistant qui existe; et ii) de les valider au moyen de la molécule de référence citée dans la norme (le formaldéhyde) et d'autres couramment utilisées (l'alcool à 70° et le glutaraldéhyde).
Nous nous sommes aussi intéressés à développer ces protocoles de virucidie pour un virus enveloppé, fortement endémique : le cytomégalovirus humain (hCMV), non recommandé dans la norme et considéré comme « moins résistant ».

Méthodes :

- Molécules de référence : formaldéhyde (cité dans la norme), alcool 70°, glutaraldéhyde (GTA).
- Virus : Poliovirus (type 1 Lsc-2ab, souche vaccinale de Sabin), Cytomégalovirus humain (hCMV, AD 169).
- Cellules : Vero *[cellules épithéliales cancéreuses de rein de singe vert]* (pour l'infection par le Poliovirus), MRC5 *[fibroblastes pulmonaires d'embryons humains]* (pour l'infection par le hCMV).



Résultats :

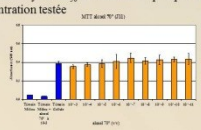
Test au MTT

Poliovirus type 1 Lsc-2ab

Lecture à J4
Alcool 70° : CI_{50} = [6-8°]
GTA : CI_{50} = [0,5-1%]
Formaldéhyde : CI_{50} indéterminée quelque soit la concentration testée

hCMV AD 169

Lecture à J11
Alcool 70° : CI_{50} = [6-8°]
GTA : CI_{50} = [2-2,5%]
Formaldéhyde : CI_{50} indéterminée quelque soit la concentration testée

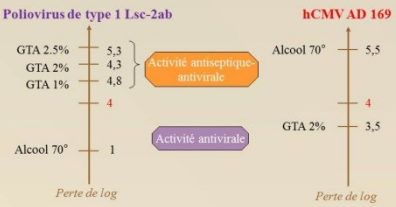


Test au MTT montrant l'effet de l'alcool 70° aux dilutions utilisées dans l'essai virucide (10^{-2} à 10^{-11}) sur la viabilité de cellules MRC5.

Titrage du virus sur tapis monocellulaire pré-établi en microplaques (96 puits)

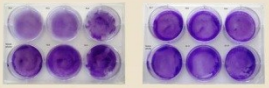
- ECP optimal :
  - **Poliovirus** : **J4** → lyse cellulaire
  - **CMV** : **J11** → ballonisation cellulaire

En condition de propreté et de saleté, après 30 min de contact (n=3)



Méthode plage de lyse (6 puits)

Poliovirus de type 1 Lsc-2ab :



Témoin poliovirus en condition de propreté à J4 :

UFP (Unité Formant Plage) / mL = 7,2 (log)

hCMV AD 169 :

Difficultés dans la mise au point :
Trop grande fragilité de cellules MRC5 dans les conditions expérimentales
ECP non visible avant la mort cellulaire

Conclusions et perspectives :

Au final, nous démontrons que (i) la molécule de référence proposée par la norme (le formaldéhyde) ne peut pas être utilisée dans les essais de virucidie en raison de l'altération qu'elle induit sur des cellules en culture (démontrée par les tests au MTT) ; (ii) après 30 minutes de contact, en conditions de propreté (PBS) et de saleté (SAB 3g/L), dans le cas du Poliovirus, le glutaraldéhyde (1 à 2,5%) est efficace selon la norme (réduction de 4 log du titre viral) et peut être considéré comme molécule de référence pour le Poliovirus, tandis que l'alcool à 70° est inefficace, par contre (iii) dans le cas du hCMV, l'alcool 70° peut être utilisé comme molécule de référence car il possède une activité antiseptique-antivirale alors que le glutaraldéhyde (2%) ne possède qu'une activité antivirale.

En conclusion, il apparaît nécessaire d'identifier au préalable, pour chaque virus testé, une molécule de référence adéquate, avant de pouvoir évaluer des molécules d'action inconnue : il faut prouver la non toxicité de la molécule de référence pour le type cellulaire utilisé et son efficacité sur le virus testé. De plus, les virus devant être testés d'après la norme devraient être réévalués selon les données épidémiologiques actuelles. Par exemple, le poliovirus, classiquement utilisé dans les essais de virucidie et empiriquement considéré comme le virus le « plus résistant », n'a de nos jours plus d'impact endémique grâce à la vaccination. Enfin lorsqu'on réalise les essais de virucidie sur des molécules couramment et historiquement utilisées en milieu hospitalier ; nous démontrons (i) que suivant les molécules antiseptiques/désinfectantes utilisées, nous n'observons pas les mêmes effets en fonction des virus considérés, avec un intérêt limité pour l'alcool à 70° bien que les SHA (solution hydro-alcoolique) soient sans cesse utilisées à l'Hôpital et (ii) une impossibilité à utiliser le formaldéhyde. Nous pouvons aussi nous demander qu'elle serait la faisabilité d'utiliser des désinfectants à base de glutaraldéhyde et les modalités d'utilisation de tels produits, surtout en milieu hospitalier… Il est donc urgent d'être en mesure d'évaluer l'activité réelle des produits antiseptiques/désinfectants, afin de mieux les connaître et de pouvoir les utiliser à bon escient.

[1] AFNOR. Antiseptiques et désinfectants chimiques. *Essai virucide quantitatif de suspension pour les antiseptiques et désinfectants chimiques utilisés en médecine humaine*. Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1). Paris : AFNOR. 2007. Norme Européenne et Française NF EN 14476+A1.
[2] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J Immunol Methods. 1983 ; 65 : 55-63.
[3] Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints, Am J Hyg. 1938 ; 27: 493--497.

Poster 7 :

12°Journée du club français des cyclodextrines – Evaluation de la complexation triterpènes pentacycliques – γ-cyclodextrine par chromatographie liquide haute performance.

ÉVALUATION DE LA COMPLEXATION TRITERPÉNES PENTACYCLIQUES – γ-CYCLODEXTRINE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE.

S. Fontanay, I. Clarot, C. Finance, R.E. Duval & F. Kedzierewicz

Équipe GEVSM, SRSMC, Nancy –Université, CNRS, Faculté de Pharmacie, Nancy, France

Igor.clarot@pharma.uhp-nancy.fr

INTRODUCTION

Les acides ursolique (AU ou acide (3β)-3-hydroxyurs-12-en-28-oïque), oléanolique (AO ou acide 3β-hydroxyolean-12-en-28-oïque) et bétulinique (AB ou acide 3β-hydroxylup-20(29)-en-28-oïque) sont des acides hydroxy pentacycliques triterpenoiques (AHPTs) ($C_{30}H_{48}O_3$; M = 456,88 g/mol). Ces AHPTs font l'objet de nombreuses études biologiques *in vitro* avec, notamment un fort potentiel anti-infectieux, anticancéreux et anti-inflammatoire [1,2]. Ces triterpènes sont très apolaires (log P compris entre 6 et 7) ce qui limite leur utilisation en thérapeutique.

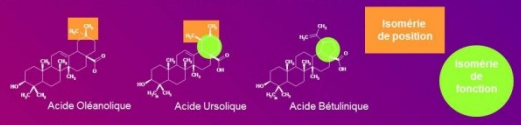


Figure 1 : Structures des différents AHPTs utilisés

L'amélioration de l'hydrosolubilité et donc de la biodisponibilité de substances actives peut être obtenue par la complexation avec des molécules cages telles que les cyclodextrines. Les dimensions des AHPTs ont orienté notre choix vers une cyclodextrine à large cavité : la gamma-cyclodextrine (γ-CD).



Figure 2 : Structure de la γ-Cyclodextrine

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Déterminer par une méthode CLHP i) les constantes apparentes de formations (Kf) des complexes AHPTs-γ-CD, ii) la stœchiométrie des différents complexes obtenus et iii) les paramètres thermodynamiques tels que l'enthalpie (ΔH) ou l'entropie (ΔS) liés à la formation de ces complexes [3].



AHPT non hydrosoluble cyclodextrine complexe hydrosoluble

Figure 3 : Représentation schématique de la complexation AHPTs - γ-Cyclodextrine

MATERIEL ET METHODE

Les différents AHPTs sont injectés sur une colonne de type phases inverses (C18, 12,5 cm, 4 mm d.i., 5 µm) avec une phase mobile méthanol/tampon phosphate 20 mM pH 3,0 (88/12 $V_/_V$) contenant des concentrations croissantes en γ-CD (de 0 à 4 mM). Les injections ont été réalisées à différentes températures (de 25 à 45°C, n=3) pour la détermination des paramètres thermodynamiques.

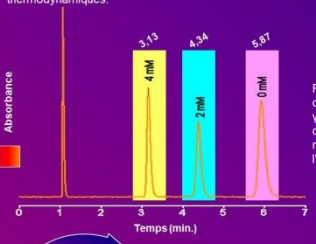


Figure 4 : Représentation des déplacements (suite à l'addition de γ-cyclodextrine à différentes concentrations dans la phase mobile) des chromatogrammes de l'acide ursolique à 25° C.

Calcul des facteurs de capacités k ' des différents AHPTs en fonction de la concentration en γ-cyclodextrines et de la température.

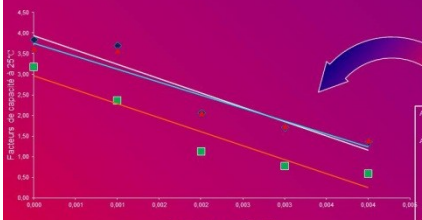


Figure 5 : Facteurs de capacités k' des différents AHPTs en fonction de la concentration en γ-cyclodextrine à 25°C
k(AHPTs)=f[γ-CD]
Marques AU en bleu - AO en rouge - AB en vert

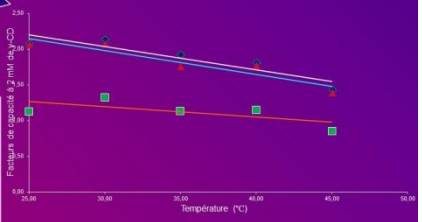


Figure 6 : Facteurs de capacités k' des différents AHPTs en fonction de la température à 2 mM en γ-cyclodextrine
k(AHPTs)=f(T)
Marques AU en bleu - AO en rouge - AB en vert

AHPTs	Température (°C)	γ-CD concentration (mM) 0	1	2	3	4
AU	25	3,83 ± 0,05	3,71 ± 0,00	2,08 ± 0,02	1,72 ± 0,01	1,37 ± 0,01
	30	3,74 ± 0,12	3,72 ± 0,08	2,13 ± 0,05	1,89 ± 0,03	1,42 ± 0,03
	35	3,47 ± 0,01	2,87 ± 0,10	1,92 ± 0,01	1,71 ± 0,02	1,33 ± 0,03
	40	2,34 ± 0,01	2,30 ± 0,01	1,81 ± 0,01	1,64 ± 0,02	1,04 ± 0,02
	45	2,66 ± 0,00	2,40 ± 0,03	1,43 ± 0,01	1,46 ± 0,02	1,20 ± 0,02
AO	25	3,63 ± 0,01	3,39 ± 0,02	2,08 ± 0,05	1,76 ± 0,01	1,41 ± 0,01
	30	3,57 ± 0,13	3,66 ± 0,00	2,07 ± 0,01	1,99 ± 0,06	1,55 ± 0,03
	35	3,34 ± 0,01	2,78 ± 0,11	1,76 ± 0,06	1,49 ± 0,06	1,38 ± 0,03
	40	2,35 ± 0,02	2,20 ± 0,02	1,77 ± 0,02	1,45 ± 0,01	1,07 ± 0,03
	45	2,53 ± 0,04	2,26 ± 0,01	1,39 ± 0,01	1,43 ± 0,00	1,26 ± 0,02
AB	25	3,27 ± 0,05	2,36 ± 0,01	1,13 ± 0,03	0,78 ± 0,02	0,59 ± 0,00
	30	3,32 ± 0,04	2,44 ± 0,02	1,33 ± 0,04	0,92 ± 0,01	0,79 ± 0,03
	35	2,89 ± 0,03	1,96 ± 0,00	1,13 ± 0,02	0,92 ± 0,04	0,66 ± 0,02
	40	2,32 ± 0,02	1,99 ± 0,02	1,15 ± 0,00	0,82 ± 0,01	0,76 ± 0,00
	45	2,22 ± 0,03	1,67 ± 0,01	0,86 ± 0,01	0,80 ± 0,00	0,71 ± 0,02

Tableau : Facteurs de capacité k' de l'AU, AO et AB dans une phase mobile méthanol/tampon contenant de 0 à 4 mM de γ-CD et dont la température a été modulée de 25°C à 45°C.

R Ln Kf = f (1/T)

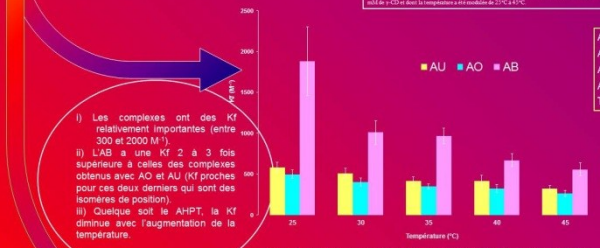


Figure 7 : Constantes de formation apparente K_f (M^{-1}) pour le complexe AHPTs - γ-CD, avec AU, AO and AB dans une phase mobile méthanol-tampon dont la température a été modulée de 25,0°C à 45,0 °C.

AHPTs	T (K)	ΔH°_f	ΔS°_f	$T\Delta S^\circ_f$	ΔG°_f
AU	298	-21953 ± 2812	-21 ± 9	-6156	-15797
AO	298	-23436 ± 1946	-27 ± 6	-8104	-15332
AB	298	-42585 ± 7690	-81 ± 25	-24251	-18334

Table 2 : Données thermodynamiques sur l'inclusion des HPTAs à 25°C.

i) Les complexes ont des Kf relativement importantes (entre 300 et 2000 M^{-1}).
ii) L'AB a une Kf 2 à 3 fois supérieure à celles des complexes obtenus avec AO et AU (Kf proches pour ces deux derniers qui sont des isomères de position).
iii) Quelque soit le AHPT, la Kf diminue avec l'augmentation de la température.

Les valeurs de ΔH, toutes très supérieures aux valeurs de ΔS (facteur 1000), montrent que la complexation est principalement dirigée par l'enthalpie et donc que la formation des complexes est énergétiquement favorable.

Lorsque de la γ-CD est ajoutée à la phase mobile, le facteur de rétention du soluté, k', est affecté comme décrit par l'équation (1) pour un complexe 1:1 [4]:

$1 / k = (1/k0) + (Kf/k0) [(CD)_m]$ (équation 1)

Et par l'équation (1 ') pour un complexe 1:2

$1 / k = (1/k0) + (Kf/k0) [(CD)_m^2]$ (équation 2)

Les coefficients de déterminations sont meilleurs avec l'équation 1 qu'avec l'équation 2 : la stœchiométrie est de type 1:1 (modèle du 1° degré).

AHPTs	Température(°C)	R^2 1:1	R^2 1:2
AU	25	0,95	0,94
	30	0,94	0,94
	35	0,93	0,84
	40	0,85	0,96
	45	0,90	0,8
AO	25	0,95	0,96
	30	0,91	0,89
	35	0,95	0,86
	40	0,83	0,95
	45	0,87	0,73
AB	25	0,97	0,96
	30	0,97	0,92
	35	0,98	0,95
	40	0,95	0,88
	45	0,92	0,73

Table 3 : Coefficients de détermination (R^2) découlant des équations (1) & (2) (respectivement pour des modèles de complexation HPTAs - γ-CD 1:1 & 1:2).

CONCLUSIONS

Nous avons montré que la formation de complexes AHPTs - γ-cyclodextrine est thermodynamiquement favorable avec des Kf significativement élevés, notamment pour AB (2000 M^{-1}).

Les évaluations en cours i) physico chimie par RMN nous permettrons de valider i) la stœchiométrie 1:1 des complexes formés ainsi que le type de complexe (*i.e.* inclusion *vs.* association) ii) biologique *in-vitro* ii) le maintien des propriétés bioactives des AHPTS lors de leur complexation.

[1] Liu J. J Ethnopharmacol. 2005; 100(1-2):92-94.
[2] Fontanay S, Grare M, Mayer J, Finance C, Duval RE. J Ethnopharmacol. 2008; 120(2):272-276.
[3] Clarot I, Clédat D, Guillaume YC, Cardot PJP. Chromatographia. 2001; 54:447-453.
[4] Mohseni RM, Hurtebise RJ. Journal of Chromatography 1990; 499:395-410.

Poster 8 :

SFC Grand Est 2010 - Projet AntiBact-Chem

Création d'une Plate-forme de Criblage de Molécules à visée Antibactérienne.

Projet AntiBact-Chem

Création d'une Plate-forme de Criblage de Molécules à visée Antibactérienne

S. Fontanay, M. Grare, C. Finance, R.E. Duval
SRSMC, Nancy-Université, CNRS, Nancy, France
raphael.duval@srsmc.uhp-nancy.fr

OBJECTIFS

❶ Découvrir de nouvelles molécules antibactériennes (antibiotiques, antiseptiques, décontaminants-désinfectants) avec un mécanisme d'action innovant.

❷ Valoriser les chimiothèques universitaires et autres (ex : Chimiothèque Nationale du CNRS)

❸ Intégrer le Réseau National des Plateformes de Criblage, rattaché au CNRS

ORGANISME DEMANDEUR

Molécules d'origine naturelle

Molécules d'origine synthétique

Plate-forme AntiBact-Chem

❶ Évaluation de l'activité antibactérienne

- Méthode de microdilution en milieu liquide (Mueller Hinton)
- Recommandations CA-SFM[2] et CLSI[3]
- Concentrations testées : 128 à 0,5 µg/mL
- 5 souches de référence : *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 & 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *P. aeruginosa* ATCC 27853
- n = 3

Si CMI < 64 µg/mL

❷ Évaluation de la toxicité sur cellules eucaryotes

- Cellules HaCaT ou MRC-5
- Culture en plaques 96 puits fond plat
- Tests de viabilité : MTT et/ou test de cytotoxicité : LDH
- Évaluation à 24 et 48 h
- Concentrations testées : 64 à 0,25 µg/mL
- n = 3
- Détermination de l'Index de Sélectivité (IS = CI_{50} ou CC_{50} / CMI)

Si molécule non cytotoxique

❸ Évaluation du spectre d'activité antibactérienne

- Méthode de microdilution en milieu liquide (Mueller Hinton)
- Recommandations CA-SFM[2] et CLSI[3]
- Concentrations testées : 128 à 0,5 µg/mL
- Catalogue de 170 souches (Entérobactéries, Bacilles à Gram négatifs non fermentants, Staphylocoques, Streptocoques, Entérocoques, Bacilles à Gram positif)
- Choix en fonction du spectre initial et des applications envisagées

PARTENARIATS ACTUELS

LOCAL :
UMR 7565, Nancy-Université, CNRS (équipes GEVSM, SUCRES, SOR...)
LERMAB, EA 4370 (Pr C. Gérardin)

NATIONAL :
CERMN, EA 3915, Université de Caen Basse-Normandie (Pr S. Rault)
ENSCM UMR 5032, Université de Montpellier (Pr C. Grison)
Société Française d'Ethnopharmacologie (Pr J. Fleurentin)

INTERNATIONAL :
Finnish Forest Research Institute, Rovianemi, Finland (Dr F. Martz, Dr R. Peltola)

PERSPECTIVES

- Étude du ou des mécanismes d'action des composés : développement d'une technique par Cytométrie de Flux pour évaluer l'action des composés au niveau des parois bactériennes (détermination des changements de perméabilité membranaire). Grare M., Lafosse S., Regnouf-de-Vains J.B., Finance C. & Duval R.E. 48th ICAAC/ 46th IDSA, Washington, DC, USA, 25-28 October 2008.

- Mise au point du procédé pour la recherche de nouveaux antifongiques avec évaluation sur des champignons d'intérêt médical (*Candida albicans, Aspergillus sp.*)

REFERENCES

Mourer M., Duval R.E., Finance C., Regnouf de Vains J.-B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2006), 16, 2960-2963.
Grare M., Mourer M., Fontanay S., Regnouf de Vains J.-B., Finance C., Duval R.E. *J. Antimicrob. Chemother.* (2007), 60, 575-581.
Grare M., Fontanay S., Cornil C., Finance C., Duval R.E. *J. Microbiol. Methods* (2008) 75, 156-159.
Grare M., Massimba Dibama H., Lafosse S., Ribon A., Mourer M., Regnouf de Vains J.B., Finance C., Duval R.E. *Clin. Microbiol. Infect.* (2010) 16, 432-438.

Fontanay S., Finance C. & Duval R.E. IFRPNET 2007, 8th International Meeting: Biosynthesis and Function of Isoprenoids in Plants, Micro-organisms and Parasites, Strasbourg, April 30-May 4 2007.
Fontanay S., Grare M., Mayer J., Finance C., Duval R.E. *J. Ethnopharmacol.* (2008) 120, 272-276.

Grare M., Faïs T., Lesnard A., Lancelot J.C., Rault S., Finance C. & Duval R.E. 27ème RICAI, Paris, 6-7 décembre 2007.
Grare M., Michel A.-S., Lesnard A., Lancelot J.C., Rault S., Finance C. & Duval R.E. 28ème RICAI, Paris, 4-5 décembre 2008.

Massimba Dibama H., Clarot I., Fontanay S., Ben Salem A., Mourer M., Finance C., Duval R.E., Regnouf de Vains J.B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2009) 19, 2679-2682.
Mourer M., Massimba Dibama H., Fontanay S., Grare M., Duval R.E., Finance C., Regnouf de Vains J.B. *Bioorg. Med. Chem.* (2009) 17, 5496-5509.

Martz F., Peltola R., Fontanay S., Duval R.E., Julkunen-Tiitto R., Stark S. *J. Agri. Food Chem.* (2009) 57, 9575-9584...

Stéphane Fontanay.

UMR 7565, Université de Lorraine-CNRS

Complexation de triterpènes pentacycliques par des cyclodextrines

Caractérisation physicochimiques et activités biologiques

312 pages.

Résumé

Le manque de thérapies innovantes en chimiothérapie humaine incite la communauté scientifique à s'intéresser à de nouvelles sources de composés bioactifs. Nous pouvons citer les métabolites secondaires de plantes, auxquels appartiennent les acides hydroxy pentacycliques triterpénoiques (AHPTs) et plus particulièrement les Acides Ursolique (AU), Oléanolique (AO) et Bétulinique (AB). Ces molécules font l'objet de nombreuses études qui tendent à démontrer leurs propriétés : anti-infectieuses, anticancéreuses, antiprolifératives, anti-inflammatoires, hépatoprotectrices. Le principal obstacle à leur utilisation à des fins thérapeutiques, reste l'insolubilité de ces AHPTs dans l'eau. L'objectif de ce travail a donc été d'augmenter leur hydrosolubilité.

Dans un premier temps, en accord avec les recommandations et/ou normes existantes, nous avons démontré que le spectre d'activité antibactérienne de l'AU et de l'AO se limitait aux bactéries à Gram positif. Aucun AHPT n'a montré d'activité antifongique. Seul l'AB a montré une activité intéressante sur le Cytomégalovirus humain (hCMV) ; aucune activité antivirale n'ayant été retrouvée sur le Poliovirus. Enfin, l'AB, mais encore plus l'AU ont montré une activité anticancéreuse à l'encontre de cellules modèles de leucémie myéloïde chronique (LMC).

Dans un deuxième temps, nous avons procédé à la fabrication et à l'étude de complexes entre les AHPTs et des cyclodextrines. Nous avons retenu la gamma-cyclodextrine (γ-CD), qui présentait l'avantage de complexer les 3 AHPTs avec une constante de formation « moyenne » à « élevée ». Ces complexes AHPTs :γ-CD ont été caractérisés en utilisant diverses techniques : chromatographiques, thermiques et spectrométriques. Nous avons conclu à l'obtention de complexes d'inclusion qui ont permis d'augmenter la solubilité des AHPTs.

Dans une dernière partie, nous avons évalué les activités biologiques des complexes AHPTs : γ-CD. Les résultats montrent que les complexes AU : γ-CD et AO : γ-CD restent actifs à l'encontre des bactéries à Gram positif (mais avec une efficacité plus faible) ; tandis que le complexe AB : γ-CD se révèle être actif sur certaines bactéries. Le complexe AB : γ-CD, et de façon surprenante le complexe AU : γ-CD présentent une activité antivirale à l'encontre du hCMV. Enfin, la diminution de la cytotoxicité liée à la complexation des AHPTs accroit l'intérêt des molécules d'AU et d'AB sur les cellules de LMC.

Mots clés : AHPTS, complexation, gamma-cyclodextrine, CLHP, ACD, H1-RMN, activités anti-infectieuses, anticancéreuses.

Complexation of pentacyclic triterpenes by cyclodextrines

Physicochemical characterization and biological activities

Summary

The lack of innovative therapies in human chemotherapy incites the scientific community to be interested in new sources of bioactive compounds. We can quote the secondary metabolites of plants, to which belong hydroxy pentacyclic triterpene acids (HPTAs) and more particularly Ursolic (UA), Oleanolic (OA) and Betulinic Acids(BA). These molecules are the subjetc of numerous studies which tend to demonstrate their properties: anti-infective, anticancer, antiproliferatives, anti-inflammatory and hepatoprotectrive. The main obstacle to their use in therapeutic purposes stays the insolubility of these AHPTs in the water. Thus the objective of this work was to increase their hydrosolubility.

At first, in agreement with the recommendations and/or the existing standards, we demonstrated that the antibacterial spectra of UA and OA are limited to Gram-positive bacteria. No HPTA showed antifungal activity. Only the BA showed an interesting antiviral activity on human Cytomegalovirus (hCMV); no antiviral activity was on Poliovirus. Finally, the BA, but even more UA showed an anticancer activity against cellular model of chronic myeloid leukemia (CML).

Secondly, we proceeded to the manufacturing and to the study of complexes between HPTAs and cyclodextrines. We retained gamma-cyclodextrine (γ-CD), which presented the advantage to complex the 3 AHPTs with a constant of "average" to "raised". These HPTAs:γ-CD complexes were characterized by using diverse techniques: chromatographic, thermal and spectrometric. We concluded in the obtaining of inclusion complexes which allowed increasing the solubility of the HPTAs.

In a last part, we estimated the biological activities of the HPTAs:γ-CD complexes. The results show that the UA:γ-CD and OA:γ-CD complexes remain active against Gram-positive bacteria (but with a weaker efficiency); whereas the BA:γ-CD complex shows to be active on certain bacteria. The BA:γ-CD complex, and in a surprising way the UA:γ-CD complex presents an antiviral activity against the hCMV. Finally, the decrease of the cytotoxicity linked to the complexation of the HPTAs believes the interest of UA and of BA on CML cells.

Key words : hydroxy pentacyclic triterpene acids (HPTAs), complexation, gamma-cyclodextrine, biological activities (anti-infectious, anticancerous), analytical techniques (HPLC, DSC, H^1-MNR).