



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY 1**

**2011**

---

**FACULTE DE PHARMACIE**

**MEMOIRE**  
**du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
**de PHARMACIE SPECIALISEE**

Soutenu devant le Jury Interrégional

**Le 09 Mai 2011**

Par **Chloé GELLER**

Née le 06 Octobre 1979

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

**THESE**  
**pour le DIPLOME D'ETAT**  
**de DOCTEUR en PHARMACIE**

---

**Antisepsie-désinfection antivirale :**  
**Pertinence du choix des modèles viraux pour un usage**  
**en Etablissements de Soins**

---

**Membres du Jury**

Président : Pr. Chantal Finance, PU-PH, Faculté de Pharmacie, UHP Nancy 1

Juges : Pr. Jean Freney, PU-PH, Faculté de Pharmacie, UCBL Lyon 1  
Pr. Alain Le Faou, PU-PH, Faculté de Médecine, UHP Nancy 1  
Dr. Patricia Franck, Praticien Hospitalier, Maternité Régionale de Nancy  
Dr. Raphaël E. Duval, Maître de conférences, Faculté de Pharmacie, UHP Nancy 1

**UNIVERSITÉ Henri Poincaré, NANCY 1**  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**  
**Année universitaire 2010-2011**

**DOYEN**

Francine PAULUS

***Vice-Doyen***

Francine KEDZIEREWICZ

***Directeur des Etudes***

Virginie PICHON

***Président du Conseil de la Pédagogie***

Bertrand RIHN

***Président de la Commission de la Recherche***

Christophe GANTZER

***Président de la Commission Prospective Facultaire***

Jean-Yves JOUZEAU

***Référent de la Cellule de Formations Continue et Individuelle***

Béatrice FAIVRE

**Responsable ERASMUS :**

Francine KEDZIEREWICZ

**Responsable de la filière Officine :**

Francine PAULUS

**Responsables de la filière Industrie :**

Isabelle LARTAUD,  
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du Collège d'Enseignement**

Jean-Michel SIMON

**Pharmaceutique Hospitalier :**

**Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. :**

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :**

Bertrand RIHN

**DOYENS HONORAIRES**

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS EMERITES**

Jeffrey ATKINSON

Marie-Madeleine GALTEAU

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Thérèse GIRARD

**MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES**

Monique ALBERT

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Maurice HOFFMANN  
 Michel JACQUE  
 Lucien LALLOZ  
 Pierre LECTARD  
 Vincent LOPPINET  
 Marcel MIRJOLET  
 François MORTIER  
 Maurice PIERFITTE  
 Janine SCHWARTZBROD  
 Louis SCHWARTZBROD

Jocelyne COLLOMB  
 Bernard DANGIEN  
 Marie-Claude FUZELLIER  
 Françoise HINZELIN  
 Marie-Andrée IMBS  
 Marie-Hélène LIVERTOUX  
 Bernard MIGNOT  
 Jean-Louis MONAL  
 Dominique NOTTER  
 Marie-France POCHON  
 Anne ROVEL  
 Maria WELLMAN-ROUSSEAU

#### **ASSISTANTS HONORAIRES**

Marie-Catherine BERTHE  
 Annie PAVIS

#### **Faculté de Pharmacie**

#### **Présentation**

##### **ENSEIGNANTS**

Section  
 CNU\*

Discipline d'enseignement

#### **PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Chantal FINANCE	82	Virologie, Immunologie
Jean-Yves JOUZEAU	80	Bioanalyse du médicament
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique

#### **PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

Gilles AULAGNER	86	Pharmacie clinique
Jean-Claude BLOCK	87	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Max HENRY	87	Botanique, Mycologie
Pierre LABRUDE	86	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie

Pierre LEROY	85	Chimie physique
Philippe MAINCENT	85	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	32	Chimie organique
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Louis MERLIN	87	Biologie cellulaire
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire

#### MAITRES DE CONFÉRENCES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Nathalie THILLY	81	Santé publique

#### MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	87	Parasitologie
Mariette BEAUD	87	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT	86	Communication et santé
Isabelle BERTRAND	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN	86	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	86	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	85	Chimie Physique
Cédric BOURA	86	Physiologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël COULON	87	Biochimie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Roudayna DIAB	85	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie
Béatrice FAIVRE	87	Hématologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Caroline GAUCHER-DI STASIO	85/86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Frédéric JORAND	87	Santé publique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie
Francine KEDZIEREWICZ	85	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques

Faten MERHI-SOUSSI	87	Hématologie
Christophe MERLIN	87	Microbiologie
Blandine MOREAU	86	Pharmacognosie
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Francine PAULUS	85	Informatique
Christine PERDICAKIS	86	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Mohamed ZAIIOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique

#### PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
--------------------	----	------------

#### PROFESSEUR AGREGÉ

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

#### \*Discipline du Conseil National des

##### Universités :

80<sup>ème</sup> et 85<sup>ème</sup> : Sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81<sup>ème</sup> et 86<sup>ème</sup> : Sciences du médicament et des autres produits de santé

82<sup>ème</sup> et 87<sup>ème</sup> : Sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32<sup>ème</sup> : Chimie organique, minérale, industrielle

11<sup>ème</sup> : Langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

## SERMENT DES APOTHICAIRES



**J**e jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

**D'**honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

**D'**exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

**D**e ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

**Q**ue les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

**Q**ue je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES  
DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».



## REMERCIEMENTS

---

Avant de vous présenter les résultats de ce travail, je tiens tout particulièrement à apporter mes remerciements,

### **Aux membres du Jury**

A Mme le Professeur Finance,

Recevez mes plus vifs remerciements pour m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire,  
Pour la confiance que vous m'avez accordée au cours de ces années ainsi que pour votre soutien et vos judicieux conseils,  
Je tiens à vous adresser toute ma gratitude et mon profond respect.

A M. Le Professeur Freney,

Pour accepter une fois encore d'évaluer mon travail. Je suis très fière et honorée de votre présence et je vous adresse encore une fois toute ma gratitude et ma pour toutes ces années de conseils judicieux et de soutien.

A Mr. Le Professeur Le Faou,

Pour me faire l'honneur de relire et juger ce travail, je vous adresse toute ma reconnaissance.

A Mme Patricia Franck, Praticien hospitalier,

Pour avoir accepté d'examiner ce travail et de participer à son évaluation, je vous adresse mes plus vifs remerciements.

A M. Raphaël Duval, Maître de Conférences,

Pour tous tes conseils, ton attention, ton amitié.

### **A l'équipe du GEVSM et plus particulièrement,**

A Mr le Professeur Regnouf-de-Vains,

Pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe du GEVSM,  
Pour tes conseils physico-chimiques,  
Pour avoir permis la synthèse de ces calix[4]arènes prometteurs,  
Je t'adresse toute ma reconnaissance.

A Mme Francine Kedzierewicz, Maître de Conférences,

Pour vos conseils pratiques (notamment diététiques !) et surtout pour votre soutien moral.

A Mme Catherine Colson, notre inestimable secrétaire,

Pour votre gentillesse incroyable, votre disponibilité et votre amitié.

A Stéphane Fontanay,  
Pour nos questionnements (et nos réponses),

A Barbara Proust,  
Pour nos discussions qui m'ont apporté rire et soutien,

A Céline Vidaillac,  
En te souhaitant plein de belles choses au sein du GEVSM,

Sans oublier nos chimistes *Max et Hugues*, sans qui je n'aurais pas pu tester de molécules, ce qui aurait cruellement manqué à ce travail...

**A l'équipe d'informatique de Mme Paulus,**

A Francine pour m'avoir accueillie dans ton équipe et pour m'avoir fait confiance dans la dispensation des enseignements, je t'adresse mes plus sincères remerciements,

A Alexandrine, Sébastien et Pierre-Colin,  
Avec qui l'enseignement est un plaisir et aussi (et surtout) pour votre amitié,

A Pierre et Pierre, Rachid et Thérèse,  
Pour leur aide technique indispensable et pour leurs petits gâteaux...

A tous ceux avec qui j'ai travaillé par le passé et au cours de ces dernières années,  
Notamment l'équipe du Laboratoire de Virologie du CHU de Nancy,  
Pour m'avoir permis d'apprendre chaque jour de nouvelles choses à vos côtés,  
Pour tous les bons moments passés, merci !

**A mes proches,**

A ma Famille et A mes amis, et bien sûr, A mon Amoureux et à "Bob"  
A qui je dédicace ce travail parce que sans eux rien n'aurait été possible.

Cette liste n'est pas et ne peut pas être exhaustive. J'ai la chance d'être merveilleusement bien entourée et pour vous remercier, c'est avec joie que je tâcherai d'être à la hauteur de vos espérances

## SOMMAIRE

---

<b>Remerciements .....</b>	<b>1</b>
<b>Sommaire .....</b>	<b>3</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>6</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>7</b>
<b>Abréviations.....</b>	<b>8</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>10</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>12</b>
<b>1 Infections virales et environnement hospitalier.....</b>	<b>12</b>
1.1 Risques viraux au sein des établissements de soins.....	12
1.2 Un arsenal préventif et thérapeutique insuffisant.....	17
1.3 Modes de propagation des ILS à l'hôpital .....	20
<b>2 L'antisepsie-désinfection antivirale .....</b>	<b>23</b>
2.1 Historique .....	23
2.2 Les grandes classes d'ATS-D .....	24
2.3 Méthodes d'évaluation de l'activité ATS-D .....	34
2.4 L'évaluation de l'activité ATS antivirale et ses particularités .....	36
2.5 Une seule norme Européenne : la norme NF EN 14476+A1 .....	40
<b>3 Le poliovirus : un modèle viral établi pour les tests d'ATS-D antivirale .....</b>	<b>42</b>
3.1 Le poliovirus : un membre de la famille des <i>Picornaviridae</i> .....	42
3.2 Le poliovirus : un virus inscrit dans l'histoire .....	43
3.3 Caractéristiques virologiques du poliovirus .....	44
3.4 Cycle cellulaire du poliovirus.....	46
3.5 Pouvoir pathogène du poliovirus et traitement.....	47
3.6 Traitement, vaccins et programme d'éradication.....	48
3.7 Survie du poliovirus dans l'environnement.....	51
3.8 Sensibilité du poliovirus aux ATS-D .....	52
<b>4 Les calixarènes .....</b>	<b>53</b>
4.1 Historique et structure .....	53
4.2 Activités biologiques des calixarènes .....	54
<b>Principes et buts de l'étude.....</b>	<b>58</b>
<b>Matériels et Méthodes .....</b>	<b>59</b>

<b>1</b>	<b>Matériels et réactifs .....</b>	<b>59</b>
1.1	Matériels.....	59
1.2	Réactifs .....	60
1.3	Matériel biologique .....	61
<b>2</b>	<b>Méthodes .....</b>	<b>62</b>
2.1	Culture cellulaire et obtention d'un stock de cellules .....	62
2.2	Culture et obtention de stocks de virus de poliovirus humain, souche Lsc2ab .....	62
2.3	Evaluation du titre viral par la méthode des dilutions limites .....	62
2.4	Evaluation physico-chimique de la rétention des molécules par les colonnes de Séphadex™ .....	65
2.5	Evaluation biologique de la rétention de molécules par les colonnes de Séphadex™ .....	67
2.6	Protocole d'évaluation de l'activité antivirale ATS-D .....	68
	<b>Résultats .....</b>	<b>74</b>
1	<b>Titration du PV-1 : Optimisation et cinétique .....</b>	<b>74</b>
2	<b>Non rétention du PV-1 par les colonnes de Séphadex™ .....</b>	<b>76</b>
3	<b>Cytotoxicité et Rétention de la CHX et du C[4]S-BTZ .....</b>	<b>77</b>
3.1	Rétention de la CHX par les colonnes de Séphadex™ G-25 .....	77
3.2	Rétention du C[4]S-BTZ par les colonnes de Séphadex™ G-25 .....	81
4	<b>Activité de la CHX sur le PV-1 Lsc2ab .....</b>	<b>83</b>
5	<b>Activité du C[4]S-BTZ sur le PV-1 Lsc2ab .....</b>	<b>85</b>
6	<b>Etudes préliminaires à l'évaluation de l'activité ATS-D antivirale de la Bétadine® .....</b>	<b>87</b>
6.1	Analyse spectrophotométrique de la PVP-I en solution aqueuse.....	87
6.2	Analyse spectrophotométrique de la Bétadine® .....	91
6.3	Analyse statistique .....	94
	<b>Discussion .....</b>	<b>99</b>
1	<b>Activités (ATS-D ?) antivirales de la CHX et du C[4]S-BTZ sur le PV-1.....</b>	<b>99</b>
1.1	Activité ATS-D antivirale de la CHX.....	100
1.2	Activité antivirale (ATS-D) du C[4]S-BTZ.....	100
2	<b>Vers la neutralisation de solutions complexes ?.....</b>	<b>102</b>
3	<b>Importance du choix de la souche virale lors des tests d'ATS antivirale .....</b>	<b>103</b>
3.1	Critères de choix.....	103
3.2	Quels sont les recommandations officielles ? .....	105
3.3	HCoV 229E vs. PV-1 Lsc2ab ? Atouts et limites .....	105
3.4	Autres modèles viraux ? .....	107

<b>Conclusions et perspectives .....</b>	<b>110</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>111</b>
<b>Annexe 1 : Activité antivirale d'ATS-D courants .....</b>	<b>124</b>
<b>Annexe 2 : Analyses statistiques sur la PVP-I et la Bétadine® .....</b>	<b>127</b>

## LISTE DES FIGURES

---

Figure 1 : Principe de la filtration sur gel.....	38
Figure 2 : Le PV, un virus inscrit dans l'histoire .....	44
Figure 3 : Structure du PV-1 et de son génome .....	45
Figure 4 : Cycle virale du PV .....	46
Figure 5 : Cas de PPAV répertoriés de Septembre 2010 à Mars 2011 .....	49
Figure 6 : Nouveaux cas de poliomyélite répertoriés en 2010 due aux PV sauvages .....	50
Figure 7 : Structure générale d'un calix[4]arène .....	53
Figure 8 : Evaluation du titre viral par la méthode de Reed et Muench .....	64
Figure 9 : Les différentes étapes de la fabrication des colonnes de Séphadex™ .....	68
Figure 10 : Principe de l'évaluation de l'activité ATS-D antivirale .....	70
Figure 11 : Optimisation du titrage du PV-1 sur cellules L-132 .....	74
Figure 12 : Cinétique du titrage du PV-1 sur cellules L-132 .....	75
Figure 13 : Non rétention du PV-1 par les colonnes de Séphadex™ .....	76
Figure 14 : Structure du digluconate de chlorhexidine (CHX) .....	77
Figure 15 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible de la CHX.....	79
Figure 16 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible des filtrats de CHX.....	80
Figure 17 : Structure du C[4]S-BTZ .....	81
Figure 18 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible du C[4]S-BTZ.....	82
Figure 19 : Validation des contrôles des tests d'ATS-D antivirale de la CHX sur le PV-1.....	84
Figure 20 : Activité de la CHX à $10^{-3}$ mol.L <sup>-1</sup> sur le PV-1 Lsc2ab.....	85
Figure 21 : Validation des contrôles des tests d'ATS-D antivirale du C[4]S-BTZ sur le PV-1 .....	86
Figure 22 : Activité du C[4]S-BTZ à $10^{-3}$ mol.L <sup>-1</sup> sur le PV-1 Lsc2ab .....	87
Figure 23 : Spectres de la PVP-I en solution aqueuse (1/2) .....	88
Figure 24 : Spectres de la PVP-I en solution aqueuse (2/2) .....	88
Figure 25 : Colonne de Séphadex™ G-25 après filtration d'une solution aqueuse de PVP-I à 5%.....	90
Figure 26 : Spectres des filtrats de solutions de PVP-I à 5%, 2% et 1%.....	90
Figure 27 : Spectres d'absorption dans l'UV visible de la Bétadine® .....	92
Figure 28 : Spectres des filtrats de solutions de Bétadine® à 5%, 2% et 1%.....	93
Figure 29 : Comparaison des absorbances obtenues entre la PVP-I et la Bétadine® .....	94
Figure 30 : Activités de la CHX et du C[4]S-BTZ sur le HCoV 229E et sur le PV-1 .....	99

## LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau 1 : Les virus respiratoires responsables d'ILS .....	13
Tableau 2 : Conditions et durée de survie de différent virus .....	22
Tableau 3 : Les différentes catégories d'essais permettant l'évaluation de l'activité d'un biocide.....	40
Tableau 4 : Conditions d'essai requises par la norme NF EN 14476+A1 .....	41
Tableau 5 : Comparaison de la survie des virus entériques sur différentes surfaces .....	51
Tableau 6 : Comparaison des taux de survie du HCoV 229E et du PV-1 .....	52
Tableau 7 : Exemples d'activités antivirales d'ATS-D courants .....	52
Tableau 8 : Composition des suspensions à filtrer lors de l'évaluation de l'activité ATS-D antivirale d'un produit.....	71
Tableau 9 : $CI_{50}$ et des $CC_{50}$ de la CHX sur les cellules L-132.....	78
Tableau 10 : Taux de rétention de la CHX par les colonnes de Séphadex™ G-25 .....	80
Tableau 11 : $CI_{50}$ et des $CC_{50}$ du C[4]S-BTZ sur cellules L-132 .....	82
Tableau 12 : TR des solutions aqueuses de PVP-I à 5%, 2% et 1% (m/v) .....	91
Tableau 13 : TR de la Bétadine® à 5%, 2% et 1% (m/v) .....	93
Tableau 14 : Calculs préliminaires pour la comparaison de la PVP-I et de la Bétadine® à 290 nm .....	95
Tableau 15 : Calculs préliminaires pour la comparaison de la PVP-I et de la Bétadine® à 355 nm .....	96
Tableau 16 : Comparaison des TR de la PVP-I et de la Bétadine® .....	98

## ABREVIATIONS

---

AdV .....	<u>A</u> dénov <u>i</u> rus
ASTM .....	" <u>A</u> merican <u>S</u> ociety for <u>T</u> esting and <u>M</u> aterials" (Organisme Américain pour l'évaluation des méthodes d'analyse et du matériel)
ATS .....	<u>A</u> ntisepsie
ATS-D .....	<u>A</u> ntiseptique(s)- <u>d</u> ésinfectant(s)
BT .....	<u>B</u> leu de <u>t</u> rypan
C[4]S .....	<u>c</u> alix[4]arène- <i>tetra-para</i> - <u>s</u> ulfonate de sodium
C[4]S-BTZ .....	1,3-bis( <u>b</u> ithiazolyl)- <i>tetra-para</i> - <u>s</u> ulfonato- <u>c</u> alix[4]arène
CC <sub>50</sub> .....	" <u>C</u> oncentration <u>c</u> ytotoxique <u>50</u> %" (concentration tuant 50% des cellules)
CCID <sub>50</sub> .....	" <u>C</u> ell culture <u>i</u> nfective dose <u>50</u> %" (dose infectant 50% des cellules)
CHX .....	<u>C</u> hlor <u>h</u> exidine
CI <sub>50</sub> .....	" <u>C</u> oncentration <u>i</u> nhibitrice <u>50</u> %" (concentration inhibant la croissance de 50% des cellules)
CMV .....	<u>C</u> ytomégalov <u>i</u> rus
CoV .....	<u>C</u> oronav <u>i</u> rus
ECP .....	<u>E</u> ffet <u>c</u> ytopathogène
EDTA .....	" <u>E</u> thylene <u>d</u> iamine <u>t</u> etracetic <u>a</u> cid" (acide éthylène diamine tétracétique)
HCoV 229E .....	" <u>H</u> uman <u>c</u> oronav <u>i</u> rus" (coronavirus humain souche 229E)
hMPV .....	" <u>H</u> uman <u>m</u> etapneumov <u>i</u> rus" (métapneumovirus humain)
HSV .....	<u>H</u> erpes <u>s</u> implex <u>v</u> irus
HXM .....	<u>H</u> examidine
ILS .....	<u>I</u> nfections liées aux <u>s</u> oins
IR .....	<u>I</u> nfection <u>r</u> espiratoire
MEM .....	" <u>M</u> inimum <u>e</u> ssential <u>m</u> edium" (milieu de culture)
MGG .....	<u>M</u> ay <u>G</u> rünwald et <u>G</u> iemsa
MTT .....	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
NCR .....	" <u>N</u> on <u>c</u> oding <u>r</u> egion" (région non codante)
OMS (ou WHO) .....	<u>O</u> rganisation <u>M</u> ondiale de la <u>S</u> anté (ou " <u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganization")
ORF .....	" <u>O</u> pen <u>r</u> eading <u>f</u> rame" (cadre de lecture ouvert)
PAHO .....	" <u>P</u> an <u>A</u> merican <u>H</u> ealth <u>O</u> rganization" (Organisation de la Santé Pan-Américaine)
PBS .....	" <u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline" (solution tamponnée au phosphate)
PIV .....	<u>P</u> arainfluenzav <u>i</u> rus
PPAV .....	<u>P</u> oliomyélite <u>p</u> aralytique <u>a</u> ssociée au <u>y</u> accin
PV .....	<u>P</u> oliov <u>i</u> rus
PVP-I .....	<u>P</u> olyvinylpyrrolidone <u>i</u> odée
RN .....	<u>R</u> ouge <u>n</u> eutre
SARS-CoV .....	" <u>S</u> evere <u>a</u> cute <u>r</u> espiratory <u>s</u> yndrome associated <u>c</u> oronav <u>i</u> rus" (coronavirus associé au syndrome respiratoire aigu sévère)
SDS .....	<u>S</u> odium <u>d</u> odécyl <u>s</u> ulfate
SVF .....	<u>S</u> érum de <u>y</u> eau <u>f</u> œtal



TR.....	T <u>a</u> ux de <u>r</u> étention
VHA.....	<u>V</u> irus de l' <u>h</u> épatite <u>A</u>
VIH .....	<u>V</u> irus de l' <u>i</u> mmunodéfici <u>en</u> ce <u>h</u> umaine
VPI.....	<u>V</u> accin <u>p</u> oliomyélitique <u>i</u> nactivé
VPO .....	<u>V</u> accin <u>p</u> oliomyélitique <u>o</u> ral
VRS.....	<u>V</u> irus <u>R</u> espiratoire <u>S</u> yncytial

## INTRODUCTION

---

L'antisepsie et la désinfection sont des moyens cruciaux pour prévenir la propagation des infections, et notamment des infections virales. En effet, encore trop peu de traitements antiviraux spécifiques sont disponibles pour combattre ces infections. De plus, l'émergence de nouveaux virus ainsi que la proportion croissante d'infections liées aux soins (ILS) d'origine virale sont devenues un réel enjeu de Santé Publique.

L'hôpital doit en effet être considéré comme un environnement à risque de transmission d'infections. Les surfaces et objets doivent ainsi être considérés avec attention. En effet, malgré une apparence "propre", la présence constante de déchets organiques et de micro-organismes potentiellement pathogènes doit être prise en considération, ces surfaces devenant ainsi des sources potentielles de contamination. La désinfection de ces surfaces et objets est donc primordiale. Il est nécessaire d'utiliser des antiseptiques-désinfectants (ATS-D) adaptés aux différentes situations et dont l'efficacité a été évaluée avec fiabilité.

Ainsi un aspect stratégique fondamental se dessine : l'évaluation adéquate de l'efficacité des ATS-D vis-à-vis des virus. Selon la norme Européenne NF EN 14885 définissant le cadre général de l'évaluation de l'activité ATS-D, l'antisepsie est définie par "l'application d'un antiseptique sur des tissus vivants, entraînant une action sur la structure ou le métabolisme de micro-organismes à un niveau jugé approprié pour prévenir et/ou limiter et/ou traiter une infection de ces tissus" et la désinfection chimique par la "réduction du nombre de micro-organismes dans ou sur une matrice inanimée, obtenue grâce à l'action irréversible d'un produit sur leur structure ou leur métabolisme, à un niveau jugé approprié en fonction d'un objectif donné" (AFNOR, 2006a).

L'évaluation de l'activité ATS-D antivirale, en particulier, dépend de différentes contingences techniques qu'il faudra maîtriser pour apporter le niveau de preuve suffisant pour une utilisation rationnelle.

A ce jour, seule une norme Européenne existe, la norme NF EN 14476+A1 (AFNOR, 2007), pour définir le cadre de l'évaluation de l'activité ATS-D antivirale des agents chimiques, utilisés en médecine humaine. Cependant, bien qu'elle ait le mérite d'exister, elle présente des points nécessitant d'être approfondis.

Nous avons, au cours des travaux de recherche du Doctorat d'Université (Geller C., 2010), développé et validé une méthodologie permettant une amélioration des techniques existantes. Cette méthode est basée sur une méthode originale de filtration sur gel comme moyen de neutralisation de la potentielle activité ATS-D (et de la toxicité) des molécules testées. Nous avons, dans ce but, conçu des colonnes de Séphadex™ G-25 et G-10 permettant la rétention des molécules testées après un temps de contact avec le virus jugé approprié. Le modèle viral alors choisi était le coronavirus humain, souche 229E (HCoV 229E).

Nous avons ainsi évalué les éventuelles activités ATS-D de deux molécules de référence, la chlorhexidine (CHX) et l'hexamidine (HXM), ainsi que de deux nouvelles molécules : le *tetra-para-*

sulfonato-calix[4]arène (C[4]S) et le 1,3-bis(bithiazolyl)-*tetra-para*-sulfonato-calix[4]arène (C[4]S-BTZ). Selon les recommandations de la norme Européenne NF EN 14476+A1, un agent chimique doit induire une diminution de 4 log<sub>10</sub> dans les titres viraux en un temps de contact défini et approprié à la finalité d'utilisation du composé testé, pour pouvoir prétendre à une activité ATS-D antivirale (AFNOR, 2007).

L'HXM et le C[4]S n'avaient montré qu'une très faible activité vis à vis du HCoV 229E. La CHX a montré quant à elle une activité beaucoup plus intéressante bien qu'elle ne puisse néanmoins pas prétendre à une activité ATS-D sur le HCoV 229E. Enfin, le C[4]S-BTZ avait montré une activité comparable, voire meilleure, que la CHX car cette activité s'est avérée plus rapide, rémanente et dépourvue de cytotoxicité, contrairement à la CHX.

Nous avons donc poursuivi ce travail de façon (i) à extrapoler et améliorer la méthodologie et (ii) à poursuivre l'évaluation de l'activité de cette nouvelle molécule prometteuse, le C[4]S-BTZ. En effet, l'un des objectifs de notre équipe de recherche, équipe mixte biologie/chimie, est la synthèse, le développement et l'évaluation de nouvelles molécules à visée anti-infectieuse, dont les calixarènes font partie intégrante.

Nous avons pour cette étude utilisé un autre modèle viral, le poliovirus (PV) de type 1, souche Lsc2ab sur lequel nous avons évalué l'activité de la CHX et du C[4]S-BTZ. Ce modèle viral a été choisi pour répondre à différents objectifs : (i) ce virus est le virus modèle proposé par toutes les normes d'évaluation de l'activité ATS-D antivirale, quel que soit le pays, (ii) évaluer la méthodologie et valider la fonctionnalité des colonnes de Séphadex™ avec un virus nu. Par ailleurs, cette étude nous permettra de discuter de la pertinence du choix de ce modèle dans les tests d'évaluation de l'activité ATS-D antivirale.

Ainsi, Dans la partie bibliographique de ce mémoire, nous aborderons tout d'abord, les risques infectieux viraux encourus à l'hôpital et les moyens actuels pour les combattre. Nous détaillerons la notion d'ATS-D antivirale comme moyen de prévention des ILS virales avec notamment les méthodes d'évaluation et leurs enjeux puis nous décrirons le modèle viral choisi pour cette étude, le poliovirus de type 1 (PV-1), souche Lsc2ab. Enfin, les calixarènes, molécules à potentiel antiviral prometteur testées au cours de ce projet, seront présentés.

La présentation de notre travail expérimental s'articulera ensuite autour de trois grandes parties :

- Les Matériels et Méthodes mis en œuvre seront décrits avec notamment la description du protocole d'évaluation de l'activité ATS-D antivirale et les méthodes de validation.
- La partie Résultats fera part de la validation de ce protocole avec le PV-1 puis des essais d'ATS-D antivirale menés sur ce virus avec deux molécules, la CHX et le C[4]S-BTZ. Les prémisses des résultats menés avec un mélange complexe contenant de la polyvinylpyrrolidone iodée (PVP-I) seront également décrites.
- Enfin, la partie Discussion permettra (i) d'aborder les potentialités, acquises et à développer, du protocole mis en œuvre, (ii) de mieux comprendre l'intérêt de nouvelles molécules comme les calixarènes et (iii) de discuter des différentes stratégies inhérentes aux tests d'ATS-D antivirale, avec notamment le choix des souches virales modèles.

## BIBLIOGRAPHIE

---

### 1 Infections virales et environnement hospitalier

Longtemps considérées comme une fatalité inhérente à l'admission dans un établissement de santé et comme une conséquence inéluctable de ses activités de soins, les infections nosocomiales sont peu à peu devenues l'objet d'une lutte, visant d'abord à maîtriser les conséquences en termes de mortalité et de morbidité, puis surtout à en prévenir la survenue ou l'extension. En vingt ans, de grands progrès ont été réalisés dans les établissements de santé en matière de prévention des ILS.

Nous nous proposons au cours de ce paragraphe de dresser un état des lieux des ILS virales fréquemment rencontrées et de mieux comprendre leur mode de propagation selon la nature des virus en cause.

Ainsi, nous aborderons au cours de cet exposé les ILS respiratoires et gastro-intestinales.

Les cas des ILS dues à d'autres virus comme celui des hépatites B et C, du VIH (virus de l'immunodéficience humaine) ou encore des virus herpétiques ne seront pas abordés ici dans un souci de concision, notamment à cause de leur transmission par contact rapproché.

#### 1.1 Risques viraux au sein des établissements de soins

Le nombre d'ILS virales est encore sous-estimé, souvent parce que ces dernières ne sont pas diagnostiquées. Majoritairement, les ILS virales sont représentées par des infections respiratoires (IR) et gastro-intestinales, pouvant engendrer de véritables épidémies au sein des établissements de soins.

##### 1.1.1 ILS respiratoires virales

Les IR aiguës, qu'elles soient communautaires ou nosocomiales, sont les infections les plus fréquentes dans les pays développés, quelle que soit la population (adultes/enfants, immunocompétents/immunodéprimés, etc.), bien que l'incidence soit plus élevée chez les enfants.

Les IR sont le plus souvent d'origine virale et peuvent présenter des degrés variés de gravité. Il existe ainsi plus d'une vingtaine de virus, sans compter la centaine de sérotypes de rhinovirus ni les réinfections fréquentes (

Tableau 1). Malgré des techniques de diagnostic de plus en plus performantes, l'agent étiologique des IR reste encore souvent non identifié.

Les IR peuvent atteindre les voies respiratoires hautes et basses et prendre des formes variées : rhume, pharyngite, laryngite, trachéobronchite, laryngo-trachéo-bronchite (croup), bronchiolite, pneumonie, grippe.

Les IR basses de type pneumonie atteignent surtout les nourrissons et très jeunes enfants, les personnes âgées et les patients immunodéprimés. Les IR sont ainsi une cause majeure de pathologies

sévères, d'hospitalisation voire même de décès dans les populations sensibles. Elles sont également responsables de phénomène de détresse respiratoire chez des patients ayant des maladies pulmonaires sous-jacentes (asthme, maladie pulmonaire obstructive).

**Tableau 1 : Les virus respiratoires responsables d'ILS**

Les virus respiratoires responsables d'ILS
Virus influenza (A, B, C)
VRS
PIV (1,2,3)
Rhinovirus (>100 sérotypes)
Adénovirus (9 types)
HCoV (5 types)
hMPV
Autres virus pouvant induire des IR : HSV, Epstein-Barr, entérovirus, rougeole

#### 1.1.1.1 ILS respiratoires virales et immunodépression

Les patients immunodéprimés forment une population particulière avec une sensibilité accrue aux ILS notamment respiratoires.

Dans cette population, les IR possèdent trois caractéristiques majeures et distinctes : (i) fréquence élevée ; virus respiratoire syncytial (VRS), influenza virus et parainfluenza virus (PIV) sont les virus les plus fréquemment rencontrés), (ii) persistance des infections au-delà des périodes constatées chez les personnes immunocompétentes et (iii) fréquence élevée d'IR basses de type pneumonie à morbidité élevée.

Pour exemple, une étude a été menée sur une période de trois ans chez des patients immunodéprimés hospitalisés pour leucémie ou pour une récente greffe de moelle. Sur 668 ILS respiratoires répertoriées chez ces patients, 26,6% ont pu être imputées à des virus identifiés. Le virus le plus fréquemment rencontré était le VRS, suivi des rhinovirus, des virus influenza A et B, des PIV et enfin des adénovirus (AdV) (Couch R.B. *et al.*, 1997).

L'immunodépression semblerait réduire l'intégrité des muqueuses respiratoires et le taux d'immunoglobulines de type A sécrétées agissant au niveau local, favorisant ainsi les IR hautes. La diminution du taux d'immunoglobulines totale serait, elle, propice à l'installation des IR basses.

Les sources potentielles de contamination sont nombreuses et variées : patients, personnel soignant ou encore visiteurs qui peuvent être porteurs sains, asymptomatiques ou alors porteurs d'une IR légère et disséminant l'agent pathogène viral dans l'environnement. De plus, les patients immunodéprimés présentent des infections virales persistantes avec possibilité d'excréter le virus pendant de plus longues périodes et ainsi de contaminer l'environnement. Il peut également s'agir d'une source matérielle (objet et/ou surface contaminés) (Harrington R.D. *et al.*, 1992, Couch R.B. *et al.*, 1997).

### 1.1.1.2 VRS et virus influenza

Le VRS et les virus influenza sont les premières causes d'ILS respiratoires.

#### **VRS**

Le VRS, virus enveloppé à ARN, appartient à la famille des *Paramyxoviridae* et à la sous-famille des *Pneumovirinae*. Il en existe deux types, A et B.

Le VRS est à l'origine de la grande majorité des IR chez les nourrissons et les jeunes enfants, la majorité des cas d'hospitalisation survenant avant l'âge d'un an. Les facteurs de risques principaux sont la prématurité, les maladies cardiaques congénitales, les anomalies structurales du tractus respiratoire, les affections neuromusculaires et l'immunodéficience (Nicholson K.G. *et al.*, 2006, Manoha C. *et al.*, 2007, Krilov L.R., 2011).

Les infections à VRS surviennent principalement durant la saison hivernale et peuvent atteindre jusqu'à 40% des ILS respiratoires chez les enfants de moins de trois ans. Rhinorrhée, toux et pharyngite sont des symptômes fréquents lors d'infections à VRS. Cependant, le VRS est surtout le premier agent responsable de bronchiolite chez les nourrissons (Manoha C. *et al.*, 2007).

#### **Virus influenza**

Infectant plus largement les différentes tranches d'âge, les virus influenza apparaissent comme la seconde cause d'ILS respiratoires. Du fait du risque de pandémie, les influenzavirus ont reçu une attention toute particulière au cours de ces dernières années.

Les virus influenza sont eux aussi des virus enveloppés à ARN. Ils appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae* et comprennent trois types majeurs, Influenza A, B et C. Le type A se décline en de nombreux sous-types, distingués sur la base de leur antigènes de surface, l'hémagglutinine et la neuraminidase (Freyer F., 2003a).

Les virus influenza restent la cause majeure d'IR nécessitant une prise en charge hospitalière. Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), 5 à 15% de la population mondiale est infectée chaque année par la grippe (WHO, 2009).

Les épidémies nosocomiales de grippe sont associées à une morbidité et à une mortalité élevées. Les facteurs de risque principaux sont les maladies chroniques cardiovasculaires et/ou respiratoires, l'immunodéficience et les séjours de longue durée en établissement de soins.

Des épidémies nosocomiales ont été répertoriées dans des services variés tels que des services de soins intensifs notamment ceux de néonatalité, de médecine interne, de psychiatrie, de gériatrie, d'hématologie clinique ou encore de transplantation. Les campagnes de vaccination, notamment pour le personnel hospitalier ont eu un réel impact bénéfique sur la prévalence des ILS due aux virus influenza (Maltezou H.C. et Drancourt M., 2003, Leekha S. *et al.*, 2007, Maltezou H.C., 2008).

L'importance des infections grippales à l'hôpital n'est plus à démontrer et la pandémie de grippe A H1N1 a renforcé cette notion.

### 1.1.1.3 *Rhinovirus et coronavirus*

Les rhinovirus et coronavirus sont en général responsables d'IR bénignes de type rhume. Cependant, ils sont impliqués dans un certain nombre d'hospitalisations pour IR aigües. Manoha et coll. ont ainsi mis en évidence une prévalence des ILS à rhinovirus de 32% chez les enfants de moins de trois ans (Manoha C. *et al.*, 2007).

Les rhinovirus, petits virus nus à ARN, appartiennent au genre *Rhinovirus* et à la famille des *Picornaviridae*. Ils comprennent plus de cent sérotypes pouvant infecter (et réinfecter) l'homme.

Les HCoV sont quant à eux répartis au sein de trois genres :  $\alpha$ -CoV (souches 229E et NL-63),  $\beta$ -CoV (souches OC43 et HKU1), et  $\gamma$ -CoV. Ces genres appartiennent à la sous-famille des *Coronavirinae* et à la famille des *Coronaviridae* (ICTV, 2009).

Que ce soit lors de l'infection à rhinovirus ou à HCoV, La nature des symptômes et leur prévalence varie selon les tranches d'âge :

- jeunes enfants (< 5 ans) : IR basses, de type pneumonie ou bronchiolite,
- enfants (> 5 ans) et jeunes adultes : exacerbation d'asthme, IR hautes
- patients plus âgés, immunodéprimés : pneumonie, exacerbation d'une affection respiratoire obstructive sous-jacente ou encore atteinte cardiaque.

Ces données sont retrouvées dans l'étude de Falsey et coll. (Falsey A.R. *et al.*, 2002) dans laquelle 12% des patients (> 65 ans) hospitalisés pour une atteinte cardiaque et/ou pulmonaire étaient infectés soit par un rhinovirus soit un coronavirus (souche 229E ou OC43). Tous ces patients étaient porteurs d'atteintes cardio-vasculaires ou pulmonaires sous-jacentes. Parmi ces patients, 4% ont développé une pneumonie et 1% a nécessité une assistance respiratoire.

Une autre étude réalisée sur des patients hospitalisés pour IR aigües (El-Sahly H.M. *et al.*, 2000) a ainsi identifié la présence de rhinovirus et/ou de coronavirus (souche 229E ou OC43) chez 5,1% de ces patients. Une atteinte cardiovasculaire sous-jacente était souvent associée (35% des enfants de moins de 5 ans, 93% des patients de 5 à 35 ans et 73% des patients de plus de 35 ans).

Ces études sont révélatrices d'un facteur de risque des infections compliquées à rhinovirus ou à HCoV, retrouvé très fréquemment : les affections cardiaques ou pulmonaires sous-jacentes.

Les HCoV ont été, de plus, impliqués dans des ILS respiratoires en néonatalité. Une étude prospective de 18 mois a ainsi montré le rôle du HCoV 229E dans des ILS respiratoires chez des enfants prématurés présentant des symptômes de type apnée, bradycardie et/ou distension abdominale, tous les prélèvements étant négatifs à l'admission (Sizun J. *et al.*, 1995). Une étude a même souligné que chez les nouveau-nés (de moins de 28 jours) hospitalisés en néonatalité, les prélèvements respiratoires positifs (11%) correspondaient tous à des HCoV (souches 229E et OC43) (Gagneur A. *et al.*, 2002).

Pour plus de détails, les coronavirus humains (historique, structure, pouvoir pathogène) ont été décrits avec précision au cours du travail de la thèse d'Université (Geller C., 2010).

#### 1.1.1.4 *Métapneumovirus humain et parainfluenzavirus*

Le métapneumovirus humain (hMPV) et les parainfluenzavirus, particulièrement le type 3, sont rencontrés avec des fréquences proches de celles des HCoV. Moins fréquents que le VRS et les virus influenza, ils engendrent quand même des proportions non négligeables d'IR, notamment des bronchiolites chez les nourrissons.

##### **hMPV**

Le hMPV a été isolé en 2001 aux Pays-Bas (Van den Hoogen B.G. *et al.*, 2001). C'est un virus enveloppé appartenant à la famille des *Paramyxoviridae* et au genre *Pneumovirus*. C'est un virus ubiquitaire que l'on retrouve sur tous les continents. Il circule surtout en hiver et au printemps. Infectant très majoritairement les jeunes enfants, il est responsable d'IR hautes mais aussi de bronchiolites sévères et de pneumonies (Jartti T. *et al.*, 2002, Stockton J. *et al.*, 2002, Williams J.V. *et al.*, 2004, Robinson J.L. *et al.*, 2005).

Le hMPV est responsable de 5 à 10% des hospitalisations pour IR chez les enfants de moins de 5 ans. Une étude française l'a même placé au second rang, après le VRS, des agents pathogènes responsables d'hospitalisation pour IR avec 8,5% des enfants hospitalisés porteurs de hMPV. Les symptômes présentés étaient des bronchiolites (65,7%), pneumonies (14,3%), exacerbations d'asthme (5,7%) et IR hautes (14,3%). Dans 30% des cas, une co-infection avec le VRS a été retrouvée. De plus, 58% de ces enfants hMPV positifs présentaient une maladie sous-jacente ou étaient nés prématurément (Foulongne V. *et al.*, 2006).

##### **PIV**

Les PIV appartiennent à la grande famille des *Paramyxoviridae*. Il en existe quatre type 1, 2, 3 et 4) repartis au sein de deux genres : le genre *Respirovirus* (PIV-1 et PIV-3) et le genre *Rubulavirus* (PIV-2 et PIV-4). Les quatre PIV sont responsables de fréquentes IR chez les jeunes enfants, principalement des bronchiolites avec le PIV-3 et des laryngites avec les PIV-1 et PIV-2 (Freymuth F., 2003b).

Le PIV-3 a été impliqué dans des épidémies nosocomiales en néonatalité chez des enfants prématurés dont les symptômes étaient apnée, bradycardie, détresse respiratoire progressive et/ou syndrome grippal. Certains patients ont nécessité la mise en œuvre d'une assistance respiratoire (Teo W.Y. *et al.*, 2010).

#### 1.1.2 *ILS gastro-intestinales virales*

Les gastro-entérites sont une des causes de mortalité la plus importante dans le monde, et en particulier dans les pays en voie de développement. Cependant, les établissements de soins sont loin d'être épargnés. Les virus constituent l'étiologie la plus fréquente de ces gastro-entérites (de Rougemont A. *et al.*, 2010)

##### 1.1.2.1 *Rotavirus*

Le rotavirus, virus nu à ARN, appartient à la famille des *Reoviridae*.

Il représente la cause la plus fréquente de gastro-entérites chez les enfants de moins de 5 ans à travers le monde, entraînant un taux de mortalité élevé dans les pays en voie de développement et



un fort taux d'hospitalisation dans les pays développés (Parashar U.D. *et al.*, 2003, Parashar U.D. *et al.*, 2006, Anderson E.J., 2008).

Le rotavirus est également la cause d'ILS la plus fréquente, avant celle due aux VRS. Une étude française, menée de 1998 à 2005, a montré que la proportion d'infections nosocomiales à rotavirus étaient de 46,3% contre 5,3% pour le VRS (Fournel I. *et al.*, 2010).

Les ILS dues au rotavirus sont, majoritairement, retrouvées chez les enfants de trois mois à trois ans mais aussi chez des patients sensibles tels que les personnes âgées et les patients immunodéprimés. De nombreuses épidémies ont été rapportées dans les hôpitaux mais aussi dans les crèches et les maisons de retraite (Fischer T.K. et Molbak K., 2001, Ratner A.J. *et al.*, 2001, Marshall J. *et al.*, 2003, Chandran A. *et al.*, 2006).

#### 1.1.2.2 *Norovirus*

Anciennement appelé virus de Norwalk, les norovirus appartiennent au genre *Norovirus* et à la famille des *Caliciviridae* (petits virus nus à ARN).

Les norovirus représentent la première cause de gastro-entérites, toute tranche d'âge confondues dans la communauté (Rockx B. *et al.*, 2002).

Les norovirus sont responsables d'épidémies aussi bien dans la communauté que dans les établissements de soins (Marx A. *et al.*, 1999, Love S.S. *et al.*, 2002, CDC, 2008, Tsan L. *et al.*, 2008).

#### 1.1.2.3 *Adénovirus*

Les AdV sont des virus à ADN non enveloppés, pour lesquels 51 sérotypes infectant l'homme sont identifiés. Les AdV sont associés à des infections, sporadiques ou épidémiques, atteignant les systèmes oculaire, respiratoire ou gastro-intestinal selon les sérotypes.

Les infections sont d'autant plus sévères que les patients sont immunodéprimés et peuvent atteindre la plupart des organes, i.e. pneumonie, hépatite, méningo-encéphalite, cystite hémorragique aigue ou encore myocardite (Lukashok S.A. et Horwitz M.S., 1998). Chez ces patients, la virémie, l'excrétion virale et la morbidité sont significativement plus élevées que les patients immunocompétents.

Les infections nosocomiales à AdV ont été bien documentées chez les patients immunodéprimés et au sein de services variés tels que les services d'ophtalmologie (Ishiko H. *et al.*, 2008), les unités de soins intensifs en néonatalité (Chaberny I.E. *et al.*, 2003), les services de pédiatrie (Gerber S.I. *et al.*, 2001) ou encore les services d'hématologie (Jalal H. *et al.*, 2005).

## 1.2 **Un arsenal préventif et thérapeutique insuffisant**

Bien que nombre de ces pathologies soient connues depuis longtemps, très peu d'entre elles bénéficient de moyens de prévention (vaccins) et/ou curatifs spécifiques. Succinctement, ce paragraphe décrit les quelques solutions à notre portée.

Comme pour l'épidémiologie des ILS, les traitements contre les virus des hépatites, le VIH ou les virus herpétiques ne seront pas abordés dans ce chapitre.

### 1.2.1 Des vaccins encore rares

Au niveau vaccinal, en prévention des ILS citées plus haut, deux agents viraux sont ciblés par des vaccins : les influenza virus et le rotavirus.

La vaccination anti-VRS est à l'étude mais toujours en développement (Krillov L.R., 2011).

#### **Vaccins contre la grippe**

Les vaccins antigrippaux sont élaborés chaque année en fonction des données épidémiologiques mondiales des virus influenza circulant entre les deux hémisphères (WHO, 2011). Ils peuvent être de deux types : (i) les vaccins à virus vivants atténués, recommandés chez les personnes saines de moins de 65 ans, et contre-indiqués chez les femmes enceintes, les patients immunodéprimés et les personnes côtoyant des patients très immunodéprimés ; (ii) les vaccins à virus inactivés recommandés chez toutes les personnes saines de moins de 65 ans, y compris les femmes enceintes. La vaccination contre la grippe des patients immunodéprimés (vaccin inactivé), même si elle n'induit qu'une réponse immunitaire faible, amène une réponse bénéfique. En cas de greffe de moelle osseuse, la vaccination est recommandée pour l'entourage et le donneur de moelle osseuse (transfert de lymphocytes B mémoires) (Maltezou H.C., 2008).

#### **Vaccins anti-rotavirus**

En prévention des infections à rotavirus, des vaccins oraux, contenant une forme vivante atténuée du virus, sont disponibles. Ils peuvent être administrés aux nourrissons dès l'âge de six semaines.

L'administration de ces vaccins a entraîné une chute drastique du nombre de gastroentérites à rotavirus que ce soit dans la communauté ou à l'hôpital. En effet, une diminution d'environ 60% du nombre d'hospitalisations dues au rotavirus a été observée dans un hôpital pédiatrique Américain en 2007-2008 par rapport aux saisons précédentes (2003 à 2006, le vaccin anti-rotavirus ayant été commercialisé en 2006). Cette diminution n'a pas été observée dans le cas des hospitalisations dues aux VRS et/ou aux virus influenza, ce qui d'après les auteurs, éliminait les simples mesures d'hygiène comme seules responsables (Anderson E.J. *et al.*, 2011).

### 1.2.2 Quelques molécules antivirales

#### **Molécules antigrippales**

Deux classes d'antiviraux dirigés contre les virus influenza sont disponibles : (i) les amantadanes avec l'amantadine et la rimantadine et (ii) les inhibiteurs de la neuraminidase avec l'oseltamivir et le zanamivir. Ces molécules peuvent être administrées tant de manière préventive que curative.

Dans le domaine préventif, les deux classes présentent une efficacité d'environ 60 à 65% pour la prévention de l'infection à l'influenza virus de type A chez les patients par ailleurs sains. Cependant, les amantadanes sont inactifs sur le virus influenza de type B alors que les inhibiteurs de la neuraminidase sont actifs sur les deux types de virus.

La chimioprophylaxie antigrippale est la pierre angulaire pour le confinement des épidémies de grippe en l'absence de vaccination. Elle doit être administrée le plus tôt possible. Cette prophylaxie s'adresse à tous les patients à risque ayant été exposés aux virus ainsi qu'au personnel hospitalier non vacciné.

En utilisation curative, les deux classes diminuent significativement la durée des symptômes, si le traitement est administré de façon précoce, au maximum 48 h après l'apparition des symptômes. L'oseltamivir permet également la prévention des complications des IR basses.

L'inconvénient majeur des amantadanes est la rapide émergence de résistances au cours du traitement (Hota S. et McGeer A., 2007).

Il y a encore quelques années, la résistance aux inhibiteurs de neuraminidases était extrêmement rare. Cependant, au cours de la saison hivernale 2007-2008, des souches mutantes de virus influenza de type A résistantes à l'oseltamivir sont apparues et concernaient en moyenne 19,2% de souches testées en Europe (Lackenby A. *et al.*, 2008).

### **Ribavirine**

La ribavirine est l'une des seules molécules antivirales à large spectre dont nous disposons. Elle est indiquée dans le traitement de l'hépatite C mais d'autres utilisations sont envisageables bien que les résultats soient variables.

A ce jour, la ribavirine ne possède en France qu'une autorisation temporaire d'utilisation dans le traitement des IR à VRS.

L'administration précoce d'aérosols de ribavirine et d'immunoglobulines semblerait en effet réduire la fréquence des infections à VRS et leur sévérité chez les patients immunodéprimés, particulièrement après une greffe de moelle osseuse (Couch R.B. *et al.*, 1997).

### **Interféron $\alpha$**

Des essais ont été menés avec l'interféron  $\alpha$ . Bien qu'il puisse induire des symptômes pseudo-grippaux lorsqu'il est administré sur de longues périodes, l'interféron  $\alpha$  a été envisagé comme solution préventive pour les infections à rhinovirus, coronavirus et à VRS (Higgins P.G. *et al.*, 1983, Couch R.B. *et al.*, 1997).

### **Anticorps monoclonaux**

Le palivizumab, un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre la protéine de fusion du VRS, a prouvé son efficacité dans la prévention des infections à VRS chez les enfants à risques (enfants prématurés, atteints de dysplasie broncho-pulmonaire ou d'une cardiopathie congénitale). De nouvelles avancées dans la prévention des infections à VRS sont à attendre notamment avec un anticorps monoclonal de seconde génération, le motavizumab (Krillov L.R., 2011).

#### *1.2.3 Un traitement encore symptomatique*

Malgré l'importance, tant du point de vue de la fréquence que de la morbidité, des infections virales, qu'elles soient respiratoires ou gastro-intestinales, les traitements symptomatiques restent primordiaux.

Pour les infections à VRS, diverses stratégies ont été employées utilisant des bronchodilatateurs, des corticostéroïdes et/ou du montelukast, antagoniste des récepteurs aux leucotriènes. Elles n'ont cependant pas démontré de bénéfice clinique net (Krillov L.R., 2011).

Les mesures de précaution standard sont donc primordiales pour prévenir la propagation de ces infections : hygiène des mains appropriée, port de masque, de gants, "cohorting" des patients (Teo W.Y. *et al.*, 2010). Dans ce contexte, disposer des moyens d'ATS-D que l'on sait efficaces sur les micro-organismes cibles devient alors une priorité.

### 1.3 Modes de propagation des ILS à l'hôpital

Les ILS peuvent se propager soit par contact direct de personnes à personnes (patients/patients, patients/personnels hospitaliers, patients/visiteurs, etc.), soit par l'intermédiaire de surfaces contaminées, que ce soit dans le cas des ILS respiratoires ou gastro-intestinales. La transmission manuportée joue en effet un rôle très important dans la transmission des ILS.

En outre, plus longtemps un agent pathogène est capable de survivre sur une surface, plus longtemps cette surface reste une possible source de contamination et représente un danger pour les patients et/ou le personnel hospitalier. La durée de survie des virus dans différentes conditions est donc une donnée primordiale à connaître (Tableau 2).

#### Survie et notion de transfert

La notion de contamination par l'intermédiaire des mains et des surfaces contaminées est maintenant bien ancrée. De ce fait, certaines surfaces ou objets tels que les salles de bain, les toilettes ou encore la literie sont nettoyés régulièrement et dans de bonnes conditions. Mais qu'en est-il des surfaces comme les interrupteurs, les touches de téléphones, etc., régulièrement touchés par les différents acteurs du monde hospitalier, du patient au personnel soignant (Dancer S.J., 2009) ?

En effet, pour un certain nombre d'agents pathogènes viraux, le transfert des particules virales infectieuses de surfaces contaminées vers les mains du patient, et inversement, a été prouvé, notamment pour des virus enveloppés que l'on aurait pu croire trop fragiles.

Le transfert du virus influenza A a été prouvé dans différentes conditions : à partir de surfaces en acier contaminées vers les mains (survie > à 5 min dans ces conditions) et à partir de mouchoirs vers les mains. Ce transfert est possible jusqu'à 15 min après la contamination initiale (Bean B. *et al.*, 1982).

Le VRS est un virus enveloppé et bien qu'il survive moins longtemps que ses homologues nus, son transfert de surfaces contaminées vers les mains a été démontré. Dans ces conditions, le pouvoir infectieux du virus persiste sur les mains jusqu'à 25 min (Hall C.B. *et al.*, 1980).

Des différences de capacité de survie au sein d'une même famille peuvent exister. Par exemple, le HCoV 229E perd progressivement son pouvoir infectieux en suspension alors que le SARS-CoV ("Severe acute respiratory syndrome associated coronavirus" ou coronavirus associé au syndrome respiratoire aigu sévère) conserve ce pouvoir infectieux jusqu'à 9 jours (Rabenau H.F. *et al.*, 2005).

Les rhinovirus peuvent également être transférés à partir de surfaces contaminées vers la peau, et inversement (Reed S.E., 1975, Ansari S.A. *et al.*, 1991). En revanche, le transfert du PIV de type 3 n'a

été prouvé que dans un sens, d'une surface contaminée vers la pulpe de doigt (Ansari S.A. *et al.*, 1991).

Les norovirus, virus nus, peuvent survivre et conserver leur pouvoir infectieux sur différentes surfaces. Leur présence a par exemple été montré sur des poignées de porte, des ascenseurs, des équipements hospitaliers (Evans M.R. *et al.*, 2002, Barker J. *et al.*, 2004, Wu H.M. *et al.*, 2005, Gallimore C.I. *et al.*, 2006).

Le transfert des norovirus des mains contaminées vers des objets, et inversement, a été prouvé, de même que l'importance des processus de nettoyage et de désinfection dans la réduction de la transmission des ILS à norovirus. Cependant, les solutions détergentes ne sont en général pas assez efficaces, il faut avoir recours à des désinfectants, notamment des désinfectants chlorés (Barker J. *et al.*, 2004).

Les rotavirus ont également été retrouvés sur différents éléments de mobiliers (Gallimore C.I. *et al.*, 2006).

### **Durée et voie d'excrétion du virus**

En cas d'épidémie ou de risque d'épidémie, la durée et la voie d'excrétion des virus doivent être prises en compte. Il faut également considérer les éventuels porteurs sains ou patients asymptomatiques qui excrètent quand même le virus et parfois, en quantité conséquente.

Par exemple, dans le cas des virus influenza, l'excrétion du virus par les voies respiratoires débute environ un jour avant l'apparition des symptômes et se poursuit pendant quelques jours (quatre jours en moyenne chez l'adulte sain jusqu'à trois semaines chez les très jeunes enfants ou les patients immunodéprimés). Il a par ailleurs été montré que le personnel hospitalier non vacciné est la principale source d'infections nosocomiales à influenza virus (Maltezou H.C., 2008).

Dans le cas d'infections à norovirus, l'excrétion fécale est importante et perdure au-delà de la période d'incubation, jusqu'à trois semaines. Il existe, de plus, des porteurs asymptomatiques excréteurs. Ces éléments favorisent une dissémination large et rapide du virus (Tu E.T. *et al.*, 2008, de Rougemont A. *et al.*, 2010).

Tableau 2 : Conditions et durée de survie de différent virus

Type de virus	Survie (conditions variables)	Sources
<b>Virus nus</b>		
<b>Rotavirus</b>	40 h en aérosol à HR moyenne (détectable jusqu'à 9 jours), 9 h en aérosol à HR faible, 2 h en aérosol à HR forte > 10 jours après séchage sur un disque en acier à moyenne et faible RH, < 48 h à forte RH	(Sattar S.A. <i>et al.</i> , 1984) (Sattar S.A. <i>et al.</i> , 1986)
<b>Rhinovirus</b>	2 h après séchage sur acier à faible HR et moyenne HR, 14 h après séchage sur acier à forte HR > 3 h après dépôt sur les doigts	(Sattar S.A. <i>et al.</i> , 1987) (Reed S.E., 1975) (Ansari S.A. <i>et al.</i> , 1991)
<b>Norovirus</b>	Résistants aux pH acides et basiques, à la chaleur et aux concentrations habituelles de chlore	(de Rougemont A. <i>et al.</i> , 2010) (Barker J. <i>et al.</i> , 2004)
<b>Adénovirus</b>	> 6 jours après séchage, > 20 j en solution saline, 49 j après séchage sur du plastique ou de l'acier Inactivé par 5 s de chauffage à 90°C	(Hara J. <i>et al.</i> , 1990) (Gordon Y.J. <i>et al.</i> , 1993)
<b>VHA</b>	> 7 jours si faible HR à 5°C, 2 h si très haute HR (95%) à 35°C	(Mbithi J.N. <i>et al.</i> , 1991)
<b>Entérovirus 70</b>	> 20 j en solution saline Inactivé par 6 h de séchage à température ambiante et 5 s de chauffage à 90°C	(Hara J. <i>et al.</i> , 1990)
<b>Virus enveloppés</b>		
<b>VRS</b>	6 h sur des surfaces non poreuses, 1h30 sur des gants 30 min à 45 min sur tissus ou mouchoirs, 20 min sur la peau	(Hall C.B. <i>et al.</i> , 1980)
<b>Influenzavirus</b>	24 h à 48 h sur surfaces non poreuses, 8 h à 12 h sur des surfaces poreuses	(Bean B. <i>et al.</i> , 1982)
<b>HCoV 229E</b>	> 6 jours dans du PBS, 3 h après séchage sur surfaces poreuses et non poreuses	(Sizun J. <i>et al.</i> , 2000)
<b>HCoV OC43</b>	> 6 jours dans du PBS, 1 h après séchage sur surfaces poreuses et non poreuses	(Sizun J. <i>et al.</i> , 2000)
<b>SARS-CoV</b>	> 96 h dans sérum, crachat, fèces, > 72 h dans urines 72 h à 96 h après séchage sur différentes surfaces et à différentes températures Inactivé par la chaleur : 90 min/56°C ou 60 min/67°C ou 30 min/75°C Inactivé par UV/60 min	(Duan S.M. <i>et al.</i> , 2003)
<b>PIV 3</b>	< 1 h après dépôt sur les doigts	(Ansari S.A. <i>et al.</i> , 1991)
<b>HSV-1 et 2</b>	24 h dans l'eau distillée 4,5 h sur des surfaces en plastique à 37°C	(Nerurkar L.S. <i>et al.</i> , 1983)

HR : humidité relative (faible HR = 20% ; moyenne HR = 50% ; forte HR = 80% ; très forte HR = 95%)

VHA: virus de l'hépatite A, VRS : virus respiratoire syncytial, HCoV : "Human coronavirus" (coronavirus humain), SARS-CoV : "Severe acute respiratory syndrome associated coronavirus" (coronavirus associé au syndrome respiratoire aigu sévère), PIV : parainfluenzavirus, HSV : Herpes simplex virus

PBS : "Phosphate buffered saline" ou solution tamponnée au phosphate

## 2 L'antisepsie-désinfection antivirale

Les ILS virales respiratoires et gastro-intestinales sont, comme nous venons de le voir, fréquentes et présentent une morbidité importante. Pour les combattre et les prévenir, très peu de moyens spécifiques sont à notre disposition.

Ainsi, une manière de limiter la propagation de ces infections est de disposer d'ATS-D efficaces et appropriés aux microorganismes cibles et aux conditions d'utilisation, notamment le type de surface, le temps de contact approprié pour ce soit applicable, etc.

Il est donc impératif de développer des méthodes d'évaluation de l'activité ATS-D des agents chimiques répondant à ces différents critères.

### 2.1 Historique

Sans que cette notion soit clairement formulée, l'ATS-D existe depuis la Haute Antiquité où les épices et autres essences étaient utilisées par les Egyptiens pour lutter contre les phénomènes de putréfaction des plaies et des cadavres. Au 5<sup>ème</sup> siècle avant Jésus-Christ, Hippocrate recommandait le recours au vinaigre et au vin, c'est-à-dire aux substances acides et aux alcools, pour traiter les infections cutanées et les blessures.

Le terme "antiseptique" n'a cependant été introduit qu'au 18<sup>ème</sup> siècle par Sir John Pringle, médecin britannique, suite à ses études sur les épidémies au sein des armées et des garnisons.

Le 19<sup>ème</sup> siècle a été une période très importante dans l'avancée des connaissances en microbiologie et, par extrapolation, dans le domaine de l'antisepsie, avec l'émergence de la théorie des "germes" responsables de maladies.

A cette époque, un certain nombre de microorganismes (bactéries, champignons, protozoaires) avaient été identifiés mais sans que la corrélation avec les maladies soit établie.

Parmi les pionniers de cette époque et précédent l'ère Pasteurienne, Ignace-Philippe Semmelweis, médecin obstétricien Austro-Hongrois, peut être considéré comme l'un des pères fondateurs de l'antisepsie. En effet, ses recommandations en faveur du lavage des mains, bien que peu appréciées et suivies à l'époque, ont permis la réduction drastique du nombre de fièvres puerpérales qui sévissaient à la maternité Universitaire de Vienne.

En 1867, suite à ses travaux sur la fermentation, Louis Pasteur suggéra alors que les microorganismes étaient à l'origine d'un certain nombre de maladies. A la même période, Joseph Lister, un chirurgien anglais admirant les travaux de Pasteur, imputa la responsabilité dans l'infection des blessures ouvertes à des microorganismes présents dans l'environnement. Lister préconisa alors l'utilisation du phénol sur les plaies de ses opérés, ce qui eut pour effet la chute du nombre d'infections.

Des études ultérieures se sont tournées vers des procédés préventifs desquels est née la notion d'asepsie, consistant à développer des méthodes de travail empêchant tout apport de microorganismes. Pasteur attira alors l'attention de la communauté médicale sur les microorganismes propagés par l'eau ou par les instruments et les divers ustensiles chirurgicaux. Il recommanda ainsi de ne se servir que d'instruments d'une propreté parfaite et de les soumettre à un

flambage rapide, d'utiliser de l'eau ou autre matériel seulement après avoir été soumis à l'action de la température et bien sûr de se nettoyer les mains, rejoignant ici la thèse de Semmelweis.

L'époque moderne des ATS-D commence avec les travaux de Krönig et Paul qui jetèrent, en 1897, les bases scientifiques de l'étude du mode d'action de ces substances. Ils décrivent les critères indispensables de leur évaluation *in vitro*, travaux qui préludaient à l'établissement de nos normes modernes d'efficacité. Ils insistent notamment sur la nécessité de standardiser les milieux de culture, l'inoculum, le temps de contact entre bactéries et ATS-D, la nécessité de mesurer un effet létal en vérifiant la neutralisation de l'ATS-D résiduel. Ils ont également décrit les procédures et publié leurs déductions sur les modes d'action des principaux ATS-D.

Depuis cette époque, les procédés et les moyens d'ATS-D ont largement évolué et se sont imposés notamment dans la lutte contre les ILS et plus généralement dans une logique de prévention des maladies infectieuses connues ou émergentes (Crémieux A. *et al.*, 1982, Dauphin A. et Mazin C., 1994, Fleurette J. *et al.*, 1995, Norkin L.C., 2010a).

## 2.2 Les grandes classes d'ATS-D

De nombreuses familles chimiques rassemblent des composés aux propriétés ATS-D.

Parmi ces familles, nous verrons, entre autres, celles de la CHX et de la PVP-I, deux des molécules dont nous avons évalué l'activité ATS-D antivirale sur le PV-1 au cours de cette étude.

Cette liste n'a pas la volonté d'être exhaustive mais de replacer dans le contexte de l'évaluation de l'activité ATS-D antivirale les principales caractéristiques des grandes familles d'ATS-D.

### 2.2.1 Les bisbiguanides et la chlorhexidine

#### Origine et utilisation

La CHX a été synthétisée dans les années 1950 au cours de recherches sur de nouveaux antipaludéens. La molécule qui présentait une excellente activité antibactérienne et une faible toxicité pour la peau et les muqueuses a été ensuite développée comme ATS et agent conservateur (Aly R. et Maibach H.I., 1979). Elle fut commercialisée en France en 1972. On la retrouve dans des spécialités comme la Biseptine®, le Septivon® ou encore le Visiodose® collyre. La CHX est largement utilisée pour l'ATS chirurgicale des mains et le traitement des plaies et blessures. On la retrouve aussi dans de nombreux produits destinés à l'hygiène buccale. Le plus souvent, elle est utilisée aux concentrations de 0,05% (m/v) en solution aqueuse (antisepsie de la peau endommagée, plaie) à 0,5% (m/v) en solution alcoolique (antisepsie cutanée pré-opératoire).

#### Propriétés physico-chimiques et compatibilités

La CHX ou 1,6-bis[5,5'-bis(4-chlorophényl)]-1,1'-bis[biguanido]hexane (CAS RN : 55-56-1), est un ATS-D cationique de la famille des bisbiguanides.

C'est une substance cristalline, fortement alcaline et pratiquement insoluble dans l'eau. Elle est donc utilisée sous forme de sels, le plus souvent associée à l'acide gluconique, pour accroître sa solubilité dans l'eau. La masse moléculaire du digluconate de CHX (CAS RN : 18472-51-0, qui correspond à la dénomination CHX dans la suite de notre exposé) est de 897,80 g.mol<sup>-1</sup>. La CHX est soluble jusqu'à



70% (m/v) mais les solutions dont la concentration est supérieure à 20% (m/v) sont visqueuses. La solution aqueuse est incolore. La solubilité dans l'alcool est bonne. Sa stabilité est maximale entre pH 5 et 8.

En tant que substance cationique, la CHX est compatible avec les alcools, quelques dérivés phénoliques et les ATS-D cationiques tensio-actifs (ammoniums quaternaires comme le cétrimide) qui augmente sa solubilité et son action. La CHX est d'ailleurs très souvent utilisée en association avec le cétrimide et/ou avec l'alcool.

Elle est cependant incompatible avec d'autres ATS-D majeurs comme les halogénés ou les aldéhydes. Elle est incompatible avec les dérivés anioniques (savons, alginates, sodium dodécyl sulfate ou SDS), les anions minéraux et certains colorants de nature anionique (éosine, fluorescéine).

La CHX se conserve à température ambiante à l'abri de la chaleur et de la lumière, sinon il existe un risque d'hydrolyse en chloroaniline, poison de l'hémoglobine.

### Mécanismes d'action

Son activité est due à l'interaction avec les charges électronégatives des membranes cytoplasmiques. L'adsorption de la CHX sur la cellule est très rapide, proportionnelle à la concentration de l'ATS. Elle altère la membrane cytoplasmique aboutissant à sa destruction. Ces altérations membranaires expliquent certainement son activité sur les virus enveloppés. La pénétration intracellulaire de la CHX est favorisée par la présence des phospholipides membranaires. A des concentrations de 2 à 5% (m/v), les lésions membranaires entraînent une fuite des éléments cytoplasmiques avec perte des ions potassium et ammonium, des cations bivalents puis des acides nucléiques. A forte concentration (>10% (m/v)), il se produit une coagulation intracytoplasmique avec précipitation des protéines et des acides nucléiques, sans fuite des éléments intracytoplasmiques (Fleurette J. *et al.*, 1995).

### Propriétés antivirales (Annexe 1, p.124)

La CHX n'a, en général, pas d'activité ATS-D sur les virus nus, comme le PV, les échovirus, les coxsackievirus ou encore le rotavirus Humain (Kurtz J.B., 1979, Narang H.K. et Codd A.A., 1983, Springthorpe V.S. *et al.*, 1986b, Bernstein D. *et al.*, 1990, Papageorgiou G.T. *et al.*, 2001).

Cependant, son activité se révèle en général bonne sur les virus enveloppés, tels que le HSV-1 (herpes simplex virus de type 1), le cytomégalovirus (CMV), le virus influenza de type A, le PIV 3 et VIH-1 (Bernstein D. *et al.*, 1990, Baqui A.A. *et al.*, 2001).

Au cours de nos travaux antérieurs, la CHX s'est également avérée active sur le HCoV 229E pour des concentrations de  $10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> soit 0,09% (Geller C. *et al.*, 2009).

Les propriétés ATS-D de la CHX dépendent largement des conditions d'essai.

Son activité à 0,02% (m/v) pour des temps de contact de 90 min a été montrée sur les HSV-1 et 2 mais elle s'est révélée inactive dans les mêmes conditions sur un PV-2 et sur un AdV-2 (Bailey A. et Longson M., 1972). Cependant, à la concentration de 0,5% (m/v) en solution aqueuse et des temps de contact de 10 min, l'activité de la CHX était beaucoup moins importante que dans l'étude précédente sur le HSV-1 (Tyler R. et Ayliffe G.A., 1987).

L'association de la CHX à différentes substances change notablement son activité.

Une étude de Wood et coll. montre des résultats surprenants car si elle confirme l'activité de l'association CHX/cétrimide, à concentration finale de 0,01155/0,1125% (m/v), sur le HSV-1 après un

temps de contact de 1 min, cette solution ne s'est montrée efficace sur le VIH-1 qu'après un temps de contact de 10 min.

De plus, cette association était inactive sur les virus nus tels que le PV-1, l'AdV-25 et un coxsackievirus, ce qui renforce les résultats précédents, mais également et ce qui est beaucoup plus étonnant, sur le HCoV OC43, même après un temps de contact de 10 min (Wood A. et Payne D., 1998).

Par ailleurs, la CHX à 0,05% (m/v) diluée dans de l'éthanol à 70% montre une activité certaine sur le rotavirus (Ansari S.A. *et al.*, 1989).

Platt et coll. ont examiné l'action sur le VRS de solutions de CHX en association ou non avec un détergent (spécialité Hibitane® vs. Hibiscrub®). Ils ont alors remarqué que les solutions de CHX à 0,25% ou à 0,05% (m/v) n'avaient qu'une très faible activité sur le VRS alors que si le détergent (poloxamère 237, contenu dans l'Hibiscrub®) était associé, l'activité devenait nettement appréciable. L'activité anti-VRS semblait ainsi plutôt due à la présence du détergent qu'à celle de la CHX, ou alors à une synergie d'action pouvant probablement s'expliquer par la désorganisation de l'enveloppe induite par les détergents et par la CHX (Platt J. et Bucknall R.A., 1985).

### 2.2.2 L'hexamidine

#### Origines et utilisation

L'HXM (CAS : 3811-75-4) ou (hexaméthylènedioxy)4,4'dibenzamidine bis-(hydroxy-2 éthanesulfonate) appartient au groupe des diamidines aromatiques.

L'HXM est commercialisée en France dans diverses préparations dont l'Hexomédine® est la plus connue. Elle est utilisée en usage externe pour l'ATS de la peau et des muqueuses et également dans le cadre d'infections cutanées à risque de surinfection, à la concentration de 0,1% (m/v) ou à 0,15% (m/v). Considérant son spectre d'action étroit, elle n'est pas recommandée dans la désinfection des champs opératoires. L'HXM est également retrouvée dans des formulations destinées à un usage ORL ou ophtalmologique ou encore dans certains produits cosmétiques.

#### Propriétés physico-chimiques

L'HXM est insoluble dans l'eau et se présente sous forme d'une poudre blanche. Pour cette raison, elle est utilisée sous forme de diiséthionate d'HXM (CAS RN : 659-40-5) dont la solubilité est de 55 g.L<sup>-1</sup> dans l'eau. La solution aqueuse est incolore.

L'HXM est également soluble dans l'alcool à 30%, les solutions hydro-alcooliques étant plus stables que les solutions aqueuses. La masse moléculaire de l'HXM est de 606,72 g.mol<sup>-1</sup>.

#### Mécanisme d'action et propriétés microbicides

Le mode d'action de l'HXM est encore mal connu. Elle agirait soit sur les enzymes bactériennes et réduirait la synthèse protéique, soit sur la membrane cytoplasmique et induirait une fuite des constituants intracellulaires. Son activité est favorisée par un pH alcalin et faiblement réduite par les substances protéiques (Fleurette J., 1995).

A notre connaissance, aucune étude n'a examiné le pouvoir virucide de l'HXM, si ce n'est celle que nous avons précédemment réalisée. Nous avons alors montré l'absence d'activité de l'HXM en solution aqueuse sur le HCoV 229E ("Human coronavirus" ou coronavirus humain souche 229E) en 60 min et à 10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup> (Geller C. *et al.*, 2009).

### 2.2.3 Les alcools

#### Origines et propriétés générales

Les alcools semblent être utilisés depuis des temps très reculés pour leurs propriétés ATS-D en médication interne, sous forme de vin ou autres boissons fermentées mais ce n'est qu'à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle que les alcools vont trouver des applications ATS-D authentiques. Parmi eux, l'éthanol, l'isopropanol, le phénol ou encore l'alcool benzylique ont été les plus couramment utilisés.

Les alcools sont des substances incolores s'évaporant rapidement, souvent utilisés comme solvants d'autres ATS-D. Ils sont bactéricides plutôt que bactériostatiques, ils agissent rapidement, sont peu toxiques, ne colorent pas la peau, sont d'un coût faible et d'obtention aisée. Ils ont cependant un faible pouvoir de pénétration et ne doivent donc être utilisés que sur des surfaces propres. Ainsi, ils sont largement utilisés dans l'ATS de la peau saine ou alors sur les plaies et muqueuses mais à des concentrations plus faibles. Ils sont également très utilisés dans la désinfection d'instruments médico-chirurgicaux.

#### Mécanismes d'action

Leur mécanisme d'action semble lié à la dénaturation des protéines et à la dissolution des membranes lipidiques. Ce mécanisme nécessite la présence d'eau. En son absence, les protéines ne sont pas dénaturées aussi rapidement. De ce fait, l'éthanol absolu est moins actif que l'éthanol à 70%, considéré comme la dilution la plus efficace (Annexe 1, p.124). Les mécanismes d'action virucide sont encore assez peu compris. Cependant, il semble cohérent qu'ils agissent sur les virus enveloppés par désorganisation de l'enveloppe de nature phospholipidique. L'éthanol semble également agir sur les protéines virales (Spire B. *et al.*, 1984).

Les alcools sont efficaces contre les virus, même nus et donc, dans la prévention de la transmission des ILS virales, notamment par les mains (Steinmann J., 2005).

### 2.2.4 Les dérivés halogénés

#### 2.2.4.1 Les dérivés iodés

##### Origines

Au 19<sup>ème</sup> siècle, l'iode était utilisé dans le traitement des lésions cutanées induites par la tuberculose ou la syphilis puis pour traiter l'érysipèle. Les premières preuves apportées scientifiquement de l'activité antimicrobienne de l'iode nous viennent de Davaine, microbiologiste Français, puis de Koch qui démontrera son activité sur les spores de charbon. A partir de 1910, son utilisation en ATS cutanée sera définitivement établie. Cependant, malgré son efficacité largement démontrée, l'utilisation de l'iode a été ensuite quelque peu délaissée du fait d'inconvénients majeurs tels que sa faible solubilité dans l'eau, son action colorante et les risques de sensibilisation et d'allergie. Dans les années 1950, l'apparition de complexes organiques, permettant la solubilisation de l'iode, les iodophores, ont redonné un second souffle à cette molécule. Ainsi, l'iode est toujours l'un des ATS-D les plus utilisés. Il existe sous plusieurs formes : les solutions alcooliques (teinture d'iode, alcool iodé), les solutions aqueuses comme le lugol et bien sûr les iodophores dont le plus connu et le plus utilisé est la povidone-iodine ou polyvinylpyrrolidone iodée (PVP-I).

### Propriétés physico-chimiques et mécanisme d'action

L'iode est un composé oxydant et hautement réactif. La stabilité de l'iode en solution aqueuse varie beaucoup selon le pH et son activité microbicide est plus importante à pH acide qu'à pH alcalin. Par ailleurs, cette activité est réduite par la présence de matières organiques. L'iode est, de plus, incompatible avec le mercure avec lequel il forme des sels insolubles inactifs.

L'agent microbicide correspond à l'iode diatomique ( $I_2$ ) et son activité augmente donc avec la teneur en iode libre. L'iode agit comme un accepteur d'électrons et bloque le transport de ces derniers au niveau des enzymes de la chaîne respiratoire. Il agit également en réagissant avec les fonctions amines des protéines et des nucléotides et provoque l'oxydation des groupements SH de la cystéine.

Il peut exister un passage systémique de l'iode moléculaire. Néanmoins, l'iode est en général peu toxique, même si dans certaines circonstances, il peut se révéler irritant pour la peau, voire entraîner des états d'hypersensibilisation, se manifestant principalement par des réactions cutanées pouvant se généraliser.

### Les iodophores

Les iodophores ont, quant à eux, commencé à être utilisés comme ATS dans les années 1960. Les iodophores sont des polymères organiques fixant l'iode ou les iodures et permettant : (i) de constituer une réserve d'iode, (ii) de le solubiliser, (iii) d'augmenter sa dispersion et sa pénétration et (iv) de le libérer progressivement. Le plus couramment utilisé est la polyvinylpyrrolidone porteur de 4 à 12% d'iode et formant ainsi la polyvinylpyrrolidone iodée ou PVP-I. La PVP-I est soluble dans l'eau, mais sa solubilité varie selon la longueur de la chaîne de polymère. Elle est instable à pH alcalin. En général, les préparations contiennent de 1 à 10% de PVP-I, ce qui correspond à 0,1 à 1% d'iode disponible (Fleurette J. *et al.*, 1995).

### Activité virucide et utilisation

L'activité virucide de l'iode, sous forme de solutions iodées ou de complexes de PVP-I, est très bonne puisqu'il montre une activité sur les virus enveloppés comme sur les virus nus (Annexe 1, p.124). De plus, certaines études ont montré que la désinfection des mains avec des formulations à base d'iode permettait l'interruption du transfert de virus (Gwaltney J.M. *et al.*, 1980, Turner R.B. et Hendley J.O., 2005).

La PVP-I n'a pas une action équivalente sur tous les virus. Elle permet par exemple de diminuer le titre viral des HCoV 229E et OC43 de 50% en 5 min. Cependant, la diminution induite pour le HCoV 229E nécessite une solution 50 fois plus concentrée que pour le HCoV OC43 (Sizun J. *et al.*, 2000).

Ainsi du fait de sa faible toxicité et de sa très bonne activité microbicide, la PVP-I trouve des applications variées, i.e. lavage hygiénique et chirurgical des mains, ATS préopératoire, ATS de la peau et/ou des muqueuses lésées, et se décline dans une grande variété de formulations qu'il s'agisse de solutions aqueuses, alcooliques ou encore moussantes. En France, le produit phare est la Bétadine®.

#### 2.2.4.2 Les dérivés chlorés

##### Origines

L'utilisation du chlore et de ses dérivés remonte au 18<sup>ème</sup> siècle avec la découverte par Claude Berthollet des propriétés décolorantes de l'hypochlorite de potassium. Très rapidement, les composés chlorés ont été utilisés comme agents désinfectants dans le milieu hospitalier. Peu après, Antoine Labarraque, chimiste et pharmacien, mit au point la liqueur qui porte son nom et qui a été très largement utilisée lors des épidémies de choléra qui sévirent en Europe au cours du 19<sup>ème</sup> siècle. De plus, Labarraque démontra l'intérêt de la désinfection de l'air par les chlorures dans les lieux pollués tels que les prisons, les égouts ou les salles de dissection. Au début du 20<sup>ème</sup> siècle, l'utilisation des chlorures s'est étendue à la désinfection des eaux potentiellement contaminées puis en 1915, le médecin et chimiste Henry Dakin mit au point la solution de Dakin utilisée dans l'ATS des plaies notamment durant la première guerre mondiale.

Un des problèmes soulevés par les solutions chlorées était l'unité utilisée pour exprimer la quantité de chlore. Pendant longtemps en France, le degré dit de "Gay-Lussac" a été appliqué mais il a depuis été remplacé par le pourcentage de chlore actif (qui peut aussi être exprimé en parties par million), d'origine anglo-saxonne, plus exact et correspondant au nombre de grammes de chlore actif dégagé pour 100 g d'hypochlorite. Cette dernière unité est celle dorénavant retenue au niveau Européen.

##### Propriétés physico-chimiques et mécanismes d'action

Généralement ce que l'on nomme chlore actif en solution aqueuse correspond aux espèces chimiques suivantes : l'ion hypochlorite ( $\text{ClO}^-$ ), le chlore diatomique ( $\text{Cl}_2$ ) et l'acide hypochloreux ( $\text{HClO}$ ), présentant l'activité microbicide la plus forte. Ces composés semblent agir au niveau de la membrane cellulaire et des enzymes cytoplasmiques, et la rapidité de leur action paraît être due à leur pouvoir oxydant.

L'activité des dérivés chlorés est dépendante de différents facteurs comme le pH, la température ou encore la présence de matières organiques (inactivation des produits chlorés).

L'activité antibactérienne est ainsi maximale à pH 5, valeur à laquelle la dissociation de l' $\text{HClO}$  est la plus forte. A pH plus acide, l'activité diminue car il y a formation de chlore volatil et à pH alcalin, elle diminue également de par la diminution de la proportion d' $\text{HClO}$ . Cependant, pour une meilleure conservation de ces solutions et de leur activité antimicrobienne, il est préférable de les alcaliniser. Il est ainsi nécessaire de "jongler" sur les différents paramètres pour obtenir le meilleur rapport entre conservation et activité.

##### Activité microbicide et utilisations (Annexe 1, p.124)

Les solutions d'hypochlorite de sodium rassemblent l'eau de javel, la solution de Dakin et la liqueur de Labarraque, qui se différencient par leur concentration en chlore actif. Elles sont bactéricides, sporicides, sporozoairicides, fongicides et virucides. L'activité virucide se manifeste autant sur les virus enveloppés que sur les virus nus (Narang H.K. et Codd A.A., 1983, Sattar S.A. *et al.*, 1989, Sattar S.A. *et al.*, 1993, Lai M.Y. *et al.*, 2005).

L'eau de javel est très utilisée dans la désinfection des surfaces, du matériel mais sa concentration est trop élevée (12 à 15% de chlore actif dans les solutions commerciales concentrées et utilisées à des concentrations finales entre 2 et 5% de chlore actif) pour pouvoir être utilisée sur les tissus vivants.

Le soluté de Dakin est une solution d'hypochlorite de sodium diluée (0,5% de chlore actif) et neutralisée par ajout de bicarbonate de sodium. Il est utilisé dans l'ATS de la peau et des muqueuses, avec ou sans lésion (Fleurette J. *et al.*, 1995).

### 2.2.5 Les ammoniums quaternaires

#### Origines et propriétés physico-chimiques

Les ammoniums quaternaires rassemblent un ensemble de molécules aux propriétés pharmacologiques diverses, i.e. propriétés curarisantes, muscariniques, etc., ainsi que des propriétés ATS-D. Ces dernières sont connues et utilisées depuis le début du 20<sup>ème</sup> siècle.

Les ammoniums quaternaires sont des surfactants amphiphiles contenant un ion ammonium dont l'un au moins des substituants est hydrophobe. Il en existe une très large variété selon les substituants de l'azote. Les ammoniums quaternaires les plus employés, comme agents ATS-D ou conservateurs, sont le bromure de cétrimonium et les chlorures de benzalkonium.

Le cétrimide (mélange de bromure de cétrimonium et de dodécyl-triméthyl-ammonium) est très utilisé surtout en association avec la CHX.

Ces composés sont très solubles dans l'eau et dans l'alcool.

Grâce à leurs propriétés tensioactives, ce sont des agents mouillants, émulsionnants et solubilisants. Les solutions sont légèrement moussantes avec formation de micelles. Ils forment des complexes avec les protéines et les graisses, d'où leur pouvoir détersif sur les plaies. Les solutions aqueuses sont légèrement alcalines.

Les ammoniums quaternaires sont incompatibles avec les détergents anioniques, avec lesquels ils forment des précipités insolubles dans l'eau, et avec de nombreux agents ATS-D comme les dérivés halogénés ou encore certains phénoliques. Par ailleurs, ils sont compatibles avec l'alcool et comme nous l'avons vu avec la CHX, avec lesquels ils développent une activité synergique.

#### Mécanismes d'action

Ils agissent par adsorption à la surface des cellules chargées négativement qu'ils neutralisent, entraînant ainsi des changements dans la perméabilité membranaire puis des lésions de la paroi et membrane cytoplasmique, réversibles à faibles concentrations. Il se produit alors une fuite des éléments cellulaires notamment des ions potassium. De plus, à fortes concentrations, l'inactivation des enzymes respiratoires, la dénaturation et/ou la précipitation des protéines et des acides nucléiques peuvent survenir.

L'activité biologique des ammoniums quaternaires dépend de la longueur de la chaîne carbonée des substituants de l'azote. Leur activité varie en fonction du pH. Ils sont plus actifs à pH neutre ou légèrement alcalin (entre 7 et 11), et sont complètement inactifs pour des pH inférieurs à 3,5. Par ailleurs, ils sont plus actifs si la température augmente. Enfin, la présence de matières organiques limite fortement leur activité.

#### Propriétés virucides (Annexe 1, p.124)

L'activité virucide des ammoniums quaternaires est variable selon la concentration, la formulation dans laquelle ils sont incorporés et la nature des virus. D'une façon générale, les ammoniums quaternaires seuls sont peu actifs sur les virus, qu'ils soient nus ou enveloppés. Par exemple, le chlorure de diméthyl-benzyl-ammonium à 0,04% est inefficace sur un coxsackievirus, un AdV-5, le PIV-3 ou encore le HCoV 229E. Cependant à la même concentration mais associé à de l'acide chlorhydrique, il permet l'inactivation de tous ces virus. De la même façon, associé à de l'éthanol à 70%, il est actif sur tous les virus sauf sur le coxsackievirus.

Le cétrimide est, quant à lui, actif sur le PIV-3 et le HCoV 229E lorsqu'il est associé à la CHX, mais pas sur les virus nus. L'ajout d'éthanol à 70% à ces deux molécules permet alors l'inactivation de AdV-5 mais toujours pas du coxsakievirus (Sattar S.A. *et al.*, 1989).

### 2.2.6 Les composés phénoliques

#### Origines

Le phénol a été introduit au 19<sup>ème</sup> siècle comme agent ATS notamment en chirurgie par Joseph Lister. Du fait de sa toxicité aiguë et/ou chronique, il a progressivement été remplacé par des dérivés phénoliques, agissant à des concentrations plus basses.

#### Propriétés physico-chimiques

Du fait de leur nature lipophile, les composés phénoliques sont peu solubles dans l'eau et de ce fait, souvent associés à des savons anioniques et alcalins qui en facilitent la solubilisation. La structure et la substitution de ces phénols influencent largement leurs propriétés antibactériennes. Les molécules présentant le plus d'intérêt en ATS-D sont les halogénophénols comme le chlorophénol, les acides-phénols et les polyphénols.

#### Mécanismes d'action et propriétés antibactériennes

L'activité microbicide des composés phénoliques est diminuée de façon importante par dilution ou par la présence de matières organiques et ils sont plus actifs à pH acide. Les phénols agissent par dénaturation des protéines et de la membrane cytoplasmique et fuite des composants intracytoplasmiques. Ils peuvent également intervenir sur les systèmes enzymatiques comme les déshydrogénases cellulaires.

#### Propriétés antivirales

Les composés phénoliques sont en général peu efficaces sur les virus, qu'ils soient nus ou enveloppés. Il a en effet été démontré qu'ils ne présentaient qu'une très faible activité voire pas d'activité du tout sur les virus nus tels que le virus de l'hépatite A, le rotavirus ou le rhinovirus (Springthorpe V.S. *et al.*, 1986a, Mbithi J.N. *et al.*, 1990, Sattar S.A. *et al.*, 1993). Sur les virus enveloppés comme le HSV-1, les résultats ne sont pas beaucoup plus probants (Tyler R. et Ayliffe G.A., 1987).

Cependant, il est particulièrement important de prendre en compte, non seulement le temps de contact, les concentrations ou la présence de produits associés, mais aussi la nature des composés phénoliques testés (Annexe 1, p.124).

#### Toxicité

Les principaux inconvénients des phénols sont représentés par leur effet caustique sur la peau et les tissus. De plus, leur caractère lipophile permet une pénétration accrue de ces produits et entraîne une toxicité systémique, notamment hépatique, cérébrale et/ou rénale. Il s'est ainsi produit des cas d'intoxication grave après application cutanée de dérivés phénoliques notamment chez les nourrissons. De ce fait, les composés phénoliques sont actuellement assez peu utilisés en tant qu'ATS-D (Fleurette J. *et al.*, 1995).

### 2.2.7 Les aldéhydes

Les aldéhydes constituent une famille très large dont seuls quelques composés présentent des propriétés désinfectantes intéressantes. Les plus utilisés sont le formaldéhyde et le glutaraldéhyde.

#### 2.2.7.1 Le formaldéhyde

##### Propriétés physico-chimiques

Le formaldéhyde est utilisé depuis longtemps comme désinfectant sous sa forme gazeuse, bien que maintenant son usage ne soit plus recommandé. Il s'agit d'un gaz incolore, soluble dans l'eau, d'odeur irritante et se polymérisant rapidement en produits inactifs. Il a un faible pouvoir de diffusion et est peu corrosif pour les instruments (Fleurette J. *et al.*, 1995).

##### Mécanismes d'action et propriétés microbicides

Le formaldéhyde agit par dénaturation des protéines enzymatiques et structurales et alkylation des acides nucléiques. Le formaldéhyde se comporte comme un réducteur et un fixateur de protéines. L'activité antimicrobienne du formaldéhyde est proportionnelle à sa concentration, à la température et à l'humidité relative qui retarde la polymérisation. Il se produit une baisse rapide de son activité en présence de sang, de sérum ou autres matières organiques (Fleurette J. *et al.*, 1995).

##### Utilisations

Le formaldéhyde a de multiples applications en raison de ses propriétés physico-chimiques en tant que biocide, conservateur ou fixateur. Il entre également dans la fabrication de certains vaccins pour inactiver les virus entrant dans leur composition.

Dans le domaine de l'ATS-D, il était traditionnellement utilisé soit sous forme gazeuse, soit sous forme liquide. Ces associations étaient surtout utilisées dans la désinfection des sols, des surfaces et de l'air pour les formes gazeuses. Cependant, depuis 2004, le Centre International de Recherche sur le Cancer a classé le formaldéhyde comme "agent cancérigène avéré pour l'homme". L'exposition au formaldéhyde par voie aérienne constitue la principale source d'exposition à cette substance. L'Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail a donc émis un avis quant à l'utilisation du formaldéhyde et à l'exposition professionnelle, qui engage les utilisateurs à trouver des solutions de substitutions (AFSSET, 2004).

#### 2.2.7.2 Le glutaraldéhyde

##### Origines et propriétés physico-chimiques

Le glutaraldéhyde, quant à lui, a tout d'abord été utilisé comme fixateur cellulaire en microscopie électronique et ses propriétés microbicides ont été mises en évidence plus tardivement. Il s'agit d'un dialdéhyde soluble dans l'eau et dans l'alcool, très réactif avec les protéines. En solution aqueuse, le glutaraldéhyde a tendance à se polymériser avec, pour conséquence, un blocage de ses sites actifs (les groupements aldéhydes). Un pH acide retarde cette polymérisation, les solutions de glutaraldéhyde commerciales sont donc légèrement acidifiées. Le glutaraldéhyde a une action corrosive extrêmement réduite.

##### Mécanismes d'action et propriétés microbicides



L'activité du glutaraldéhyde est due à la présence des groupements aldéhydes libres qui réagissent avec les groupements thiols et aminés cellulaires. Le corollaire de ce mode d'action est que ses cibles cellulaires sont nombreuses (paroi bactérienne, membrane plasmique, acides nucléiques, enzymes etc.). Malgré sa très grande réactivité avec les protéines, le glutaraldéhyde est peu sensible aux substances interférentes telles que les matières organiques et n'est pas inactivé par 20% de sérum ou 1% de sang (Fleurette J. *et al.*, 1995)

Son activité bactéricide est très bonne et rapide. Son activité sur les autres microorganismes (mycobactéries, spores, virus, champignons) est légèrement moins bonne et plus lente. Il est principalement utilisé dans la désinfection des sols et des surfaces. Néanmoins, le glutaraldéhyde n'est plus recommandé dans la désinfection des instruments et notamment des endoscopes à cause du risque de fixation de l'infectiosité du prion et donc de sa possible transmission. Il est remplacé notamment par de l'acide peracétique (DGS/DHOS (Direction Générale de la Santé et Direction de l'Hospitalisation et de l'Organisation de Soins), 2003).

Une étude menée sur le SARS-CoV a montré que ce virus pouvait être inactivé par le formaldéhyde et le glutaraldéhyde, mais que cela dépendait grandement des conditions environnementales. En effet, aucun de ces deux composés, à 0,009% et 0,002% respectivement, n'a été capable d'inactiver le SARS-CoV même après trois jours d'incubation, à 4°C. Cependant à 25°C et à 37°C, le formaldéhyde a inactivé la quasi-totalité du virus dès le premier jour d'incubation. Le glutaraldéhyde a, quant à lui, complètement inactivé le virus dès le premier jour à 37°C et dès le second jour à 25°C (Darnell M.E. *et al.*, 2004).

Après avoir considéré ce paragraphe ainsi que l'annexe 1, un inventaire précis des activités virucides des ATS-D est très difficile à réaliser du fait de la multiplicité des composés et de leur possible association mais aussi de la grande variabilité des études réalisées à ce sujet (types de test, temps de contact, présence ou non de matières interférentes, concentrations testées, expression des résultats, etc.).

Ainsi, afin de pouvoir comparer ces activités virucides et d'opérer à des choix avisés en pratique, il est absolument nécessaire d'uniformiser et de standardiser les méthodes d'évaluation de l'ATS-D antivirale.

## 2.3 Méthodes d'évaluation de l'activité ATS-D

Il existe différentes manières d'évaluer l'efficacité des ATS-D chimiques. Elles peuvent être catégorisées en deux groupes principaux : les tests en suspension simples à mettre en œuvre et les tests sur support qui tentent de mimer les conditions réelles d'utilisation (simulation de contamination de surfaces, d'instruments ou des mains). Il existe encore un manque de standardisation au sein de ces derniers tests rendant les comparaisons inter-laboratoires difficiles.

### 2.3.1 Principes fondamentaux

Le but de l'évaluation de l'activité ATS-D d'agents chimiques est de s'assurer que les ATS-D utilisés sont capables de garantir une efficacité antimicrobienne suffisante vis-à-vis des microorganismes susceptibles d'être présents ; et ce dans des conditions d'usage particulières, que ce soit dans les établissements de soins ou dans la communauté.

Des méthodes normatives spécifiant les modalités d'évaluation selon les microorganismes cibles existent mais diffèrent selon les pays.

Bien que le principe général de l'évaluation de l'activité ATS-D paraisse simple, il doit tenir compte d'un grand nombre de facteurs pour garantir la reproductibilité et la fiabilité des résultats obtenus. Il existe, depuis maintenant quelques décennies, des règles générales adoptées, quels que soient les normes ou les microorganismes testés.

Trois principales étapes conduisent l'évaluation de l'activité ATS-D : (i) les tests préliminaires permettant le criblage de molécules potentiellement ATS-D et permettant également de connaître les qualités intrinsèques d'un ATS-D, (ii) les tests de laboratoire simulant des conditions d'usage et permettant de définir au mieux les conditions d'utilisation d'un agent chimique et (iii) les tests réalisés hors du laboratoire dans les conditions réelles d'utilisation et permettant d'évaluer le résultat final du processus de désinfection. Ces derniers restent très difficiles à mettre en œuvre de par la difficulté de proposer des méthodes reproductibles et/ou standardisables et de par leur coût potentiellement élevé. Ils ne sont donc pour l'instant qu'anecdotiques et il n'existe pas encore de norme à leur sujet.

### 2.3.2 Les différents types des tests

#### 2.3.2.1 Les tests en suspension

Les tests en suspension sont des tests préliminaires, faciles à mettre en œuvre et applicables à tous les microorganismes. Ils permettent d'établir que, pour une concentration donnée, un agent chimique est capable d'éliminer une certaine proportion de microorganismes, pendant un laps de temps défini.

Le principe de base repose sur la mise en contact : (i) d'un inoculum de taille connue de microorganismes et (ii) d'un volume plus grand de l'agent chimique à tester ou d'une solution contrôle, connue pour être inoffensive sur les microorganismes testés, et ce pendant un temps de contact défini. Il est possible d'ajouter des substances interférentes pour mimer des conditions dites

"propres" ou "sales". Pour garantir le temps de contact, une étape de neutralisation est nécessaire, c'est-à-dire l'inhibition de la potentielle activité ATS-D du produit testé à un moment précis et l'élimination de son éventuelle cytotoxicité. L'efficacité est ensuite estimée par la différence des titres de microorganismes avec et sans (solution contrôle) traitement (Sattar S.A., 2006).

Pour prétendre à une activité ATS-D, le produit doit induire une réduction dont l'ampleur est définie par les autorités normatives compétentes. Cette réduction diffère selon les microorganismes testés et selon les pays. Elle est valable quel que soit le type de test, en suspension ou sur support.

#### 2.3.2.2 Les tests sur support

Les tests permettant de simuler des conditions d'usage en laboratoire, donc *in vitro*, sont des tests sur support, dont la nature peut être variable, i.e. acier, plastique, verre, tissu, etc. Ce support est contaminé de façon artificielle avec un inoculum, de taille connue, du microorganisme testé, qui est laissé sécher dans des conditions qui doivent être précisées. Cet inoculum peut, ou non, contenir des matières organiques, dans lesquelles les microorganismes vont s'incorporer durant le séchage. Ce support contaminé est ensuite recouvert d'une certaine quantité de l'agent chimique dont on veut connaître l'activité microbicide. Après un temps de contact défini, l'activité du produit testé est neutralisée, l'inoculum est alors récupéré par élution dans une solution tampon ou du milieu de culture puis les micro-organismes survivants sont dénombrés. L'efficacité, est, de même que pour les tests en suspension, estimée par la différence du titre entre l'inoculum de départ et l'inoculum obtenu après traitement.

Le choix du support doit répondre à certaines considérations : (i) le microorganisme ne doit pas se lier ou être adsorbé sur ce support de façon à ne pas entraver son élution ultérieure, (ii) le support ne doit pas non plus être trop lisse et au contraire présenter certaines irrégularités représentant au mieux la topographie des surfaces contaminées en pratique réelle, (iii) si le support est réutilisable, il doit supporter des processus de stérilisation, (iv) sa surface doit permettre le dépôt de la quantité désirée de microorganismes et de germicide et enfin, (v) le support doit avoir une taille permettant son immersion dans des volumes raisonnables pour éluer le virus et en permettre la récupération la plus efficace et ne pas induire de perte dans le titre infectieux. En effet, si ces conditions ne sont pas respectées, la perte de pouvoir infectieux résultera d'une part de l'action de l'agent microbicide mais aussi de la perte de microorganismes par une élution inadéquate. Ceci induirait une surestimation du pouvoir ATS-D du produit testé. L'utilisation d'un système clos peut alors permettre de surmonter ces écueils (Crémieux A. *et al.*, 2001, Sattar S.A. *et al.*, 2003, Lambert R.J.W., 2004).

La précision des informations obtenues lors de ces tests résulte de différents facteurs définis au préalable : (i) une quantité d'inoculum standardisée et connue, (ii) une concentration de désinfectant précise, (iii) un temps de contact défini, (iv) des paramètres physicochimiques contrôlés (température, dureté de l'eau, humidité relative) et (v) la nature des substances interférentes qui vont ou non être ajoutées. Ces différents facteurs permettent notamment de mimer des conditions que l'on peut retrouver en pratique.

### 2.3.2.3 Cas particulier de l'ATS des mains

D'autres méthodes ont été développées notamment pour évaluer l'activité ATS sur les mains, d'une part parce que les formulations utilisées pour l'ATS des mains sont en général très différentes de celles utilisées pour la désinfection des surfaces et des instruments et d'autre part, parce que la surface cutanée offre des micro-conditions particulières tant pour les germicides testés que pour les virus eux-mêmes. Par ailleurs, différentes études ont montré que les virus sont capables de survivre sur les mains et d'être transférés sur des surfaces inertes et inversement (Bibliographie, 1.3).

Des protocoles ont été développés utilisant soit la main entière soit seulement la pulpe des doigts de volontaires sains. Par exemple, Sattar et coll. ont proposé un protocole d'évaluation de l'activité ATS des solutions pour le lavage des mains utilisant la pulpe des doigts. Le principe général repose sur le dépôt d'un inoculum viral, contenant ou non des matières organiques, sur la pulpe des doigts de volontaires, de laisser sécher cet inoculum puis de le soumettre à l'action de la solution à tester pendant le temps de contact désiré. En parallèle, des contrôles sont réalisés sur certains doigts. L'évaluation de l'efficacité antivirale résulte, comme pour les autres tests, de la différence des titres viraux avec et sans traitement (Sattar S.A. et Ansari S.A., 2002).

## 2.4 L'évaluation de l'activité ATS antivirale et ses particularités

### 2.4.1 Principes

Les principes généraux des tests restent les mêmes que ceux énoncés précédemment mais certains aménagements techniques doivent être apportés pour prendre en compte les contraintes dues notamment à la culture virale sur cellules.

En effet, l'évaluation de l'activité ATS-D d'un agent chimique sur un virus repose, comme pour les autres microorganismes, sur la mesure de la perte de pouvoir infectieux de la suspension virale avant et après traitement. L'usage de cultures cellulaires pour la réplication virale occasionne des difficultés, qui peuvent parfois se révéler insurmontables, du fait de la cytotoxicité des produits testés. En effet, outre le risque de lyse cellulaire, les agents chimiques peuvent rendre les cellules insensibles à l'infection virale en inhibant la pénétration du virus, que ce soit par altération des récepteurs cellulaires, de la membrane ou par des phénomènes de compétition. De plus, certains agents, comme les aldéhydes, ont des propriétés de fixation cellulaire qui peuvent empêcher toute infection virale sans provoquer de dommage cellulaire apparent.

La détection des virus par des méthodes de biologie moléculaire (PCR, RT-PCR) pourrait réduire ces inconvénients mais n'est pas recommandée car elle ne permet pas de connaître le niveau infectieux résiduel.

De plus, la méthode de neutralisation, et plus particulièrement lors de l'utilisation de neutralisants chimiques, peut elle-même s'avérer cytotoxique. Ainsi, des contrôles additionnels sont nécessaires pour l'évaluation de l'activité virucide par rapport à celle dirigée contre d'autres microorganismes (Sattar S.A. *et al.*, 2003).

Le principe de l'évaluation de l'activité ATS-D antivirale repose donc sur les principes généraux de l'évaluation de l'activité ATS avec quelques modifications inhérentes à la présence de virus : (i) mise en contact des virus et du produit à tester pendant un temps de contact défini, (ii) neutralisation de

l'activité potentielle du produit, (iii) estimation de la perte de pouvoir infectieux du virus induite par le produit en le comparant à un témoin.

Ces tests nécessitent des contrôles appropriés jouant un rôle primordial dans l'interprétation des résultats. Il faut prouver : (i) l'absence d'interférence de la procédure elle-même sur le pouvoir infectieux du virus, (ii) l'efficacité de la neutralisation et (iii) l'absence de cytotoxicité. Il faut également développer des procédures qui soient les plus reproductibles possibles dans des conditions précisément définies (température, pression, humidité relative, substances interférentes, etc.) représentant le plus fidèlement possible les conditions réelles d'utilisation.

#### *2.4.2 Une étape critique : la neutralisation*

Une étape fondamentale des tests d'évaluation de l'activité ATS-D est la neutralisation. Cette étape permet non seulement de stopper l'activité potentielle de l'agent chimique testé, garantissant ainsi le temps de contact, mais aussi d'éliminer la cytotoxicité du produit testé, qui peut affecter sérieusement les résultats des tests. Le temps de contact doit refléter la réalité de l'utilisation potentielle du produit. Par exemple, pour une solution de lavage des mains, des temps de contact de 30 s, 1 min voire 3 min en cas de lavage chirurgical, semblent adaptés pour cet usage. Il existe trois principales méthodes de neutralisation : la dilution, la neutralisation chimique et la filtration sur gel.

##### **Neutralisation par dilution**

La neutralisation par dilution repose sur le fait que la concentration exerce un large effet sur l'activité ATS-D du produit testé. La relation entre la concentration et les effets antimicrobiens d'un biocide diffère largement selon les composés mais reste relativement constante pour un même produit. Cette méthode peut être efficace dans le cas de composés sensibles à ce facteur de dilution, comme les alcools, et qui ne présentent pas une cytotoxicité trop forte. Cependant, de nombreux agents chimiques à visée ATS-D sont trop toxiques et nécessitent une dilution très importante pour éliminer cette toxicité. Or cette dilution est également appliquée à l'inoculum, qu'il soit d'origine virale ou autre. Ce dernier doit alors avoir un titre très élevé pour pouvoir être quantifié par la suite, ce qui est très difficile à obtenir avec les virus, voire même impossible dans certains cas. Cette méthode n'est alors pas applicable et il faut utiliser une méthode de substitution.

##### **Neutralisation chimique**

Certains ATS-D peuvent être inactivés de façon chimique par antagonisme ou blocage de leurs sites actifs. Par exemple, le glutaraldéhyde peut être neutralisé par la glycine qui bloque les fonctions aldéhyde libres nécessaires à son activité ATS ou encore le thiosulfate de sodium neutralisant l'activité de la PVP-I (Davies J.G. *et al.*, 1993).

Certains mélanges neutralisants ont été développés comme le bouillon Dey-Engley ayant la capacité de neutraliser différents composés chimiques (Sutton S.V. *et al.*, 1991). D'autres substances comme le lait écrémé ont également été utilisées comme neutralisant (Kurtz J.B., 1979).

Dans tous les cas, il faut déterminer au préalable les concentrations de neutralisant à ajouter à l'ATS-D pour inhiber son activité à la concentration testée.

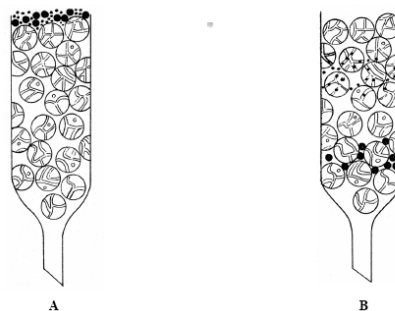
Ces deux méthodes de neutralisation, dilution et neutralisation chimique, présentent l'avantage, non négligeable, d'offrir une neutralisation théoriquement immédiate, permettant ainsi la garantie du

temps de contact. Cependant, compte tenu de la diversité des ATS-D existant et des formulations complexes, elles ne sont applicables que dans quelques cas particuliers (Sutton S.V., 1996).

### Neutralisation par filtration sur gel

La méthode de neutralisation par filtration, celle retenue dans notre étude, repose sur la séparation physique des microorganismes et de l'ATS-D testé. Cette méthode sera plus largement décrite au cours de cet exposé.

Elle consiste à filtrer le mélange ATS-D/suspension virale sur des colonnes de gels et par la loi de diffusion-exclusion, les virus, plus gros, sont élués dans les filtrats alors que les molécules testées, plus petites, sont piégées dans la colonne (Figure 1).



**Figure 1 : Principe de la filtration sur gel**

*(A) Le mélange contenant les constituants à séparer est déposé en haut de la colonne. (B) Les constituants dont la masse moléculaire est inférieure à la limite d'exclusion sont retenus par les billes constituant le gel alors que ceux dont la masse moléculaire est supérieure à cette limite, sont exclus du gel et récupérés dans le filtrat.*

#### 2.4.3 Les facteurs impliqués dans l'activité ATS antivirale

Techniquement, un grand nombre de facteurs doivent être maîtrisés pour parvenir à une évaluation correcte des ATS-D, la première nécessité étant de développer des tests standardisés pour obtenir des résultats reproductibles et comparables. De plus, la capacité d'un produit à agir sur une population de microorganismes donnée dépend bien évidemment de l'activité intrinsèque de ce produit mais aussi de la nature, de l'état et de l'environnement physico-chimique dans lequel se trouvent les microorganismes.

### Inocula et méthodes quantitatives

Les méthodes les plus anciennes pour tester l'efficacité antimicrobienne de composés chimiques étaient des méthodes qualitatives qui s'assuraient de l'absence de survivants pour confirmer l'activité microbicide des composés testés. Cependant, plus l'inoculum était faible, plus le produit semblait actif, et il pouvait donc se produire une surestimation de l'activité ATS-D.

Les méthodes ont donc évolué vers des méthodes quantitatives mesurant le taux de réduction de microorganismes soumis à l'action de l'agent chimique testé. Un des paramètres fondamentaux de cette évaluation quantitative, qui pourrait paraître paradoxal, est que la concentration testée et/ou le temps de contact ne doivent pas éliminer tous les microorganismes pour que ce taux de réduction puisse être mesuré. Il est alors important d'avoir une idée de la contamination usuelle par les microorganismes cibles des objets et/ou surfaces devant être désinfectées pour pouvoir déterminer la quantité d'inoculum nécessaire.

### Biofilms et substances interférentes

Les microorganismes peuvent se retrouver groupés en amas et inclus dans la matière organique environnante. Ils forment ainsi des "biofilms". Ces biofilms ne sont pas des structures continues mais peuvent être définis comme une accumulation d'agrégats de microorganismes, vivants ou morts, de même nature ou non, et dispersés de façon irrégulière dans une matrice de polymères organiques.

L'action antimicrobienne des agents chimiques est en général réduite sur ces biofilms. D'une part, les microorganismes, protégés par les matières organiques environnantes, sont plus difficiles d'accès pour les molécules ATS-D. D'autre part, il existe, à l'intérieur de ces biofilms, des micro-conditions (pH, type de microorganismes, etc.) qui peuvent différer d'un endroit à un autre dans la structure d'un même biofilm.

Sans désorganisation préalable de ce biofilm, les concentrations nécessaires en ATS-D sont dix à cent fois plus élevées que celles nécessaires pour agir sur des microorganismes en suspension. De plus, la possibilité d'avoir des populations hétérogènes de microorganismes associée à un mauvais choix dans la nature et/ou la concentration de l'ATS-D appliqué, peuvent conduire à la sélection d'agents plus résistants, modifiant ainsi la flore présente et la rendant plus dangereuse (Fleurette J. *et al.*, 1995).

Par ailleurs, l'activité intrinsèque de nombreux ATS-D (CHX, dérivés halogénés ou encore ammoniums quaternaires) peut être fortement altérée en présence de matières organiques. Ainsi, il est apparu nécessaire d'introduire des substances interférentes dans les tests d'évaluation de l'activité ATS-D. Historiquement, les substances interférentes utilisées étaient des matières fécales. En effet, le PV peut être considéré comme le modèle viral "universel" des tests d'évaluation de l'activité ATS-D antivirale. Or ce dernier est un entérovirus dont la transmission est liée au péril fécal. Cependant, les fèces amènent différentes difficultés : (i) elles peuvent être cytotoxiques, (ii) elles peuvent contenir des inhibiteurs viraux et (iii) elles sont, par essence, difficilement standardisables.

D'autres substances ont donc été envisagées comme la mucine bovine. La mucine bovine a par exemple été utilisée à la concentration de 5 mg.mL<sup>-1</sup> pour représenter le niveau protéique trouvé dans des sécrétions humaines normales sans qu'il y ait de risque de contamination (Sattar S.A. *et al.*, 1989). D'autres substances telles que du sang ou des concentrés d'érythrocytes, du sérum, du lait ou encore des extraits de levure ont été utilisées à cette fin.

### Conditions environnementales et paramètres physico-chimiques

Les paramètres physico-chimiques tels que la température, le pH, la dureté de l'eau utilisée et la nature des électrolytes potentiellement présents jouent aussi un rôle considérable et doivent être maîtrisés pour obtenir des conditions reproductibles (Crémieux A. *et al.*, 2001). Le contrôle de la qualité de l'eau est très important notamment pour la teneur en ions comme les ions calcium ou magnésium qui peuvent interagir avec les produits testés et influencer sur leur activité. De plus, il semble important de tester différents lots de produits pour s'assurer de la reproductibilité des résultats.

En outre, dans le cadre notamment des tests sur support, il est crucial de connaître les taux de survie des virus dans différentes conditions (Bibliographie, 1.3).

## 2.5 Une seule norme Européenne : la norme NF EN 14476+A1

Pour standardiser ces méthodes et permettre la comparaison des résultats, des normes ont été établies par les différents organismes de certification (Américain, Européen, etc.).

En Europe, une seule norme existe pour définir les conditions d'évaluation de l'activité ATS-D antivirale des agents chimiques en médecine humaine, la norme NF EN 14476+A1 (AFNOR, 2007). Il existe cependant deux autres normes pour tester les ATS-D antiviraux, l'une applicable au domaine vétérinaire, la norme NF EN 14675 (AFNOR, 2006b) et l'autre applicable au domaine agro-alimentaire et industriel, la norme NF EN 13610 (AFNOR, 2003) mais faisant appel à des bactériophages comme virus modèles.

Les normes relatives à l'évaluation de l'activité ATS-D sont classées en différentes catégories selon la nature de l'essai et sa finalité (Tableau 3).

**Tableau 3 : Les différentes catégories d'essais permettant l'évaluation de l'activité d'un biocide**

Catégorie de l'essai	Description et finalité	Commentaire
<b>Phase 1</b>	Essais de suspension quantitatifs permettant d'établir qu'un produit a une activité bactéricide, fongicide ou sporicide, quelles que soient les conditions spécifiques d'usage prévu	Il n'existe pas à ce jour (et il n'en est pour l'instant pas prévu) d'essai de phase 1 permettant d'établir une activité virucide
<b>Phase 2</b>		
<b>Phase 2, Etape 1</b>	Essais de suspension quantitatifs permettant d'établir qu'un produit a une activité bactéricide, fongicide, mycobactéricide, sporicide ou virucide simulant des conditions pratiques correspondant à l'usage prévu (temps de contact précis, présence de substances interférentes de type organiques...)	
<b>Phase 2, Etape 2</b>	Autres essais de laboratoire quantitatifs simulant les conditions pratiques, par exemple des essais sur des surfaces, des instruments, des essais de lavage des mains et de friction des mains, en vue d'établir qu'un produit a une activité bactéricide, fongicide, mycobactéricide, sporicide ou virucide	
<b>Phase 3</b>	Essais de terrain dans des conditions pratiques	On ne dispose pas actuellement d'une méthodologie validée pour ce type d'essai

(AFNOR, 2006a)

La norme NF EN 14476+A1 décrit une méthode d'essai de phase 2, étape 1, pour l'évaluation de l'activité virucide des ATS-D chimiques utilisés en médecine humaine, en fonction de l'utilisation potentielle du produit (désinfection de surfaces et d'instruments, lavage hygiénique ou chirurgical des mains et désinfection thermochimique).

Elle précise, selon chaque utilisation potentielle, les souches virales à tester, les températures, les temps de contact ou encore la nature des substances interférentes (Tableau 4). La méthode décrite a pour objet de déterminer l'activité de formulations commerciales ou de substances actives dans leurs conditions d'emploi. Cette norme fixe ainsi la méthodologie, les seuils pour les contrôles et pour la validation de la méthode.



Tableau 4 : Conditions d'essai requises par la norme NF EN 14476+A1

Conditions d'essai	Désinfectants de surfaces et d'instruments	Lavage et imprégnation hygiéniques des mains	Mode opératoire de désinfection chimiothermique
<b>Virus d'essai</b>	PV-1 Lsc2ab et AdV-5	PV-1 Lsc2ab et AdV-5	Parvovirus bovin
<b>Température d'essai</b>	20°C ± 1°C (sauf pour désinfection chimiothermique)	20°C ± 1°C (sauf pour désinfection chimiothermique)	Conformément à la recommandation du fabricant, mais n'excédant pas 60°C
<b>Temps de contact</b>			Conformément au temps de contact recommandé par le fabricant, mais n'excédant pas 60 min
<b>a) Obligatoire</b>	60 min	1 min ou 30 s, si le fabricant recommande < 1 min	—
<b>b) Supplémentaire</b>	5 min, 15 min, 30 min	3 min	—
<b>Substances interférentes</b>			
<b>a) Propreté</b>	0,3 g.L <sup>-1</sup> de BSA <sup>‡</sup> et/ou	PBS*	0,3 g.L <sup>-1</sup> de BSA <sup>‡</sup> et/ou
<b>et/ou</b>			
<b>b) Saleté</b>	3,0 g.L <sup>-1</sup> de BSA <sup>‡</sup> + 3 mL d'érythrocytes	—	3,0 g.L <sup>-1</sup> de BSA <sup>‡</sup> + 3 mL d'érythrocytes

(AFNOR, 2007)

\* PBS : "Phosphate Buffered Saline" ou solution tamponnée au phosphate

‡ BSA : "Bovine serum albumin" ou albumine sérique bovine

Selon la norme Européenne NF EN 14476+A1, un produit est considéré comme ayant une activité ATS-D antivirale s'il induit une diminution de 4 log<sub>10</sub> dans les titres viraux après le temps de contact défini au début du test.

D'autres normes concernant l'étude de l'activité virucide sont actuellement à l'étude : (i) test concernant la désinfection des instruments utilisés en médecine humaine (phase 2/étape 2), (ii) test à visée vétérinaire pour évaluer l'activité virucide sur des surfaces non poreuses (phase 2/ étape 2) et une révision de la norme NF EN 14476+A1 prévue pour Avril 2013 (AFNOR, 2010).

### 3 Le poliovirus : un modèle viral établi pour les tests d'ATS-D antivirale

Comme nous venons de le voir, la norme NF EN 14476+A1 recommande l'utilisation du PV-1 dans les tests d'évaluation de l'activité ATS-D antivirale, ce qui est également le cas de toutes les autres normes à ce sujet.

Nous avons donc choisi ce modèle viral pour extrapoler le protocole, que nous avons précédemment validé avec un virus enveloppé le HCoV229E, à un virus nu.

#### 3.1 Le poliovirus : un membre de la famille des *Picornaviridae*

Le poliovirus humain appartient à la famille des *Picornaviridae*, petits virus nus à ARN et à capsid icosaédrique.

Les *Picornaviridae* sont indissociables de l'histoire de la Virologie. Le premier virus animal à avoir été isolé en 1898 par Loeffler et Frosh, était le virus responsable de la fièvre aphteuse, *Aphtae epizooticae*, membre des *Picornaviridae* (les "agents ultrafiltrables", i.e. les virus, ayant été mis en évidence en 1887 par Dmitry Ivanosvky lors de ses travaux sur la mosaïque du tabac).

La virologie quantitative a ensuite pris son essor dans les années 1940, suite aux travaux d'Enders et Dulbecco qui développèrent des méthodes pour cultiver le PV sur cellules et mesurer son infectivité par le titrage en plages de lyse. Ces techniques ont alors permis le développement des vaccins antipoliomyélitiques ainsi que les premières études moléculaires sur la réplication et la pathogenèse du PV.

Cette famille comprend actuellement neuf genres : *Enterovirus*, *Rhinovirus*, *Hepatovirus*, *Cardiovirus*, *Parechovirus*, *Aphtovirus*, *Erbovirus*, *Kobuvirus* et *Teschovirus*, les trois derniers étant moins étudiés. Cette famille inclut d'importants agents pathogènes pour l'homme et les animaux.

##### **Genre *Enterovirus***

Le PV, prototype de la famille des *Picornaviridae* et objet de notre étude, appartient au genre *Enterovirus*, dans lequel sont également classés les coxsackievirus et les échovirus.

Le PV, comme nous le reverrons plus tard, est responsable de la poliomyélite paralysante, maladie la plus redoutée dans les pays industrialisés durant la première moitié du 20<sup>ème</sup> siècle. L'efficacité des vaccins et le programme d'éradication de cette maladie, mené par l'OMS, a conduit à la quasi-disparition de ce virus. Cependant, le poliovirus reste encore endémique dans certaines régions du monde.

Les coxsackievirus sont responsables d'un large éventail de pathologies chez l'homme, allant du simple rhume jusqu'à la myocardite, à la méningite aseptique et à la paralysie. La maladie la mieux connue induite par un coxsackievirus de type A (souvent le type A16) est le syndrome bouche-main-pied, infection commune de l'enfance. Les coxsackievirus de type B sont quant à eux, responsables de symptômes gastro-intestinaux relativement mineurs mais peuvent également engendrer des paralysies, des myocardites et des malformations congénitales.

Les échovirus n'étaient initialement associés à aucune pathologie chez l'homme, d'où leur nom "Enteric Cytopathic Human Orphan" qui a donné l'acronyme "echo". Les échovirus sont dorénavant reconnus pour être responsables d'une grande part des méningites virales chez l'enfant et l'adolescent.

#### **Genre *Rhinovirus***

Le genre *Rhinovirus* ne comprend que des espèces de rhinovirus. Ils constituent l'une des principales causes du rhume chez l'homme ainsi que d'autres IR hautes, avec les coronavirus, le VRS, les PIV et influenza et les AdV. Bien que cette pathologie soit apparemment anodine, elle entraîne un nombre très élevé de consultations médicales. Il existe plus de cent sérotypes de rhinovirus, ce qui expliquerait pourquoi nous n'avons pas développé de moyens de se prémunir de cette infection pourtant très fréquente.

#### **Genre *Hepatovirus***

Le virus de l'hépatite A appartenait originellement au genre *Enterovirus*. Cependant, bien qu'il ait des caractéristiques communes avec les virus appartenant à ce genre, il en différait suffisamment pour qu'un nouveau genre soit créé, le genre *Hepatovirus*. Parmi ses caractéristiques distinctives, le virus de l'hépatite A est stable à pH 1 et résiste à la chaleur (56°C pendant 30 min). Il n'est, de plus, pas cytolitique, comme le sont les autres membres du genre *Enterovirus*.

#### **Genre *Cardiovirus***

Le genre *Cardiovirus* comprend surtout des espèces murines comme le virus responsable de l'encéphalomyocardite ou le virus responsable de l'encéphalite murine de Theiler. Ce virus infecte de façon persistante le système nerveux central de la souris où il provoque une affection démyélinisante, ce qui a permis de s'en servir comme modèle pour l'étude de la sclérose en plaques chez l'homme.

#### **Genre *Aphtovirus***

Le genre *Aphtovirus*, comprenant le virus de la fièvre aphteuse, est constitué par des virus pathogènes animaux infectant notamment le bétail (bovins, moutons, chèvres, cochons). Ils ne sont quasiment jamais rencontrés chez l'homme (Norkin L.C., 2010b).

### **3.2 Le poliovirus : un virus inscrit dans l'histoire**

Le PV est responsable d'une pathologie majeure : la poliomyélite, infection aiguë du système nerveux central, résultant en une paralysie flasque, et donc ayant motivé très tôt le développement de recherches à son égard.

Son histoire est succinctement résumée dans la Figure 2.


- 3500 ans	<b>Bas-relief de l'Egypte Ancienne</b>	
1813	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Giovanni B. MONTEGGIA</b> : 1<sup>ère</sup> description (incomplète) de la PM</li> <li>- <b>Jacob HEINE</b> : Description de la "paralysie infantile" = maladie commune de la petite enfance avec fièvre, maux de tête, malaise et rarement une forme paralytique</li> </ul>	
1887	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Epidémie à Stockholm</b> : 44 cas de PM</li> <li>- <b>Karl O. MEDIN</b> : Propagation de la maladie par patients asymptomatiques ou avec forme modérée</li> <li>- <b>André CORNIL et Jean-Martin CHARCOT</b> : Atteinte de la corne antérieure de la moelle épinière</li> <li>- <b>Introduction du terme "poliomyélite"</b> ([polio] : gris et [myelos] : moelle)</li> </ul>	
1908	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Karl LANDSTEINER et Erwin POPPER</b> : Isolement de l'agent infectieux responsable de la PM</li> <li>- <b>Agent responsable de la PM</b> = virus</li> <li>- <b>Petites épidémies</b> : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Été/automne</li> <li>- Enfants : formes asymptomatiques ou modérées, immunité durable, protectrice</li> <li>- Adultes : formes sévères avec paralysies plus fréquentes</li> <li>- Mesures gouvernementales</li> </ul> </li> </ul>	
1936	<b>Maurice BRODIE</b> : 1 <sup>ers</sup> essais vaccinaux (extrait de moelle épinière de singes infectés) – Arrêt suite à apparition de paralysies	
1938	<b>Création de la "National Foundation for Infantile Paralysis"</b> sous l'impulsion de F.D. Roosevelt	
1939	<b>Charles Armstrong</b> : Développement d'un modèle murin	
1949	<b>John F. Enders et Renato Dubelcco</b> : Culture cellulaire du PV	
1955	<b>Jonas Salk</b> : Vaccin à virus inactivé Incident "Cutter" : Apparition de paralysies chez des enfants vaccinés mais problème de purification rapidement résolu	
1961	<b>Albert Sabin</b> : Vaccin à virus vivant atténué	
1985	<b>Programme d'éradication de la PM sur le continent Américain par la PAHO</b>	
1988	<b>Programme d'éradication mondiale de la PM par l'OMS</b>	

Figure 2 : Le PV, un virus inscrit dans l'histoire

PV : Poliovirus, PM : poliomyélite, PAHO: "Pan American Health Organization" ou Organisation de la Santé Pan-Américaine, OMS : Organisation Mondiale de la Santé

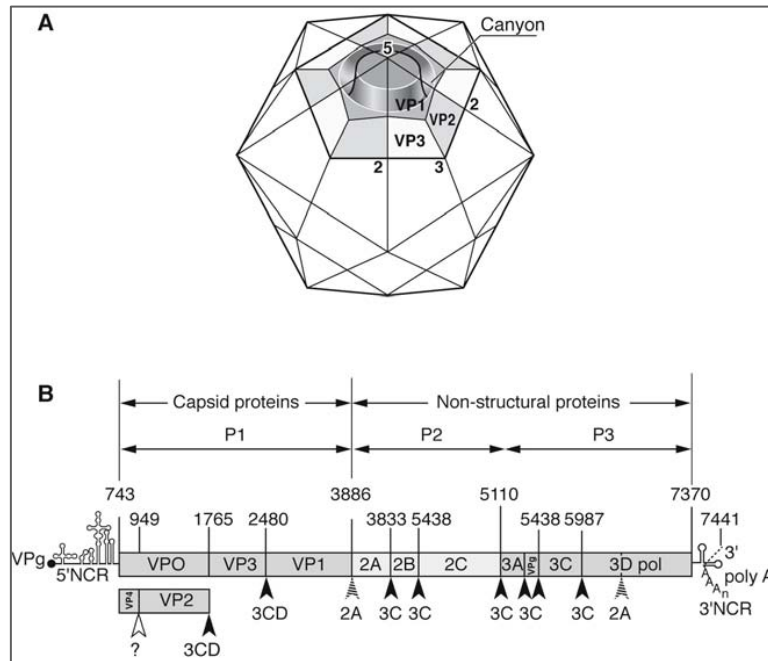
Informations extraites en partie de (Daniel T.M. et Robbin M.L., 1997).

### 3.3 Caractéristiques virologiques du poliovirus

Les poliovirus comprennent trois sérotypes distincts : PV-1, PV-2 et PV-3. Ce sont des virus nus à ARN simple brin positif, protégé par une capsidie icosaédrique à vingt faces.

La capsidie consiste en l'assemblage de soixante copies de chacune des protéines de structure, VP1 à VP4. L'assemblage de ces quatre protéines forme un protomère à cinq axes de symétrie (Figure 3A). La protéine VP4 est toujours internalisée dans la capsidie. A la surface du virion, se trouvent des cavités profondes, nommées "canyons", situées à l'intersection des cinq axes de symétrie de chaque

protomère. Ces "canyons" contiennent le site de liaison au récepteur cellulaire (Belnap D.M. *et al.*, 2000, He Y. *et al.*, 2000, Blondel B. *et al.*, 2005).



**Figure 3 : Structure du PV-1 et de son génome**

En A, est représentée la structure schématique de la capside du PV. Les axes de symétrie 2, 3 et 5 sont représentés ainsi que les positions des protéines de capsides VP1, VP2 et VP3 pour un protomère. Les cinq molécules de VP1 entourent l'axe de symétrie 5, tandis que les VP2 et VP3 s'alternent autour de l'axe 3. La VP4 est invisible puisqu'exclusivement interne. La cavité entourant l'axe 5, le canyon, est formé par des résidus des protéines VP1, VP2 et VP3 et contient le site de liaison au récepteur cellulaire.

En B, est représentée l'organisation génétique du PV-1. Les régions non codantes en 5' et en 3' (5' NCR et 3' NCR) entourent un cadre de lecture ouvert ("open reading frame" ou ORF) unique codant une polyprotéine, symbolisé par le rectangle allongé. Les précurseurs protéiques P1, P2 et P3 sont indiqués par les flèches situées au-dessus du génome. Les protéines virales sont indiquées à l'intérieur des rectangles. Une petite protéine virale, la VPg, est liée de façon covalente à l'extrémité 5' du génome. Les sites de clivage protéolytiques sont symbolisés par les petites flèches sous le génome (Blondel B. *et al.*, 2005).

Le génome à ARN du PV est d'environ 7 500 nucléotides (Figure 3B). Il est polyadénylé en 3' et lié de façon covalente à une petite protéine virale, la protéine VPg, en 5'. Il possède une longue région non codante en 5' (5'NCR pour "non coding region") suivie d'une cadre de lecture ouvert (ORF pour "open reading frame") unique puis d'une région 3'NCR, incluant une queue poly(A).

L'ORF est traduite pour produire une polyprotéine de 247 kDa, qui est, par la suite, clivée en précurseurs protéiques structuraux (P1) et non structuraux (P2 et P3) (Blondel B. *et al.*, 2005).

### 3.4 Cycle cellulaire du poliovirus

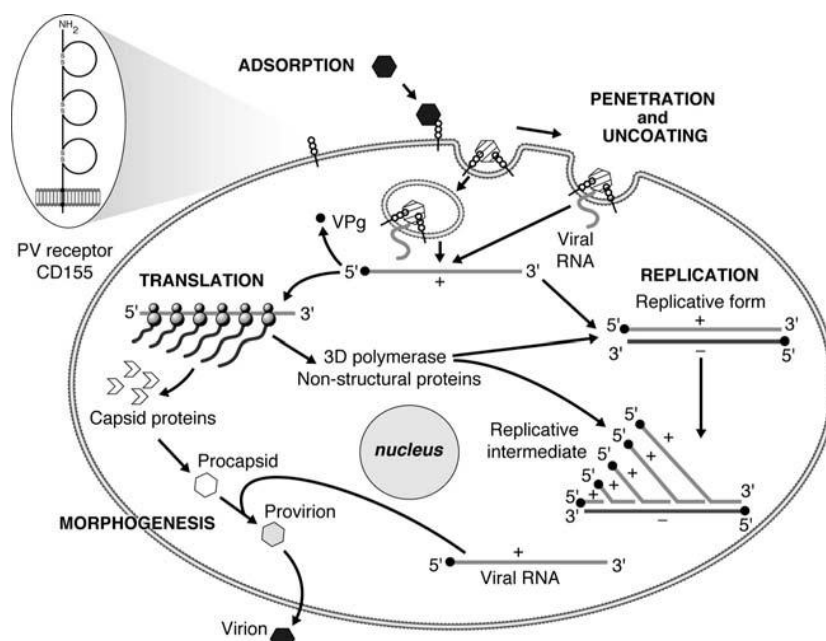


Figure 4 : Cycle virale du PV

(Blondel B. *et al.*, 2005)

Le cycle viral du PV (Figure 4), comme pour tout virus nu, est entièrement cytoplasmique. Il s'agit de l'un des cycles viraux les plus rapides, durant approximativement 8 h à 37°C en culture cellulaire.

Il commence par l'attachement du virion sur son récepteur cellulaire, le CD155 chez l'homme. Il s'agit d'un membre de la superfamille des immunoglobulines apparentée aux nectines que l'on trouve au niveau des jonctions intercellulaires. Il n'existe que sur les cellules de primates (humaines ou simiennes).

Le PV se lie au CD155 par l'intermédiaire du "canyon". La liaison du PV au CD155 déstabilise le virion et induit des modifications conformationnelles nécessaires à la décapsidation et à la libération de l'ARN viral (He Y. *et al.*, 2000, Hogle J.M., 2002).

Lorsque l'ARN est libéré dans le cytoplasme des cellules infectées, la traduction de l'ARN débute en se liant aux ribosomes par l'intermédiaire d'une portion de la région 5'NCR du génome viral. La traduction produit une grande polyprotéine clivée de façon co- et post-transcriptionnelle par des protéases virales et permet la libération des protéines responsables des activités protéolytiques, de la synthèse de l'ARN et des changements biochimiques et structuraux survenant au sein de la cellule infectée.

La réplication de l'ARN est sous le contrôle de l'ARN polymérase ARN-dépendante virale mais d'autres protéines virales et cellulaires interviennent également dans ce processus. La réplication de l'ARN commence par la synthèse d'un brin d'ARN négatif qui va servir de matrice à la synthèse des brins d'ARN positifs (Andino R. *et al.*, 1999).

La formation des particules virales semble être couplée à la synthèse de l'ARN viral (Nugent C.I. *et al.*, 1999). VP0 (précurseur des protéines VP2 et VP4), VP1 et VP3, s'agrègent avec l'ARN viral pour

former le provirion (Hogle J.M., 2002). Au cours de la dernière étape de l'assemblage du virion, VP0 est clivé selon un mécanisme encore inconnu pour donner VP2 et VP4.

Une fois assemblés, les virions s'accumulent dans le cytoplasme de la cellule infectée avant d'être libérés lors de la lyse (Dunnebacke T.H. *et al.*, 1969, Blondel B. *et al.*, 2005).

### 3.5 Pouvoir pathogène du poliovirus et traitement

#### 3.5.1 *Epidémiologie et physiopathologie de la poliomyélite*

Le réservoir du PV est strictement humain. Les trois sérotypes, PV-1, PV-2 et PV-3 sont responsables de la même symptomatologie.

Les infections à PV sont des infections hautement contagieuses, affectant principalement les jeunes enfants.

La plupart des infections à PV provoquent une réplication virale asymptomatique limitée au tube digestif (présence du récepteur CD155 sur les cellules intestinales). Les personnes infectées excrètent alors le virus en quantité importante dans les fèces et les sécrétions oropharyngées pendant plusieurs semaines, impliquant ainsi une transmission interhumaine (Ohka S. et Nomoto A., 2001).

Après une période d'incubation d'environ 7 à 10 jours, près de 24% des sujets infectés présentent des signes cliniques tels que fièvre, céphalées, fatigue, myalgies et maux de gorge. La poliomyélite paralytique, ne représente que <1% des sujets infectés par le PV. Elle se produit lorsque celui-ci pénètre dans le système nerveux central et se réplique dans les motoneurones de la corne antérieure de la moelle épinière (WHO, 2010b).

Après ingestion orale, le PV infecte l'oropharynx et l'intestin. Il se multiplie intensément dans les organes lymphoïdes secondaires (amygdales et les plaques de Peyer).

Le virus est libéré dans la circulation sanguine à partir des tissus lymphoïdes et peut se propager jusqu'au système nerveux central.

Dans le SNC, la cible principale du PV est constituée par les motoneurones de la moelle épinière et du tronc cérébral, certainement à cause de l'expression du récepteur CD155. La destruction des motoneurones, conséquence de la réplication du PV, induit la paralysie (Blondel B. *et al.*, 2005).

En fonction du degré et de l'étendue de l'atteinte des neurones moteurs, il peut s'ensuivre une paralysie temporaire ou permanente des muscles touchés. Dans de rares cas, la destruction des cellules bulbaires par le virus entraîne une paralysie, voire un arrêt, respiratoire. Les manifestations neurologiques typiques de la poliomyélite paralytique sont une paralysie flasque aiguë des membres, surtout des membres inférieurs. Elle est en général asymétrique et la sensibilité reste intacte. Les séquelles habituelles de la poliomyélite sont une paralysie persistante entraînant des déformations. Le taux de létalité parmi les cas de paralysie se situe entre 2% et 20%, mais est nettement plus élevé lorsqu'il y a une atteinte bulbaire, surtout chez les adolescents et les adultes (WHO, 2010b).

### 3.5.2 *Syndrome post-poliomyélitique*

Le syndrome post-poliomyélitique est une atteinte neuromusculaire atteignant les patients ayant survécu à une poliomyélite et survenant dix à quinze ans, voire plus, après une forme d'infection initiale sévère. Il correspond à des atteintes musculo-squelettiques avec douleurs articulaires, fatigue et atrophie musculaire progressive, asymétrique et concernant majoritairement des muscles atteints lors de l'attaque initiale (Dalakas M.C., 1995).

## 3.6 **Traitement, vaccins et programme d'éradication**

### 3.6.1 *Traitement symptomatique*

Il n'existe aucun traitement curatif spécifique de la poliomyélite, seulement des traitements symptomatiques. Lorsque le virus était encore endémique dans les pays dits industrialisés, des "poumons d'acier" ou respirateurs de Drinker-Collins (Daniel T.M. et Robbin M.L., 1997) ont été conçus. Utilisés pour la première fois en 1929, il s'agissait d'appareils de ventilation à pression négative de grande taille où l'on pouvait placer une personne dont la paralysie avait atteint les muscles du diaphragme et alors incapable d'assurer naturellement sa ventilation.

La kinésithérapie a été aussi largement développée avec utilisation de chaleur pour soulager les spasmes musculaires. Associée à des étirements pour stimuler les fibres musculaires non affectées, elle reste le traitement de la poliomyélite. Cette thérapie avait été introduite aux Etats-Unis par une infirmière Australienne dans les années 1940 (Daniel T.M. et Robbin M.L., 1997).

Les infections à PV étant à transmission féco-orale, les progrès faits dans le domaine de l'hygiène ont permis une diminution des contaminations. Cependant, il en a résulté un effet pervers. En effet, la majorité des infections étaient asymptomatiques. De ce fait, les enfants étaient naturellement immunisés contre le PV par une infection au cours de l'enfance. Ainsi, ces progrès ont également entraîné une diminution du nombre d'enfants immunisés et une augmentation du risque d'infections, potentiellement sévères, chez les adultes (Daniel T.M. et Robbin M.L., 1997).

### 3.6.2 *Vaccins et programme d'éradication*

Les progrès de la lutte contre la poliomyélite ont été principalement dus à l'usage très répandu des vaccins.

Deux vaccins cohabitent : le VPI ou vaccin poliomyélitique inactivé, élaboré par Salk et commercialisé depuis 1955 et le VPO ou vaccin poliomyélitique oral, contenant un virus vivant, atténué, élaboré par Sabin. La forme monovalente a été commercialisée en 1961 et la forme trivalente, contenant les trois sérotypes de PV, en 1963.

Dans la plupart des pays qui ont introduit le vaccin antipoliomyélitique dans les années 1960, le VPO a remplacé le VPI parce qu'il était facile à administrer, qu'il convenait aux campagnes de vaccination de masse, qu'il induisait une meilleure immunité muqueuse intestinale et que ses coûts de production étaient inférieurs.

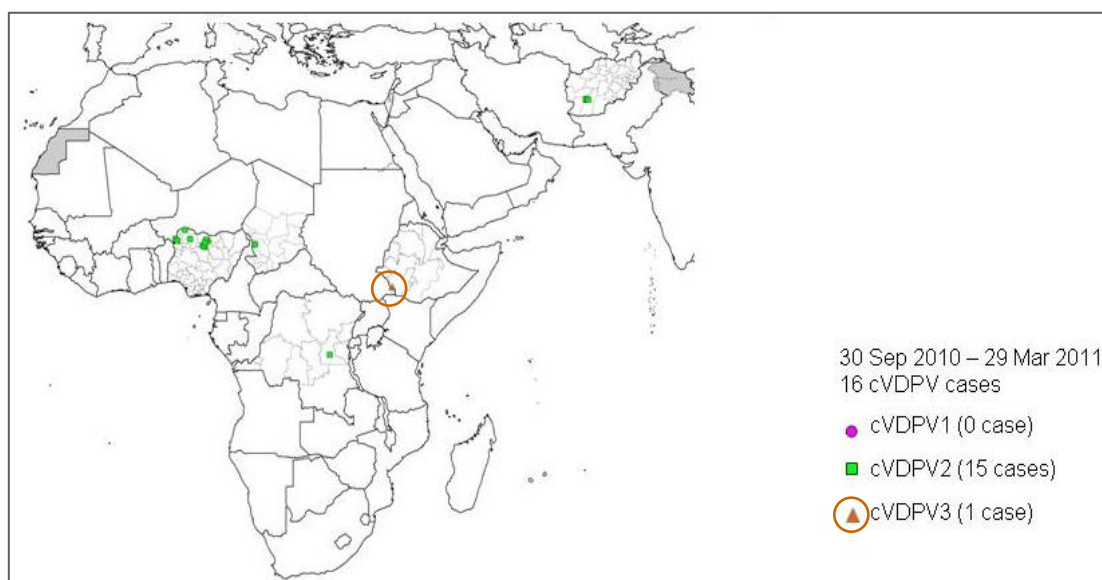


Le VPO a été le vaccin de choix en 1988, lorsque l'OMS a lancé l'initiative d'éradication de la poliomyélite. Cependant, un certain nombre de pays industrialisés ont utilisé le VPI dans les programmes de vaccination systématique, principalement afin d'éliminer le risque de la poliomyélite paralytique associée au vaccin (PPAV), une manifestation indésirable rare associée au VPO (WHO, 2010b).

Le nombre de cas de poliomyélite a ainsi diminué de 99% depuis le lancement du programme d'éradication, passant d'environ 350 000 cas estimés en 1988 à 1600 en 2009. Seuls quatre pays, l'Afghanistan, l'Inde, le Nigéria et le Pakistan, sont encore touchés de façon endémique par la poliomyélite mais la souche sauvage ne circule plus que dans certaines régions assez limitées au sein de ces pays. Cependant, en 2009, le PV a resurgi dans 19 autres pays sous forme de cas d'importation (WHO, 2010a, b).

### 3.6.2.1 Le Vaccin poliomyélitique oral

Le VPO est composé de poliovirus vivants atténués obtenus par passage des souches de PV sauvages parentales en cellules non humaines afin d'obtenir 3 souches vaccinales (Sabin 1, Sabin 2 et Sabin 3). L'atténuation entraîne une neurovirulence nettement inférieure et une transmissibilité réduite. Cependant, ce vaccin présente un rare (incidence de 4/1 000 000) mais grave effet indésirable : la PPAV résultant de l'émergence d'une souche vaccinale mutante et neurovirulente (Figure 5). Les cas de PPAV sont impossibles à distinguer sur le plan clinique de la poliomyélite due au poliovirus sauvage, mais s'en distinguent par l'analyse des souches. Les patients porteurs de la souche vaccinale mutante l'excrétant dans l'environnement, les cas de PPAV se produisent aussi bien chez les vaccinés que chez leurs contacts non vaccinés (CDC, 2001, Rousset D. *et al.*, 2003, Yang C.F. *et al.*, 2003).



**Figure 5 : Cas de PPAV répertoriés de Septembre 2010 à Mars 2011**

cVDPV : "Circulating vaccine-derived poliovirus" ou souche vaccinale dérivée du poliovirus

<http://www.polioeradication.org/Dataandmonitoring/Poliothisweek/Circulatingvaccinederivedpoliovirus.aspx>

Cependant, malgré ce terrible effet indésirable, les preuves de l'efficacité du VPO ont été nettement apportées par le déclin remarquable du nombre de cas de poliomyélite dans les pays ayant utilisé le VPO.

De plus, au cours des trois premières semaines suivant la vaccination, la majorité des sujets vaccinés non immuns excrètent le virus par le biais des sécrétions rhinopharyngées et des fèces. Dans les populations non protégées, ces virus vaccins sont facilement transmis dans et à l'extérieur du foyer familial, entraînant la protection fortuite de sujets non immuns ou un effet de rappel d'une immunité existante chez d'autres (WHO, 2010b).

### 3.6.2.2 Le Vaccin poliomyélitique inactivé

Le VPI est habituellement préparé à partir de souches de PV (PV-1, 2 et 3) sauvages sélectionnées cultivées en cellules Vero ou en cellules diploïdes humaines. Les constituants viraux récoltés sont inactivés au formaldéhyde. Le VPI est donc trivalent.

Le VPI est administré par injection intramusculaire (de préférence) ou sous-cutanée. Il est disponible soit seul, soit associé avec au moins un autre antigène vaccinal, notamment avec celui de la diphtérie, du tétanos, de la coqueluche (germes entiers ou acellulaires), de l'hépatite B ou d'*Haemophilus influenzae* type b. Le VPI est l'un des vaccins les plus sûrs utilisés pour la vaccination systématique. Il n'y a aucune relation de cause à effet établie avec des manifestations indésirables graves, si ce n'est un érythème local (0,5-1%), une induration (3-11%) et une douleur à la palpation (14-29%) (WHO, 2010b).

Malgré ces résultats très encourageants, la vigilance ne doit pas faiblir car de nouveaux cas de poliomyélite due au virus sauvage émergent toujours que ce soit dans les pays encore endémiques ou alors sous forme de cas d'importation (Figure 6).

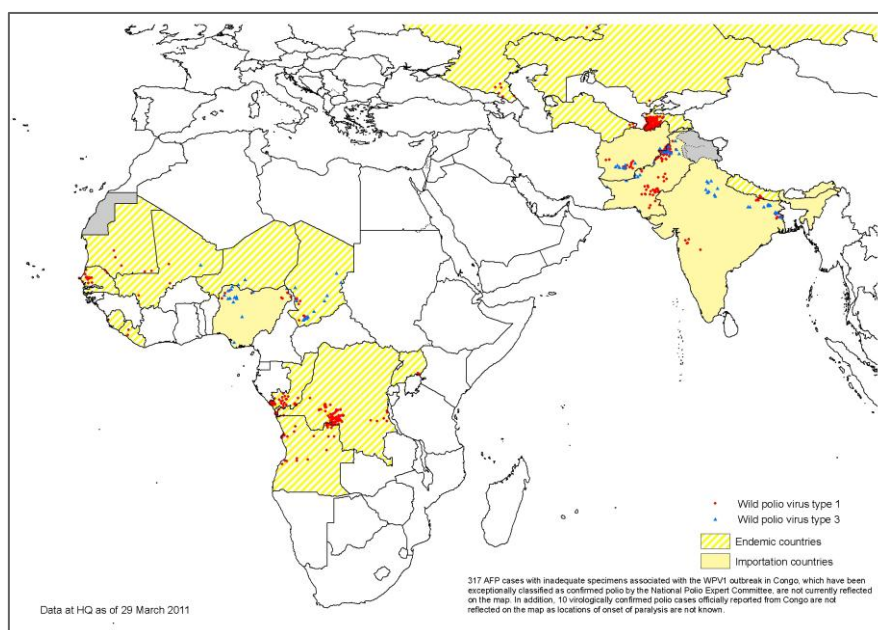


Figure 6 : Nouveaux cas de poliomyélite répertoriés en 2010 due aux PV sauvages

<http://www.polioeradication.org/Dataandmonitoring/Poliothisweek/Poliocasesworldwide.aspx>

### 3.7 Survie du poliovirus dans l'environnement

D'une façon générale, les PV sont des virus résistants mais cette notion est à nuancer en fonction des conditions d'essai.

Les PV sont connus pour survivre pendant quelques semaines à température ambiante et pendant plusieurs mois à des températures comprises entre 0°C et 8°C mais ceci dépend grandement des conditions environnementales, notamment d'humidité relative.

Le PV survit assez mal après séchage et dans une atmosphère d'humidité relative moyenne (50%), que ce soit à 4°C ou à 20°C. Le taux de survie de l'AdV est très proche de celui du PV. A l'inverse, le VHA (virus de l'hépatite A) et le rotavirus montrent des taux de survie bien supérieurs dans les mêmes conditions. Cependant, le taux de survie du PV et son pouvoir infectieux ne sont pas affectés par la présence de matières fécales.

En présence d'une forte humidité relative, le taux de survie du PV est nettement amélioré et le PV reste alors détectable jusqu'à 60 jours. Cependant, ce taux de survie reste sensiblement inférieur à celui du VHA ou du rotavirus dans les mêmes conditions (Abad F.X. *et al.*, 1994).

Ces résultats sont retrouvés dans d'autres études montrant une perte totale du pouvoir infectieux du PV à faible (20%) humidité relative en 4 h tandis qu'à une humidité relative ultra haute (95%), le PV restait détectable jusqu'à 12 h. Le VHA se comporte de façon inverse puisqu'il peut survivre jusqu'à sept jours à faible humidité relative et environ 2 h à ultra haute humidité, et ce bien qu'ils appartiennent à la même famille des *Picornaviridae*. Le rotavirus, quant à lui, conserve son pouvoir infectieux à une humidité relative moyenne pendant au moins 24 h (Ijaz M.K. *et al.*, 1985b, Mbithi J.N. *et al.*, 1991).

La nature du support influence aussi grandement le taux de survie des virus et en particulier du PV (Tableau 5).

Tableau 5 : Comparaison de la survie des virus entériques sur différentes surfaces

Fomite	HAV	HRV	PV	ADV
Polystyrene	-0.4 (0.1)	-1.2 (0.8)	-4.1 (0.4)	-3.1 (0.4)
Aluminum	-0.1 (0.3)	-1.0 (0.5)	-2.4 (0.3)	-2.1 (0.4)
China	-0.5 (0.2)	-0.9 (0.5)	-2.1 (0.1)	-2.4 (0.3)
Glazed tile	-0.6 (0.2)	-1.2 (0.9)	-3.1 (0.3)	-2.3 (0.4)
Latex	-0.2 (0.1)	-0.8 (0.3)	-2.4 (0.5)	-1.9 (0.4)
Paper	-1.5 (0.8)	-0.8 (0.6)	-1.5 (0.4)	-3.7 (0.7)
Cotton cloth	-1.6 (0.3)	-0.6 (0.3)	-2.7 (0.6)	-3.3 (0.5)

Dans ce tableau, sont représentées les diminutions des titres viraux (exprimées en  $\log_{10}$ ) de différents virus entériques après séchage (3 à 5 h dans une hotte à flux laminaire) sur différentes surfaces.

VHA: virus de l'hépatite A, HRV : "human rotavirus" ou rotavirus humain, PV : poliovirus, ADV : adénovirus (Abad F.X. *et al.*, 1994)

De façon plus surprenante encore, lorsque l'on compare le taux de survie du PV par rapport à celui d'un virus enveloppé (Tableau 6), le HCoV 229E, dans différentes conditions d'humidité et de température, le HCoV 229E montre des meilleures capacités de survie que le PV à 30% et 50% d'humidité relative (Ijaz M.K. *et al.*, 1985a).

Tableau 6 : Comparaison des taux de survie du HCoV 229E et du PV-1

Humidité relative	HCoV 229E						PV-1, souche Sabin			
	20°C			6°C			20°C		6°C	
	15 min	24 h	72 h	6 jours	15 min	24 h	15 min	24 h	15 min	24 h
30%	87%	65%	>50%	NR	91%	65%	0%	0%	NR	NR
50%	90,9%	75%	>50%	20%	96,5%	80%	0%	0%	NR	NR
80%	55%	3%	0	NR	104,8%	86%	90%	30%	NR	NR

NR : Non réalisé

D'après (Ijaz M.K. et al., 1985a)

### 3.8 Sensibilité du poliovirus aux ATS-D

Le PV est réputé pour sa grande résistance aux agents physico-chimiques, et cette réputation n'est pas usurpée (Tableau 7 et Annexe 1, p.124).

Comme d'autres entérovirus, les PV sont stables à pH acide, résistants à l'éther et à l'alcool à 70%.

Le PV est cependant rapidement inactivé par traitement avec du formaldéhyde à 0,3%, de l'acide chlorhydrique à 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, des produits chlorés avec 0,3 à 0,45 ppm de chlore libre, l'exposition à des températures supérieures ou égales à 50°C ou par les rayons ultra-violet (Robertson S., 1993).

Tableau 7 : Exemples d'activités antivirales d'ATS-D courants

	Concentration minimale pour l'inactivation des virus					
	Ethanol (%)	Hypochlorite de sodium (Cl <sub>2</sub> en ppm)	Iode (ppm)	CHX (%)	Chlorure de benzalkonium (%)	Glutaraldéhyde (%)
PV-1	70	200	150	0,02 (NA)	10 (NA)	2
Coxsackie B1 et B5	50	200	150	0,4 (NA)	10 (NA)	1
Rotavirus	40	0,5 (15 s)	X	0,4 (NA)	X	2
AdV	50	0,2 (50 s)	150	0,02 (NA)	X	0,04
Influenzavirus	30	200	75	X	0,001	0,02
HSV	30	200	75	0,02	X	0,02

A moins que cela ne soit précisé, le temps d'inactivation est de 10 min

NA : non actif, PV-1 : poliovirus de type 1, AdV : adénovirus, HSV : Herpes simplex virus, ppm : partie par million  
D'après (Bellamy K., 1995)

La CHX, seule, est inactive sur le PV, quelles que soient les conditions d'essai, jusqu'à des concentrations de 5% et des temps de contact de 60 min (Papageorgiou G.T. et al., 2001). L'association de la CHX avec le cétrimide ne s'avère pas plus efficace sauf si un alcool (éthanol, isopropanol) est adjoint au mélange (Mbithi J.N. et al., 1993).

Certains ATS-D, comme la PVP-I ou les alcools, sont cependant efficaces sur le PV (Mbithi J.N. et al., 1993, Rabenau H.F. et al., 2005). C'est le cas par exemple de l'éthanol à 70% capable d'inactiver le PV et même pour des temps de contact très courts de 10 s (Mbithi J.N. et al., 1993).

D'autres études apportent pourtant des résultats quelques peu contradictoires. Davies JG et coll. ont montré lors d'études réalisées sur la pulpe des doigts qu'un lavage à l'eau et au savon était plus efficace sur le PV-1 qu'une solution d'alcool à 80% avec des temps de contact de 30 s. Ils ont

également mis en valeur l'importance des gants avec un taux d'élimination du PV bien plus important que celui observé sur les mains (Davies J.G. *et al.*, 1993).

Ceci illustre à nouveau la nécessité de standardiser les tests pour avoir des données fiables sur les conditions d'usage des ATS-D.

L'hypochlorite de sodium et le glutaraldéhyde peuvent également inactiver le PV si certaines conditions, notamment de concentrations, sont respectées (Narang H.K. et Codd A.A., 1983, Papageorgiou G.T. *et al.*, 2001).

## 4 Les calixarènes

### 4.1 Historique et structure

#### Origines

Les calixarènes sont l'un des sujets d'étude de notre équipe de recherche, le GEVSM. Leurs applications sont nées des progrès effectués dans la chimie supramoléculaire, chimie basée sur les interactions non covalentes entre molécules et par extension sur la formation de complexes. Ils appartiennent à la famille des macromolécules cycliques. La littérature sur les calixarènes indique qu'ils sont le produit d'une longue histoire remontant à 1872 lorsqu'Adolf Von Bayer décrit les premières réactions entre phénols et aldéhydes, dont la condensation, dans certaines conditions, résulte en la synthèse des calixarènes. Leur description proprement dite n'a cependant pu être faite qu'en 1940 par Nierderl et Vogel. En 1978, Gutsche a pu isoler et purifier ces molécules et les a pour la première fois nommées "calixarènes" de par leur structure en forme de calice, du latin "calix", le suffixe "-arène" provient quant à lui de la présence des unités phénoliques (Gutsche C.D. et Muthukrishnan R., 1978).

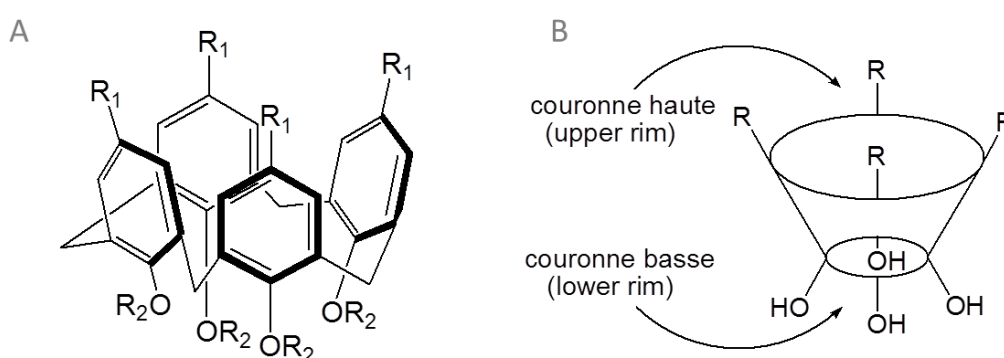


Figure 7 : Structure générale d'un calix[4]arène

#### Structure (Figure 7)

Un calixarène est donc un macrocycle constitué de  $n$  unités phénoliques ( $n = 4$  à  $16$ ) *para*-substituées ou non, et reliées entre elles par des ponts méthyléniques. Pour la nomenclature, le nombre d'unités phénoliques dont il est constitué est indiqué entre crochets auquel le préfixe "calix-" et le suffixe "-arène" sont ajoutés. Ainsi, un macrocycle composé de quatre entités phénoliques sera nommé calix[4]arène. Les calixarènes peuvent adopter différentes conformations, notamment la

conformation conique qui peuvent être discriminées grâce aux techniques de résonance magnétique nucléaire.

### Vers la synthèse de molécules chélatantes

La chimie et la synthèse de ces molécules s'est développée à la fin des années 1970.

Une des premières applications visées pour ces molécules découle de leur structure et de leur potentielle nature complexante. L'objectif était, et est toujours, de synthétiser des chélatants les plus spécifiques possibles, permettant de complexer sélectivement certains ions. Les recherches dans ce domaine ont permis de dégager plusieurs classes de ligands calixaréniques se différenciant par leur affinité pour des familles d'ions particulières (Wieser C. *et al.*, 1997).

Ainsi, le calixarène testé lors de cette étude, le 1,3-bis(bithiazolyl)-*tetra-para*-sulfonato-calix[4]arène (C[4]S-BTZ), résulte de ce type de recherche. Sa synthèse a été décrite au sein de notre équipe par N. Psychogios (Psychogios N., 2003) et les intérêts les plus marquants des groupements bithiazolés étaient alors liés à leur potentiel de complexation d'ions métalliques comme le cuivre et à leur forte fluorescence entre 380 et 400 nm (Pellet-Rostaing S. *et al.*, 1996).

### L'avènement des calixarènes hydrosolubles

Une étape importante dans l'avancée des recherches sur les calixarènes a été la synthèse de composés hydrosolubles par Shinkai et coll. en 1984, la structure de base des calixarènes étant particulièrement lipophile.

Le premier calixarène hydrosoluble ainsi synthétisé était le calix[4]arène-*tetra-para*-sulfonate de sodium ou C[4]S (Shinkai S. *et al.*, 1984). Toutes sortes de substitutions telles que l'ajout de groupements sulfonés, carboxylés, phosphonés voire des groupements aminés ou des motifs osidiques, ont été tentées tant en *para* des noyaux phénoliques, sur la couronne haute, qu'au niveau des groupements hydroxyles, sur la couronne basse.

La synthèse de calixarènes hydrosolubles a permis d'envisager des applications biologiques potentielles très variées à ces molécules : outils de reconnaissance moléculaire, solubilisation de principes liposolubles, catalyseurs biomimétiques, prodrogue ou encore molécule à visée antimicrobienne.

Leur potentiel pharmacologique propre, comme par exemple leur réactivité par rapport aux membranes biologiques ou encore leur cytotoxicité, a également été évalué dans certains domaines (Psychogios N., 2003, Mourer M., 2006, Grare M. *et al.*, 2010b).

## 4.2 Activités biologiques des calixarènes

### 4.2.1 Potentiels pharmacologiques

#### Transport d'ions

Quelques calixarènes ont été étudiés pour leur capacité à favoriser le passage d'ions au travers des membranes. Le transport sélectif d'ions à travers les membranes phospholipidiques est en effet l'une des fonctions cruciales de tout système biologique.

Une série de calix[n]arènes esters, de nature lipophile, a ainsi été étudiée pour leur capacité à s'insérer dans des membranes phospholipidiques et à discriminer le passage d'ions alcalins en fonction de leur taille (Jin T. *et al.*, 1998).

Une autre étude menée *in vitro* sur des cellules endothéliales, notamment avec le C[4]S, a permis de montrer un effet inhibiteur, voltage et pH-dépendant, des calixarènes sur les canaux chlorures (Droogmans G. *et al.*, 1998).

### Propriétés anticoagulantes et non hémolytiques

Certains calixarènes présentant des propriétés anticoagulantes ou anti-fibrotiques intéressantes ont fait l'objet de dépôt de brevets (Hwang K. *et al.*, 1992, Hulmes D. *et al.*, 2000). Les calixarènes pouvant être envisagés comme véhicules de principes actifs, des études de toxicité sur les érythrocytes de calixarènes sulfonés, en particulier des calix[4]arènes et calix[6]arènes, ont également été menées. Ces derniers ont montré une très faible activité hémolytique (Da Silva E. *et al.*, 2004).

Dans ce même but, des interactions des calixarènes avec l'albumine sérique bovine ont été mises en évidence, cette dernière formant une couche protectrice autour des complexes calixaréniques (Gualbert J. *et al.*, 2003).

### Outils de reconnaissance moléculaire

La reconnaissance, la complexation de molécules biologiques par des entités calixaréniques ou encore des essais d'inhibition enzymatique ont beaucoup été étudiées via la synthèse de dérivés porteurs d'acides aminés et de groupements osidiques. La réalisation d'une bibliothèque de calixarènes greffés sur la couronne basse par des peptides a par exemple permis la mise en évidence d'une affinité particulière de certains d'entre eux vis à vis d'oligopeptides mais avec une spécificité assez faible, plusieurs acides aminés différents pouvant être reconnus (Park H.S. *et al.*, 1998, Hioki H. *et al.*, 1999). (Park H.S. *et al.*, 1998)

D'autres interactions ont été observées entre des calixarènes porteurs de groupements osidiques et des lectines (Meunier S.J. et Roy R., 1996), ou encore l'interaction entre calixarènes et acides nucléiques en utilisant des calixarènes porteurs de fonctions ammoniums comme accepteurs (Shi Y. et Schneider H.J., 1999).

### Catalyseurs biomimétiques

Quelques études se sont tournées vers l'utilisation de ces macrocycles, complexés ou non, comme mimes d'enzymes dans des réactions catalytiques. Les premiers résultats dans ce domaine datent de 1986, lorsque Shinkai et coll. ont publié une étude sur l'accélération de l'hydratation d'un dérivé du nicotinamide par différents calixarènes *para*-sulfonate de sodium (Shinkai S. *et al.*, 1986).

D'autres études ont montré qu'un calix[6]arène pouvait reproduire une activité de type choline estérase (Cuevas F. *et al.*, 2000) ou celle d'une phosphodiesterase synthétique par complexation de calixarènes (Molenveld P. *et al.*, 1997, Molenveld P. *et al.*, 1999a, Molenveld P. *et al.*, 1999b).

### Solubilisation de principes actifs liposolubles

Une autre application des calixarènes mettant en valeur leurs propriétés complexantes est leur utilisation en tant que cage pour la solubilisation et donc l'administration de principes actifs liposolubles. Des essais ont été menés avec notamment la testostérone ou encore la nifédipine, inhibiteur calcique très peu hydrosoluble, et ont permis une solubilisation en milieu aqueux de ces molécules (Millership J.S., 2001, Yang W. et de Villiers M.M., 2004).

### Autres potentiels thérapeutiques : prodrogues et complexes radioactifs

Regnouf de Vains et coll. ont réalisé des études mettant en œuvre des calixarènes porteurs de groupements  $\beta$ -lactames ou d'acide nalidixique dans le but d'utiliser les calixarènes comme vecteurs de principes actifs, libérables après hydrolyse, dans l'organisme (Ben Salem A. et Regnouf-de-Vains J.-B., 2001, 2003, Dibama H.M. *et al.*, 2009).

Des essais de complexation ont également été réalisés avec des métaux radioactifs dans le but d'être utilisés en radiothérapie anticancéreuse (Van Bommel K.J.C. *et al.*, 2000).

#### 4.2.2 Calixarènes et pouvoir microbicide

##### Le macrocyclon et activité antibactérienne

L'exemple le plus ancien d'activité antibactérienne résulte d'une étude datant de 1955. Elle portait sur des composés issus de la condensation de formaldéhyde et d'unités phénoliques porteuses de groupements polyoxyéthyléniques, à une époque où les calixarènes ne sont pas encore caractérisés. Ces molécules ont montré des comportements radicalement différents selon si les études étaient menées *in vitro* (absence d'activité sur *Mycobacterium tuberculosis*) ou *in vivo* (existence d'une activité sur *Mycobacterium tuberculosis*). La longueur des chaînes polyoxyéthyléniques a été alors mise en cause. Selon la longueur de ces chaînes, les composés pouvaient avoir soit une activité antituberculeuse, soit aucun effet sur la tuberculose soit encore, pour les chaînes plus longues, un effet "protuberculeux" où l'évolution de la maladie était accélérée. Ainsi, se sont dégagés de ces travaux, le Macrocyclon, avec une moyenne de 12,5 unités polyoxyéthyléniques (effet antituberculeux) et le HOC-60 avec 60 unités polyoxyéthyléniques (effet "protuberculeux"). De plus, après l'injection parentérale de certains de ces composés, le métabolisme lipidique était perturbé (Cornforth J.W. *et al.*, 1955). Des effets similaires ont été observés avec les produits de condensation du cholestérol et de l'oxyde d'éthylène (Cornforth J.W. *et al.*, 1973).

Des travaux plus récents ont montré l'inhibition de la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* dans les macrophages par le Macrocyclon alors que cette même croissance était stimulée par le HOC-60. De plus, l'activité de la lipase était inhibée par le Macrocyclon et activée par le HOC-60. Ces résultats mettaient en évidence l'implication des lipides et de leur métabolisme, en particulier au niveau des macrophages, dans l'activité de ces molécules lors des expériences menées *in vivo* (Hart P.D. *et al.*, 1996). Ces travaux restent toujours d'actualité de part un mécanisme d'action particulier, notamment par l'implication de la NO synthase au niveau des macrophages, et l'existence de nombreuses souches de *Mycobacterium tuberculosis* résistantes aux traitements classiques (Colston M.J. *et al.*, 2004).

Des calixarènes porteurs sur la couronne haute d'acides aminés ont par la suite été élaborés dans le but de mimer la vancomycine, antibiotique de la classe des glycopeptides ; certains d'entre eux ayant fait preuve d'une activité comparable à celle de la vancomycine, y compris sur les staphylocoques résistants à la vancomycine (Casnati A. *et al.*, 1996).

Des études plus récentes menées au sein de notre équipe ont montré l'intérêt de l'introduction de groupements guanidinium au sein de la structure calixarénique dans l'acquisition d'une activité antibactérienne, notamment sur les bactéries résistantes (Mourer M. *et al.*, 2009, Grare M. *et al.*, 2010a).



### Activité antivirale

Des études sur l'activité antivirale des calixarènes ont fait l'objet de dépôts de brevets et de quelques publications mais ce versant de leurs propriétés n'a encore été que modestement examiné, principalement sur le VIH et sur les virus herpétiques.

Hwang et coll. ont mis en évidence une activité anti-VIH et anti-HSV du C[4]S et de composés apparentés porteurs de groupements phényl, sulfonamide et/ou acide carboxylique. Les mécanismes d'action pourraient être liés à l'interaction des charges ioniques entre les calixarènes et l'enveloppe virale (Hwang K. *et al.*, 1992, Hwang K.M. *et al.*, 1994). Des résultats similaires sur le HSV ont également été démontrés au sein de notre unité de recherche (Psychogios N., 2003).

Un autre brevet déposé par Harris et coll. a aussi rapporté une activité anti-VIH de composés calixaréniques, mettant en jeu, dans ce cas, une inhibition de la fusion membranaire entre l'enveloppe virale et la cellule hôte (Harris S.J., 1995, 2002). Plus récemment, Motornaya et coll. ont rapporté des activités antiherpétiques (anti-HSV-2) de certains calixarènes, les amino-amantadane-calixarènes (Motornaya A.E. *et al.*, 2006).

Mourer et coll. ont évalué l'activité anti-VIH de neuf composés calixaréniques porteurs de diverses substitutions. Dans cette étude étaient inclus le C[4]S et le C[4]S-BTZ. Les activités antivirales ainsi que la cytotoxicité se sont avérées variables en fonction des substituants portés par la structure calixarénique, le C[4]S-BTZ ayant démontré la meilleure efficacité, bien que la zidovudine reste la molécule la plus efficace (Mourer M. *et al.*, 2010).

Enfin, l'étude que nous avons précédemment réalisée au cours des travaux de recherche du Doctorat d'Université a montré une activité très intéressante du C[4]S-BTZ sur un autre virus enveloppé, le HCoV 229E. Il présentait en effet une activité comparable à celle de la CHX mais plus rapide, rémanente et dépourvue de cytotoxicité. Au cours de cette même étude, le C[4]S n'avait montré, quant à lui, qu'une activité négligeable à l'encontre de ce virus (Geller C., 2010, Geller C. *et al.*, 2010).

Ainsi, comme nous avons pu le voir, ces molécules présentent non seulement une diversité remarquable mais aussi un fort potentiel qui se décline dans de nombreux champs d'application. C'est pourquoi nous avons poursuivi les recherches à leur égard.

## PRINCIPES ET BUTS DE L'ETUDE

---

Ces travaux font suite à ceux entrepris au cours du Doctorat d'Université.

Dans un but d'amélioration des méthodes et normes existantes, nous avons alors élaboré un protocole original d'évaluation de l'activité antivirale d'agents chimiques à visée ATS-D.

Ce protocole a été développé en faisant appel à une méthode de filtration sur colonnes de Séphadex™ G-10 et G-25 de notre conception. Il est résumé dans la Figure 10 et sera nommé protocole de référence dans la suite de ce mémoire.

Ainsi, dans ce précédent travail, nous avons validé et optimisé ce protocole sur le HCoV 229E, virus enveloppé. Nous avons par la suite évalué l'activité ATS-D antivirale de deux molécules choisies comme molécules de référence : la CHX et l'HXM ainsi que de deux membres de la famille des calixarènes : le C[4]S et le C[4]S-BTZ.

Les résultats prometteurs obtenus avec le C[4]S-BTZ nous ont encouragé à poursuivre les recherches.

Le travail que nous présentons au cours de ce travail a plusieurs objectifs :

1 – Extrapoler et valider le protocole de référence avec un virus nu.

Nous avons, pour cela, choisi le PV-1, souche Lsc2ab pour différentes raisons : (i) sa présence dans toutes les normes traitant d'ATS-D antivirale en médecine humaine, (ii) sa résistance aux agents chimiques, et (iii) pour pouvoir discuter de sa pertinence comme modèle dans les études d'ATS-D antivirales.

2 – Evaluer l'activité de la CHX sur le PV-1, la CHX étant l'une des molécules de référence pour la validation du protocole de référence.

3 – Evaluer l'activité du C[4]S-BTZ sur un virus nu et potentiellement résistant, le PV-1.

4 – Accroître les possibilités du protocole en étudiant les capacités de rétention, et donc de neutralisation, d'un mélange complexe, la Bétadine® par les colonnes de Séphadex™; jusqu'alors, seules des molécules simples ayant été envisagées. La Bétadine® a été en partie choisie pour son principe actif, la PVP-I que l'on sait active sur le PV-1.

## MATERIELS ET METHODES

### 1 Matériels et réactifs

#### 1.1 Matériels

Matériels	Références	Fournisseurs
Balance de précision (d = 0,01 mg)	BP211D	Sartorius
Bandelettes pH, pH 4,5 – 10	P4536-100EA	Sigma
Boîte de congélation avec réservoir pour isopropanol	479-3200	Nalgene
Cellule de Malassez, grille 5 mm <sup>2</sup> , double, Preciss	720.0149	VWR
Centrifugeuse de paillasse réfrigérée	5804R	Eppendorf
Ciseaux de microscopie en acier inoxydable, type droit	233-1551	VWR
Coton cardé		
Cuvette en quartz Suprasil® type 114-QS, parcours optique 10 mm, volume 1400 µL	634.9158	Hellma
Incubateur thermostaté pour culture cellulaire avec CO <sub>2</sub>	MCO-15AC	Sanyo
Filtre à seringue à membrane express (PES), stérile, pores 0,22 µm, diamètre 33 mm, type Millex-GP®	SLGP033RS	Millipore
Filtre à seringue à membrane MF (ester de cellulose), stérile, pores 0,45 µm, diamètre 33 mm, type Millex-HA®	SLHA033SS	Millipore
Flacon de culture pour cellules adhérentes 25 cm <sup>2</sup>	83.1810	Sarstedt
Flacon de culture pour cellules adhérentes 75 cm <sup>2</sup>	83.1813	Sarstedt
Lecteur de plaques ELISA	Multiscan EX	Thermo Scientific
Micropipette Research® monocal, volume variable		
2 – 20 µL	613.3584	Eppendorf
10 – 100 µL	613.3585	
50 – 200 µL	613.3586	
100 – 1000 µL	613.3587	
Micropipette Research® multicanaux, 8 canaux		
10 – 100 µL	613.3600	Eppendorf
30 – 300 µL	613.3602	
Microplaques de culture cellulaire 96 puits	83.1835.300	Sarstedt
Microscope inversé à contraste de phase	CKX31	Olympus
Microtubes 1,5 mL, non gradué, avec capuchon	391212	Eppendorf
Microtube, 2 mL, polypropylène, stérile, bouchon vissé, tube conique à jupe	72.694.406	Sarstedt
Pinces en acier inoxydable	232-0004	VWR
Pipetboy Acu	155015	Integra-Biosciences
Pipettes sérologiques à usage unique		
5 mL	86.1253 001	Sarstedt
10 mL	86.1254.001	
25 mL	86.1685 001	
Pointes pour micropipettes		
200 µL, jaune	70.760.002	Sarstedt
300 µL, transparent	70.765	

1000 µL, bleu	70.762	
Réservoir à réactifs à fond en V, capacité 60 mL, pour pipette multicanaux	613.2671	Thermo Scientific
Réservoir à réactifs, 8 compartiments, 10 mL par compartiment pour pipette multicanaux	613.2672	Thermo Scientific
Seringue 1 mL, type tuberculine sans aiguille, stérile	300013	BD Biosciences
Seringue 5 mL, type 3 pièces, luer centré, stérile	302187	BD Biosciences
Seringue 10 mL, 3 pièces, luer centré, stérile	302188	BD Biosciences
Seringue 20 mL, 3 pièces, excentré luer, stérile	300629	BD Biosciences
Seringue 50 mL, 3 pièces, excentré luer, stérile	300866	BD Biosciences
"Slide flask" en polystyrène	734-2107	Nunc
Spectrophotomètre UV-visible, double faisceau	UVmc2	Safas
Tubes à centrifuger, fond conique		
15 mL	188271	Greiner bio-one
50 mL	227261	

## 1.2 Réactifs

Réactifs	Références	Fournisseurs
Acétone de synthèse	154598	Sigma
Acide acétique	45726	Fluka biochemical
Bétadine® dermique 10% – solution en flacon pressurisé – 125 mL	CIS : 6 896 458 5	Meda pharma
Bleu de Trypan (BT)	15250-061	Invitrogen
Bicarbonate de sodium (NaHCO <sub>3</sub> ) à 7,5% (m/v)	25080-060	Invitrogen
Solution aqueuse de digluconate de chlorhexidine (20%)	C9394	Sigma
Chlorure de calcium (CaCl <sub>2</sub> )	33604.261	Prolabo
Diméthylsulfoxyde	D2438	Sigma
Formaldéhyde à 36,5% (v/v)	533998	Sigma
Milieu de culture ou Minimum essential medium (MEM), sels de Earle's, glutamax®	41090-093	Invitrogen
Milieu sans glutamine et sans rouge de phénol	51200-046	Invitrogen
MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium)	M5655	Sigma
PBS (solution tamponnée au phosphate)		
Pour 1 L		
NaCl	8,0 g	S9625 Aldrich
KCl	0,2 g	P4504
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	2,2 g	S9390
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g	P5379
PVP-I		Sigma
Rouge neutre (RN)	861251	Sigma
Séphadex™ G-10	17-0010-01	GE Healthcare
Séphadex™ G-25	17-0033-01	GE Healthcare
Sérum de veau fœtal (SVF)	10270098	Invitrogen
SDS (dodécyl sulfate de sodium)	S9625	Sigma
Solution Giemsa	1092040500	Merck

Solution May-Grünwald	1014240500	Merck
Trypsine-EDTA (acide éthylène diamine tétracétique)	25300-054	Invitrogen

Le C[4]S-BTZ a été synthétisé, purifié et caractérisé par spectrométrie de masse au sein de notre équipe, par le groupe Chimie sous la direction de Jean-Bernard Regnouf-de-Vains.

#### **Composition de la Bétadine® - 10% - solution dermique**

Pour 100 mL (CNHIM (Centre National Hospitalier d'Information sur le Médicament)) :

Povidone iodée 10 g

Glycérol (nature non précisée) 0,85 g

Phosphate disodique dihydraté 0,94 g

Hydroxyde de sodium qsp pH 4,8 à 5,8

Eau purifiée qsp 100 mL

Nonoxinol 9 ou macrogol éther laurique 9

Acide citrique monohydraté

### **1.3 Matériel biologique**

#### **Cellules L-132**

Les cellules utilisées sont des cellules L-132 (ATCC CCL-5). Ce sont des cellules épithéliales embryonnaires de poumon Humain (cellules adhérentes). Elles ont été gracieusement fournies par le Dr. H.F. Hildebrand (Faculté de Médecine, Lille, France).

Les cellules L-132 sont des cellules transformées par des cellules HeLa, cellules cancéreuses, et donc de lignée continue, permettant théoriquement un nombre de passages infini. Cependant, dans un souci de reproductibilité, le nombre de passages a été limité à trente.

#### **Poliovirus humain de type 1, souche Lsc2ab**

Les souches de virus utilisées sont des souches de poliovirus humain de type 1 (PV-1), souche Lsc2ab (ATCC VR-59).

## 2 Méthodes

Toutes les expériences décrites, à l'exception de la spectrophotométrie UV-visible, ont été réalisées sous un poste de sécurité microbiologique de type II.

### 2.1 Culture cellulaire et obtention d'un stock de cellules

L'entretien tri-hebdomadaire des cellules L-132 est réalisé dans des boîtes de culture pour cellules adhérentes de 75 cm<sup>2</sup> et requiert au préalable trois lavages avec du PBS, 500 µL de trypsine–EDTA sont ensuite ajoutés puis la boîte de culture est incubée dans une enceinte thermostatée à 37°C et sous 5% de CO<sub>2</sub>. Après quelques minutes, 4,5 mL de MEM ("Minimum essential medium" ou milieu de culture) à 5% de SVF (sérum de veau fœtal) sont ajoutés pour procéder à la dissociation cellulaire. Après vérification de la dissociation et de l'individualisation des cellules au microscope inversé au grossissement x200, 1 mL de suspension cellulaire est maintenu dans la boîte de culture afin de permettre la régénération d'un tapis cellulaire ; le reste de la suspension cellulaire obtenue est soit éliminé, soit utilisé pour l'ensemencement de plaques de culture. Après ajout de 19 mL de MEM à 5% de SVF, la boîte de culture est incubée, 2 à 3 jours, à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> jusqu'à obtention d'un tapis cellulaire confluent.

Les cellules sont conservées dans l'azote liquide à -196°C, dans des cryotubes contenant un mélange de [80% suspension cellulaire/10% SVF/10% diméthylsulfoxyde].

### 2.2 Culture et obtention de stocks de virus de poliovirus humain, souche Lsc2ab

Le PV-1, souche Lsc2ab, est cultivé sur cellules L-132, dans du MEM à 2% de SVF dans une incubateur thermostaté à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> et atmosphère humidifiée.

Les stocks de virus sont préparés par infection d'un tapis cellulaire confluent de cellules L-132, âgé de maximum trois jours, et obtenu dans des boîtes de culture de 75 cm<sup>2</sup>. Lorsque la confluence des cellules est atteinte, le milieu de culture est éliminé par retournement dans un bac de javel puis le tapis cellulaire est rincé trois fois avec une solution de PBS. La suspension virale, conservée à -80°C, est préalablement décongelée puis 500 µL de suspension virale sont mélangés avec 1,5 mL de MEM. Ce mélange est inoculé aux cellules avec 10 mL de MEM à 2% de SVF. Le flacon est alors incubé à 37°C. Après environ 48 h d'incubation et avant que l'ECP (effet cytopathogène), représenté par une désorganisation membranaire avec ballonisation puis lyse cellulaire, ne soit achevé, et ce afin de récupérer le maximum de particules virales, la boîte de culture infectée est soumise à trois cycles de congélation à -20°C/décongélation à température ambiante, pour lyser les cellules et libérer les particules virales. Le milieu est ensuite prélevé puis centrifugé à 2000xg pendant 5 min afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant, contenant les particules virales, est aliquoté dans des cryotubes puis congelé à -80°C.

### 2.3 Evaluation du titre viral par la méthode des dilutions limites

Le titrage du PV-1 Lsc2ab est réalisé en plaques de culture cellulaire 96 puits à fond plat. Les plaques de culture sont ensemencées au préalable à raison de 10<sup>4</sup> cellules/puits avec les suspensions

cellulaires obtenues lors de l'entretien usuel des boîtes de culture dans du MEM à 5% de SVF. Seule la première colonne ne contient pas de cellules et sert de témoin milieu. Le dénombrement des cellules avant ensemencement est réalisé grâce à la méthode d'exclusion au bleu de Trypan (BT) sur cellule de Malassez. Un mélange contenant 50 µL de suspension cellulaire, 50 µL de BT et 400 µL de MEM est déposé sur la cellule de Malassez et le dénombrement est réalisé en utilisant un microscope inversé au grossissement x200. Après ensemencement, les plaques de culture sont incubées à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> pour 48 h jusqu'à atteindre 90% de confluence environ.

Le titre moyen des stocks de PV-1 Lsc2ab utilisés est d'environ 10<sup>9</sup> particules virales infectieuses/mL soit 9 log<sub>10</sub>. Les suspensions virales, conservées à -80°C, sont d'abord décongelées à température ambiante, puis diluées au 1/1000<sup>ème</sup> dans du MEM à 2% de SVF. Le milieu contenu dans les plaques de culture est éliminé par retournement des plaques dans un bac de javel et les puits sont remplis avec 180 µL/puits de MEM à 2% de SVF. La deuxième colonne des plaques n'est pas infectée et correspond au témoin cellule pour vérifier l'intégrité des cellules et la non-contamination des plaques. Vingt microlitres de suspension virale diluée au 1/10<sup>ème</sup> sont déposés dans les puits de la colonne 3 puis une dilution sériée au 1/10<sup>ème</sup> est réalisée : prélèvement de 20 µL de la colonne 3 après homogénéisation de la suspension virale et du MEM à 2% de SVF par pipetages successifs et dépôt dans la colonne 4, et ainsi de suite jusqu'à la colonne 12 où les 20 µL excédentaires sont éliminés après homogénéisation (Figure 8).

Les plaques ainsi infectées sont incubées à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> pendant 72 h, temps nécessaire à l'apparition complète de l'ECP. La fixation et la révélation sont faites par une coloration au MGG (May-Grünwald et Giemsa). Le milieu à 2% de SVF est tout d'abord éliminé des plaques par retournement puis 50 µL/puits de May-Grünwald sont ajoutés. Après 5 min d'incubation à température ambiante pour fixer les cellules, le May-Grünwald est éliminé par retournement et les plaques sont rincées une première fois à l'eau. Cinquante microlitres de Giemsa dilué au 1/10<sup>ème</sup> dans du PBS sont ajoutés dans chaque puits pour 15 min à température ambiante, puis de la même façon, le Giemsa est éliminé et les plaques sont rincées à l'eau.

Les plaques 96 puits sont alors observées au microscope inversé au grossissement x200, voire x400 si nécessaire, et les puits infectés sont comptabilisés. La méthode de Reed et Muench (Reed L.J. et Muench H., 1938) est employée pour évaluer le titre viral ou CCID<sub>50</sub> ("Cell culture infective dose 50%" ou Dose infectant 50% des cellules) exprimé en particules virales infectieuses/mL (Figure 8). 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 1/1000<sup>ème</sup> comme cela a été fait dans le cadre du titrage du PV-1 Lsc2ab, la limite inférieure de détection est de 5.10<sup>4</sup> particules infectieuses/mL.

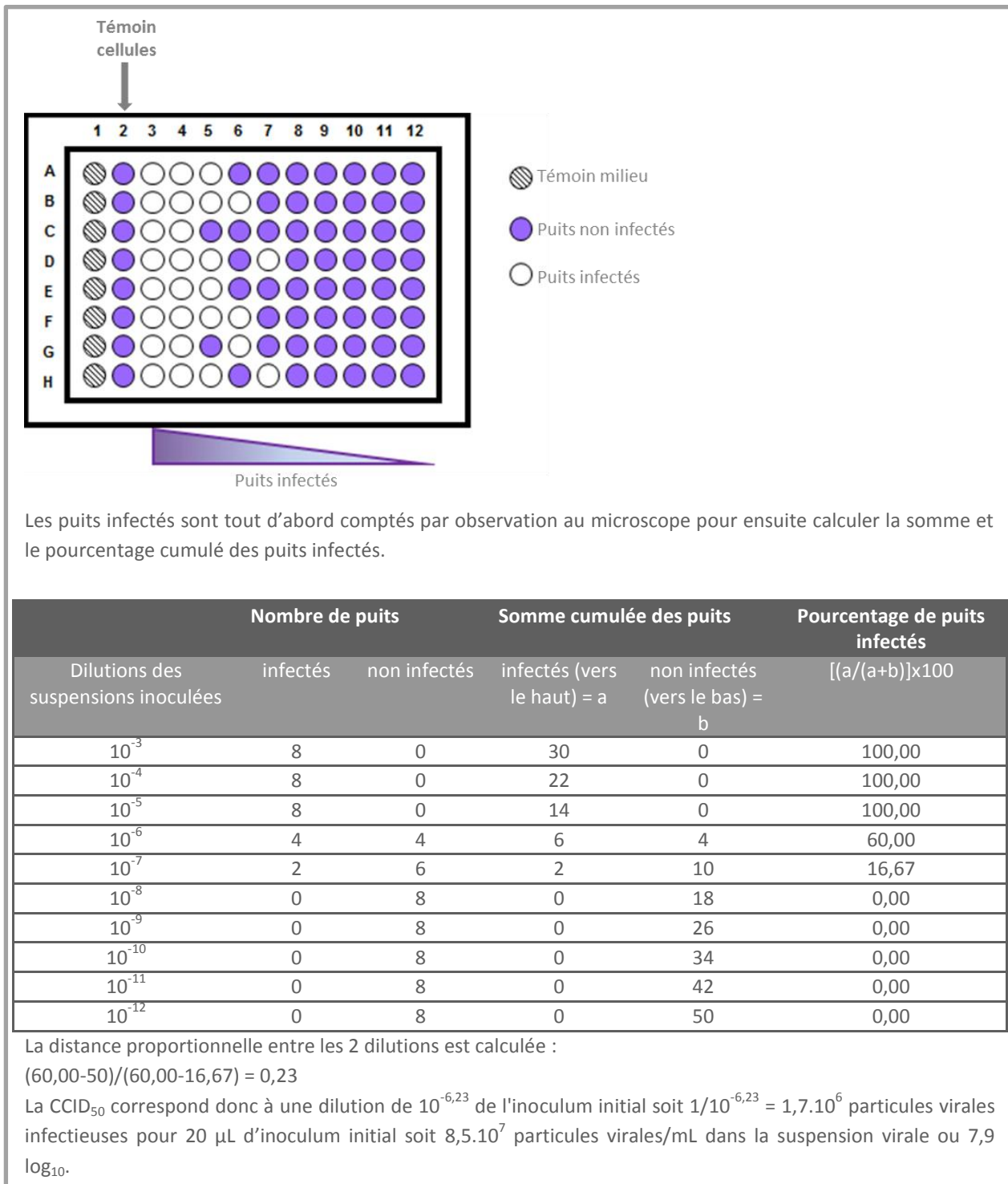


Figure 8 : Evaluation du titre viral par la méthode de Reed et Muench

D'après (Reed L.J. et Muench H., 1938)



## 2.4 Evaluation physico-chimique de la rétention des molécules par les colonnes de Séphadex™

Afin d'estimer les taux de rétention (TR) des molécules testées par les colonnes de Séphadex®, les paramètres spectrophotométriques de chaque molécule ont été établis par la réalisation de gammes étalons. La connaissance de ces paramètres permet le dosage ultérieur des concentrations résiduelles des molécules testées après filtration sur colonnes de Séphadex™ et ainsi l'estimation de leur taux de rétention.

### 2.4.1 Paramètres spectrophotométriques spécifiques et des taux de rétention

Les analyses spectrophotométriques sont menées pour chaque molécule testée et préalablement aux autres tests dans un souci d'économie de temps et de réactifs. Les paramètres spectrophotométriques spécifiques de chaque molécule (longueur d'onde d'absorption maximum  $\lambda_{\max}$ , coefficient d'absorption molaire  $\epsilon$  et limites de détection) sont tout d'abord établis permettant par la suite l'estimation des taux de rétention (TR).

Pour établir les paramètres spectrophotométriques spécifiques, différentes gammes étalons sont réalisées pour chaque molécule testée. L'analyse des spectres obtenus permet alors d'établir les longueurs d'onde d'absorption maximum  $\lambda_{\max}$  et, de façon plus approximative, les domaines de linéarité et donc d'applicabilité, de la loi de Beer-Lambert (Équation 1) ainsi que les coefficients d'absorption molaire.

#### Équation 1 : Loi de Beer-Lambert

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

*A est l'absorbance, sans unité ;  $\epsilon$  est le coefficient d'absorption molaire en  $L \cdot cm^{-1} \cdot mol^{-1}$  ;  $l$  est la longueur de la cuve soit 1 cm et  $c$ , la concentration en  $mol \cdot L^{-1}$ .*

Les dilutions sont réalisées dans de l'eau osmosée stérile, pour être en adéquation avec le protocole d'évaluation de l'activité ATS-D antivirale. Le pH de l'eau est vérifié grâce à du papier pH et neutralisé avec du  $NaHCO_3$  à 7,5% (m/v) si nécessaire. Deux cuves en quartz de parcours optique 1 cm, soigneusement nettoyées à l'acétone et séchées à l'argon, contenant soit l'échantillon à doser soit de l'eau osmosée stérile pour établir la référence, sont placées dans leurs emplacements respectifs dans le spectrophotomètre UV-visible. Les spectres obtenus sont traités par le logiciel Spectro2000® (version 6.2.2, SAFAS S.A., Monaco). Après identification de la  $\lambda_{\max}$ , les coefficients d'absorption molaire spécifiques sont établis par des analyses de régression simple décrites ci-après (Matériels et Méthodes, 2.4.2, p.66).

Grâce aux données ainsi obtenues, les TR des différentes molécules par les colonnes de Séphadex™ ont été estimés par une méthode physico-chimique. Les différentes dilutions des produits testés lors des tests d'ATS-D antivirale ont été réalisées dans de l'eau osmosée stérile à pH 7. Des colonnes de Séphadex™, G-10 ou G-25, selon la masse moléculaire du produit à tester sont préparées extemporanément (Matériels et Méthodes, 2.6.2, p.68) et les dilutions sont filtrées sur les colonnes de Séphadex™ par centrifugation à 1500xg pendant 1 min. Si les filtrats apparaissent trop concentrés en regard de la gamme étalon réalisée auparavant, ces derniers sont dilués dans de l'eau osmosée stérile avant d'effectuer les mesures d'absorbance. Les concentrations résiduelles sont mesurées par

analyse spectrophotométrique. Enfin, les TR sont estimés par comparaison de ces concentrations résiduelles avec les concentrations initiales dans les solutions sans filtration, selon l'équation 2.

**Équation 2 : Taux de rétention (TR) des molécules testées par les colonnes de Séphadex™**

$$TR = (C_i - C_f) / C_i \times 100$$

*TR est le taux de rétention ;  $C_i$ , la concentration initiale sans filtration en  $\text{mol.L}^{-1}$  et  $C_f$ , la concentration finale après filtration sur notre modèle de colonne en  $\text{mol.L}^{-1}$ .*

#### 2.4.2 Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de deux logiciels : le logiciel Statview® (V. 5.0, SAS Institute, Cary, Etats-Unis) et le logiciel XLStatistics® (V.10.05.30, XLent Works, Australia).

Pour chaque molécule, des analyses de régression simple sont réalisées grâce au logiciel Statview® et à partir des données extraites des spectres obtenus. Elles ont permis la détermination précise des coefficients d'absorption molaire pour chaque  $\lambda_{\text{max}}$  correspondant aux pentes des droites de régression résultant de l'Équation 1 (Loi de Beer-Lambert) ainsi que des domaines de linéarité (domaines d'acceptabilité des mesures en respect de la loi de Beer-Lambert).

Les valeurs mesurées des concentrations résiduelles dans les filtrats ont permis par extrapolation et grâce au logiciel XLStatistics®, l'estimation des TR.

Il a été nécessaire au cours de cette étude de réaliser des comparaisons de droites de régression (comparaison des pentes, i.e. des coefficients d'absorption molaire) pour s'assurer du dosage d'une molécule donnée dans une formulation complexe comme la PVP-I dans la Bétadine®.

La comparaison de deux droites de régression permet de vérifier s'il existe des différences significatives entre deux séries de résultats dont on a étudié les régressions linéaires. Il peut s'agir de deux méthodes de production, de deux méthodes d'analyse, etc.

Les coefficients a et b des droites de régressions d'équation  $y = ax + b$  sont comparés à l'aide de deux tests de Student appliqués aux différences entre les résultats obtenus par échantillonnage sur les deux populations étudiées. Dans notre cas, le coefficient a correspond au coefficient d'absorption et le coefficient b à l'ordonnée à l'origine.

Ces comparaisons ne peuvent se faire que si les variances résiduelles des deux séries sont homogènes (pas de différence significative entre elles). Il faut donc au préalable s'assurer de l'homogénéité des variances par un test de Fisher-Snedecor puis du calcul de la variance résiduelle commune.

Si les deux régressions ne sont pas significativement différentes l'une de l'autre, il est alors possible de regrouper les données afin de retenir un modèle de régression unique pour les deux séries.

De la même façon, une comparaison des TR de la molécule seule avec les TR de cette même molécule intégrée dans une formulation complexe doit être réalisée. Pour cela, après avoir vérifié l'homogénéité des variances par un test de Fisher-Snedecor, un test de Student est alors mené sur les moyennes des TR obtenus dans chaque cas de façon bilatérale puis unilatérale pour conclure à la présence, ou non, d'une différence significative entre ces TR.

## 2.5 Evaluation biologique de la rétention de molécules par les colonnes de Séphadex™

Les TR estimés par spectrophotométrie UV-visible, permettent de chiffrer la rétention des molécules testées. Il faut par ailleurs s'assurer de l'efficacité de la filtration sur gel de Séphadex™. En effet, il s'agit de l'étape de neutralisation. Il est donc nécessaire de vérifier l'élimination de la cytotoxicité éventuelle des molécules testées avant de les inoculer sur les cellules.

La cytotoxicité sur les cellules L-132 des molécules testées a été au préalable évaluée et quantifiée par des tests de viabilité au MTT (Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) et de cytotoxicité au RN (rouge neutre). Ceci nous a permis par la suite, en répétant les mêmes tests mais après filtration des solutions à tester sur les colonnes de Séphadex™, de s'assurer de l'élimination de l'éventuelle toxicité des molécules testées par le passage sur les colonnes.

Les méthodes développées pour les tests de viabilité au MTT et de cytotoxicité au RN ainsi que les résultats en découlant ayant fait l'objet de publications et ayant été décrit en détail au cours de mon doctorat d'Université (Geller C. *et al.*, 2009, Geller C., 2010, Geller C. *et al.*, 2010, Geller C. *et al.*, 2011) ne seront pas exposées au sein de ce mémoire. Cependant, un certain nombre de résultats seront repris car ils étaient un préalable nécessaire aux expériences menées au cours de ce travail.

Succinctement, les tests de viabilité au MTT suivent un protocole modifié de Mosmann (Mosmann T., 1983) et permettent l'évaluation du pourcentage de viabilité (Équation 3) des cellules L-132 en présence de différentes molécules et pendant différents temps de contact (24 h, 48 h et 168 h). Les  $Cl_{50}$  ("concentration inhibitrice 50%" soit la concentration inhibant la croissance de 50% des cellules) correspondent alors à la concentration du produit testé engendrant une perte de 50% dans la viabilité cellulaire.

Les tests de cytotoxicité au RN suivent quant à eux un protocole modifié de Borenfreund (Borenfreund E. et Borrero O., 1984, Borenfreund E. et Puerner J.A., 1985). La cytotoxicité est évaluée grâce à l'équation 4. Les  $CC_{50}$  ("concentration cytotoxique 50%" soit la concentration tuant 50% des cellules) correspondent alors à la concentration du produit testé provoquant un indice de cytotoxicité de 50% en comparaison au témoin cellule.

### Équation 3 : Pourcentage de viabilité cellulaire

$$\text{Pourcentage de viabilité} = \left( \frac{A \text{ échantillon} - A \text{ témoin Z}}{A \text{ témoin Y} - A \text{ témoin X}} \right) \times 100$$

### Équation 4 : Pourcentage de cytotoxicité

$$\text{Pourcentage de cytotoxicité} = 100 - \left[ \left( \frac{A \text{ échantillon} - A \text{ témoin Z}}{A \text{ témoin Y} - A \text{ témoin X}} \right) \times 100 \right]$$

*Echantillon : puits test contenant les cellules et la solution à tester*

*Témoin X : au témoin milieu seul*

*Témoin Y : au témoin cellule (100% de viabilité)*

*Témoin Z : au témoin milieu + solution à tester.*

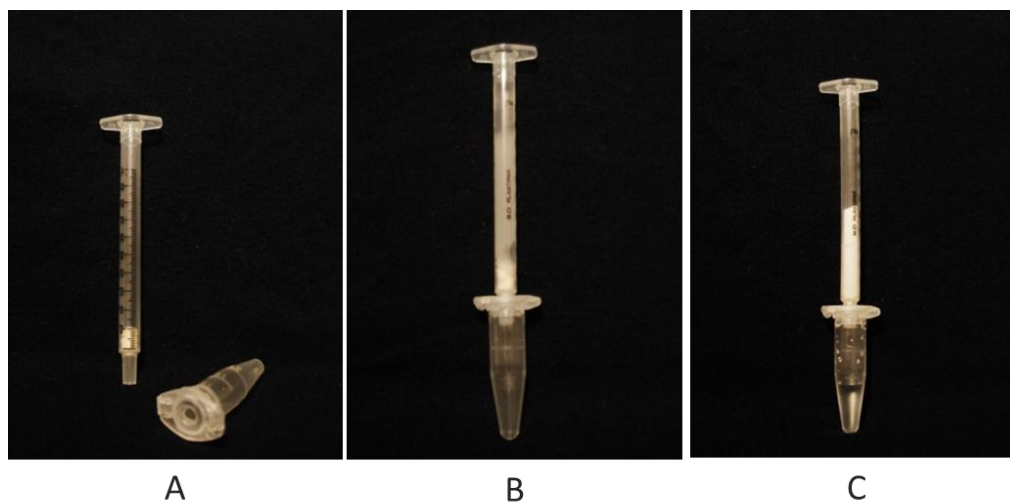
## 2.6 Protocole d'évaluation de l'activité antivirale ATS-D

### 2.6.1 Préparation des gels de Séphadex™ G-10 et G-25

Les gels de Séphadex™ sont constitués de billes de porosité variable en fonction du degré de polymérisation des dextrans (chaînes de glucose liées par des liaisons 1→4) les constituant. Ils permettent la réalisation de chromatographies d'exclusion-diffusion et ainsi la séparation de molécules de masses moléculaires différentes en retenant à l'intérieur des billes les molécules dont la masse molaire est inférieure à la limite d'exclusion alors que les molécules de masse molaire supérieure traversent le gel et en sont ainsi exclues. Ils sont obtenus par mise en suspension des billes de Séphadex™ dans une solution tampon.

Dans le protocole de référence, deux types de gels de Séphadex™ ont été utilisés selon leurs capacités de rétention : le gel de Séphadex™ G-10 et le gel de Séphadex™ G-25. Leurs capacités de rétention sont respectivement de 100 – 1000 g.mol<sup>-1</sup> et de 900 – 5000 g.mol<sup>-1</sup>. Les deux types de Séphadex™ ont été mis en suspension dans du PBS. Ils ont été choisis pour couvrir la plus large gamme d'ATS-D en fonction de leur masse moléculaire. Selon les recommandations du fabricant, ils doivent être mis en suspension dans la solution tampon au minimum 3 h à température ambiante, dans au moins 20 fois leur volume de PBS, soit environ 30 g.L<sup>-1</sup>, pour que le pH s'équilibre à 7 et pour permettre le gonflement du gel. Les suspensions ainsi obtenues sont stérilisées par autoclavage et l'excès de PBS est ensuite éliminé pour obtenir des suspensions avec un volume ratio Séphadex™/PBS de 1/1.

### 2.6.2 Préparation des colonnes de Séphadex™



**Figure 9 : Les différentes étapes de la fabrication des colonnes de Séphadex™**

Les différentes étapes sont tout d'abord (A) la préparation de tubes Eppendorf® percés et de la seringue de 1 mL bouchée avec du coton cardé et la stérilisation des différents composants, puis (B) le remplissage de la seringue avec 1 mL de suspension de Séphadex™ et l'assemblage du système et enfin (C) l'obtention de colonnes prêtes à l'emploi après l'étape de centrifugation à 4500xg pendant 1 min.

Les colonnes réalisées dans cette étude sont composées d'une seringue de 1 mL, bouchée avec du coton cardé, que l'on fixe sur un tube Eppendorf® préalablement percé à l'aide de pinces et de ciseaux en acier inoxydable (Figure 9). Les différents constituants sont stérilisés par autoclavage

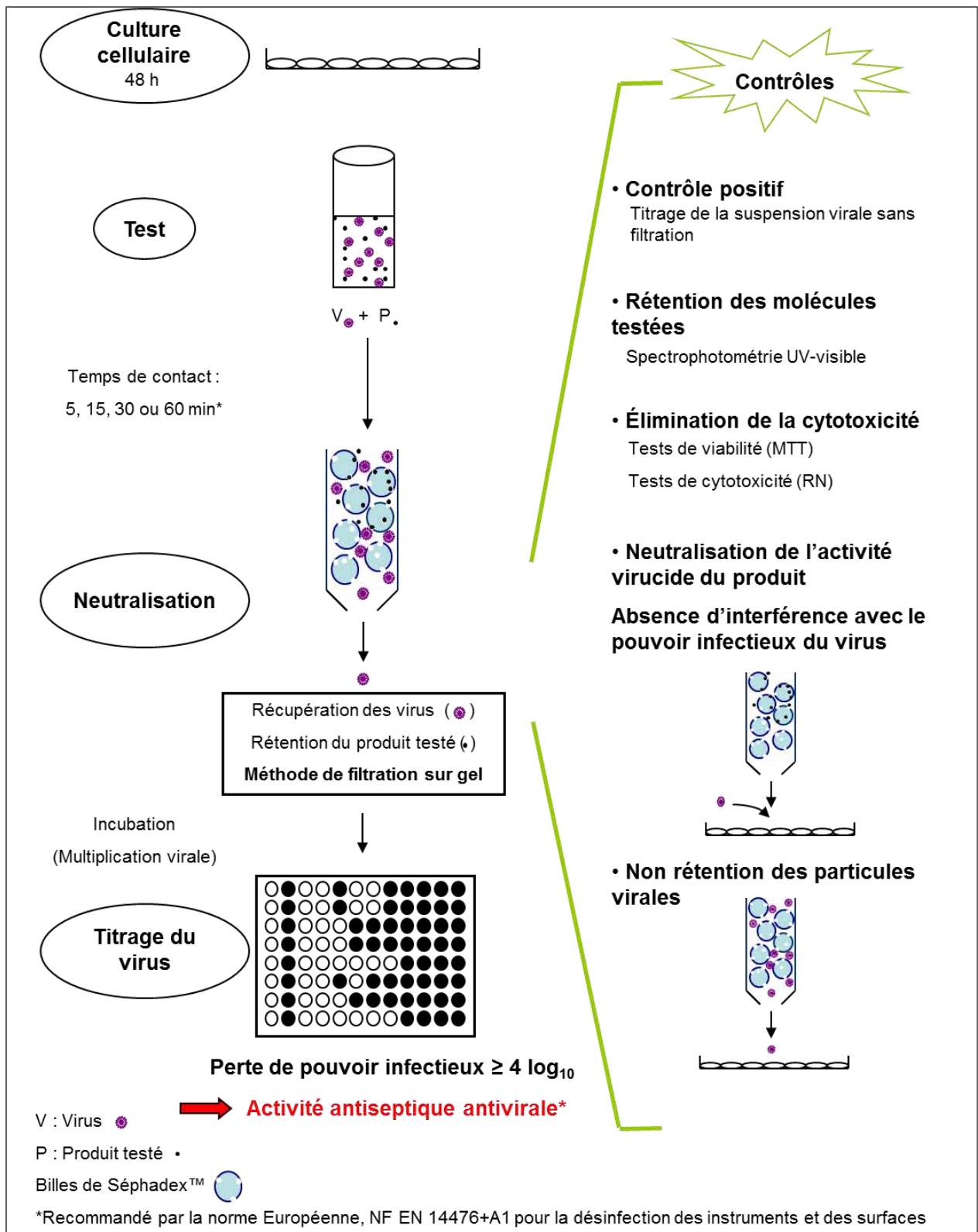
avant toute utilisation. Le corps de la seringue est rempli avec 1 mL de suspension de Séphadex™ puis la seringue est placée sur un tube Eppendorf®, le système est ensuite placé dans un tube à centrifuger de 50 mL afin d'assurer la stérilité et enfin l'ensemble est centrifugé à 4500xg pendant 1 min en appliquant une accélération moyenne. Ce protocole s'applique aussi bien pour le gel de Séphadex™ G-10 que pour celui de G-25. Le tube Eppendorf® contenant l'excès de PBS est éliminé et la colonne placée sur un nouveau tube Eppendorf® percé et stérile, est alors prête à l'emploi.

### 2.6.3 Test d'évaluation de l'activité ATS-D antivirale

Le principe repose sur la mise en contact du produit à tester et des virus pendant un temps de contact défini suivie de la neutralisation de l'activité et de la cytotoxicité du produit par filtration sur les colonnes de Séphadex™ décrites ci-dessus. Le filtrat est alors déposé sur des cellules L-132 à 90 – 100% de confluence dans des plaques 96 puits, et les plaques sont incubées pendant 72 h, temps nécessaire à l'achèvement de l'ECP du PV-1 Lsc2ab. Les titres viraux sont ensuite évalués par la méthode en dilutions limites (Matériels et Méthodes, 2.3, p.62). L'activité virucide est alors estimée pour un temps de contact donné et une concentration donnée de la molécule testée, par comparaison avec les témoins ayant subi le même traitement mais sans ajout du produit. Elle est exprimée en différence de  $\log_{10}$  entre les titres viraux (Figure 10).

Le test a lieu après 48 h d'incubation de boîtes de culture de 75 cm<sup>2</sup> à 37°C et sous 5% de CO<sub>2</sub>, lorsque les tapis cellulaires arrivent à 90 – 100% de confluence puis ensemencement de plaques 96 puits à raison de 10<sup>4</sup> cellules/puits. Chaque test, répété trois fois, comprend l'évaluation de l'activité ATS-D d'une concentration "x" du produit à tester pour deux temps de contact différents (t<sub>1</sub> et t<sub>2</sub>) et nécessite 9 plaques 96 puits :

- une plaque pour titrer la suspension virale sans filtration
- une plaque pour titrer le filtrat de la suspension virale après t<sub>1</sub> dans de l'eau osmosée
- une plaque pour titrer le filtrat de la suspension virale après t<sub>2</sub> dans de l'eau osmosée
- une plaque pour tester le filtrat de la solution à la concentration x de la molécule à tester en l'absence de virus (témoin cytotoxicité)
- une plaque pour tester le filtrat de la solution à la concentration x de la molécule à tester en présence de virus (témoin neutralisation)
- deux plaques pour titrer le filtrat du mélange molécule à tester - virus après un temps de contact t<sub>1</sub>
- deux plaques pour titrer le filtrat du mélange molécule à tester - virus après un temps de contact t<sub>2</sub>.



**Figure 10 : Principe de l'évaluation de l'activité ATS-D antivirale**

Dans cette figure est représentée la méthode de filtration sur gel comme moyen de neutralisation.

MTT : Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium, RN : rouge neutre

**Tableau 8 : Composition des suspensions à filtrer lors de l'évaluation de l'activité ATS-D antivirale d'un produit**

N° des tubes	Solution à filtrer	Volume nécessaire	Composition	Temps de contact avant filtration sur Séphadex™
Tube 1	Témoin virus t <sub>1</sub>	500 µL	100 µL suspension virale + 900 µL eau osmosée stérile	t <sub>1</sub>
Tube 2	Témoin virus t <sub>2</sub>	500 µL	100 µL suspension virale + 900 µL eau osmosée stérile	t <sub>2</sub>
Tube 3	Témoin neutralisation	500 µL	900 µL de la solution à tester à la concentration x + 100 µL eau osmosée stérile	t <sub>1</sub> (arbitrairement)
Tube 4	Témoin cytotoxicité	500 µL	900 µL de la solution à tester à la concentration x + 100 µL eau osmosée stérile	t <sub>2</sub> (arbitrairement)
Tubes 5 et 6	Molécule à tester à la concentration x + virus	2 x 500 µL	900 µL de la solution à tester à la concentration x + 100 µL suspension virale dans chaque tube	t <sub>1</sub>
Tubes 7 et 8	Molécule à tester à la concentration x + virus	2 x 500 µL	900 µL de la solution à tester à la concentration x + 100 µL suspension virale dans chaque tube	t <sub>2</sub>

*Les temps de contact pour les temps neutralisation et cytotoxicité ont été choisis selon des critères pratiques par rapport aux centrifugations ; ces temps n'ont en effet pas d'importance car le produit testé est censé être retenu par les colonnes avant que les filtrats ne soient inoculés aux cellules.*

Le produit à tester est alors préparé à la concentration souhaitée dans de l'eau osmosée stérile puis est soumis à une filtration stérilisante (filtre 0,22 µm). La concentration de la solution préparée doit tenir compte du phénomène de dilution lorsque le virus ou l'eau (dans le cas des témoins) sont ajoutés pour que la concentration finale soit bien celle que l'on veut tester. Au préalable, la neutralité de l'eau osmosée stérile est vérifiée à l'aide de papier pH car l'autoclavage peut provoquer une acidification de l'eau. Dans ce cas, l'eau est tamponnée à l'aide d'une solution de NaHCO<sub>3</sub> à 7,5% (m/v) jusqu'à obtention de la neutralité. L'eau utilisée étant de l'eau osmosée donc désionisée, sa dureté (concentrations en chlorure de magnésium, chlorure de calcium et bicarbonate de sodium) n'a donc pas été contrôlée lors de ces expériences, comme il l'est recommandé dans la norme NF EN 14476+A1.

Huit colonnes de Séphadex™ sont préparées de façon extemporanée et le volume nécessaire de suspension virale est décongelé à température ambiante. Les solutions à filtrer sont alors préparées ; chaque tube correspondant à une plaque 96 puits (Tableau 8). Une minute avant la fin du temps de contact (temps nécessaire pour aller jusqu'à la centrifugeuse et pour que le temps de contact soit respecté), 500 µL de chaque tube sont déposés en haut d'une colonne associée à un tube Eppendorf®, le système est placé dans un tube à centrifuger de 50 mL pour assurer la stérilité et l'ensemble est centrifugé à 405xg pendant 1 min. La centrifugation permet la rétention des molécules testées par les billes de Séphadex™ alors que les particules virales, plus grosses, sont récupérées dans les filtrats.

Les plaques 96 puits contenant les cellules à 90% de confluence sont sorties de l'incubateur, le milieu de culture est éliminé par retournement des plaques et 180 µL/puits de MEM à 2% de SVF sont ajoutés dans les puits. L'infection soit avec la suspension virale diluée au  $1/10^{\text{ème}}$  dans de l'eau osmosée stérile pour la plaque témoin virus sans filtration, soit avec les filtrats peut alors être réalisée. On procède alors de la même façon que pour un titrage par dilutions limites classique (Matériels et Méthodes, 2.3, p.62). La potentielle perte de pouvoir infectieux du virus due à l'activité antivirale de la molécule testée est estimée par comparaison entre le titre viral obtenu après filtration sur colonne de Séphadex™ en l'absence du produit et le titre viral obtenu après mise en présence des virus et du produit pendant le temps de contact défini.

#### 2.6.4 Contrôles

Afin d'assurer la validité des résultats obtenus, trois types de contrôle sont effectués lors de chaque test : (i) contrôle de la non rétention des particules virales par les colonnes de Séphadex™, (ii) contrôle de la neutralisation de la potentielle activité ATS antivirale du produit testé et enfin (iii) contrôle de l'élimination de l'éventuelle cytotoxicité du produit testé (Figure 10). Selon la norme Européenne NF EN 14476+A1, la différence entre les titres viraux avec et sans traitement (dans notre cas, avec et sans filtration sur gel) doit être inférieure à  $0,5 \log_{10}$ .

Comme nous l'avons évoqué dans le paragraphe précédent, cinq plaques sont réservées aux contrôles. La plaque témoin virus sans filtration constitue la "pierre de touche" des contrôles. Les protocoles de filtration sur colonne de Séphadex™, d'inoculation aux cellules et d'évaluation du titre viral mis en œuvre pour les contrôles, sont strictement identiques à ceux décrits précédemment.

##### 2.6.4.1 Contrôles de non rétention du virus

La non rétention des virus est vérifiée pour chaque temps de contact,  $t_1$  et  $t_2$ , en diluant la suspension virale au  $1/1000^{\text{ème}}$  dans de l'eau osmosée stérile. Après chacun des temps de contact, les suspensions virales diluées sont filtrées sur les colonnes de Séphadex™. Les titres viraux obtenus sont comparés à celui de la suspension virale sans filtration et la différence exprimée en  $\log_{10}$  doit être inférieure à 0,5. On s'assure ainsi que la méthode elle-même ne crée pas d'interférence sur le pouvoir infectieux du virus.

Ce contrôle validé, son titre viral est pris comme point référence pour la comparaison avec le titre viral obtenu après l'action de l'agent chimique testé. La différence entre ces deux titres viraux permet alors de quantifier l'activité virucide du-dit agent.

##### 2.6.4.2 Contrôle de neutralisation

Cette étape de neutralisation nécessite un contrôle particulier consistant en la mise en contact de l'ATS-D neutralisé avec la suspension virale, puis de déposer ce mélange sur les cellules. A la fin du temps d'incubation nécessaire pour la réplication virale, le titre viral est évalué et il ne doit pas différer significativement du titre viral évalué dans les mêmes conditions mais sans la présence de l'ATS-D et du neutralisant. En effet, si la neutralisation est efficace, il ne doit rester ni activité ni toxicité du produit testé.



Par ailleurs, il est nécessaire de démontrer, d'une part que la méthode de neutralisation n'a pas d'impact négatif sur le microorganisme testé et d'autre part, qu'elle ne crée pas d'interférence sur l'infectivité du virus. En effet, la substance testée ainsi que les différentes étapes du test, et notamment la neutralisation, peuvent augmenter ou au contraire diminuer la capacité du virus à se fixer ou à pénétrer dans la cellule ou encore à se répliquer.

Ainsi, pour s'assurer de la neutralisation de la potentielle activité antivirale du produit testé, 900 µL de la solution à tester sont mélangés à 100 µL d'eau osmosée stérile (les 100 µL d'eau remplacent les 100 µL de suspension virale), puis ce mélange est filtré sur les colonnes de Séphadex™. Enfin, 20 µL de suspension virale diluée au 1/100<sup>ème</sup> sont ajoutés à 180 µL du filtrat obtenu avant d'inoculer ce mélange aux cellules. Ainsi, si l'activité du produit a bien été neutralisée, la différence entre les titres viraux du témoin virus sans filtration et du témoin neutralisation est inférieure à 0,5 log<sub>10</sub>.

#### 2.6.4.3 *Contrôle de cytotoxicité*

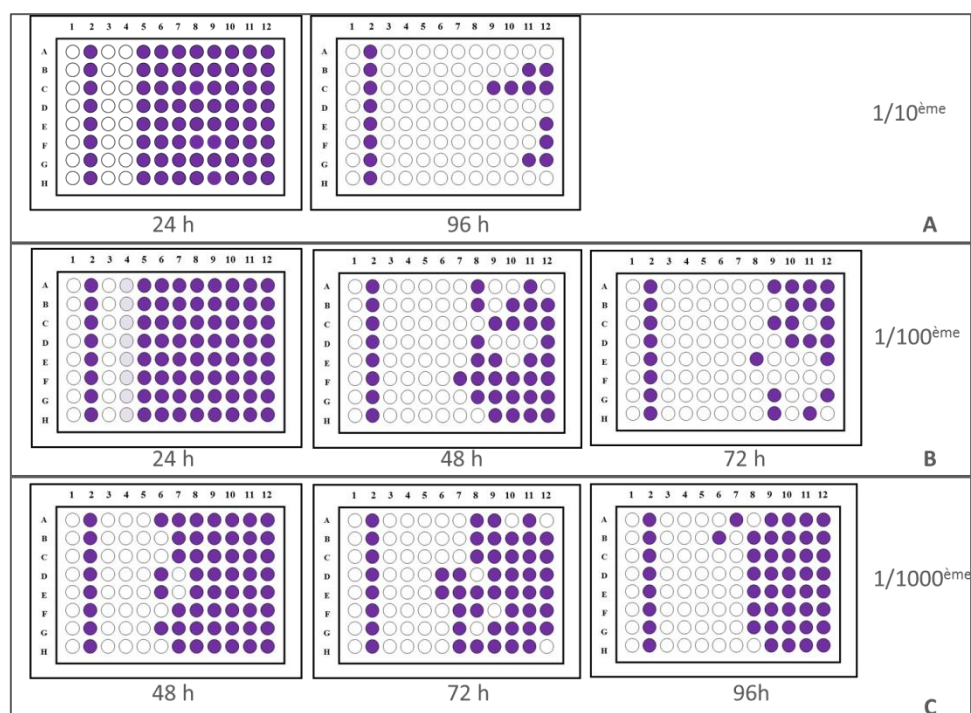
Un autre contrôle essentiel est de s'assurer de l'absence de cytotoxicité. L'objectif de ce contrôle est (i) de vérifier que la concentration de l'agent chimique testée ne provoque pas de dommage sur la lignée cellulaire utilisée pour mesurer l'infectivité virale et (ii) que la méthode de neutralisation choisie n'induit pas non plus de cytotoxicité. Ce contrôle consiste à déposer sur les cellules le produit à tester neutralisé, avec du milieu de culture, d'incuber les cellules pour le même temps que celui nécessaire à la répllication virale et de vérifier qu'il n'y ait pas de cytotoxicité visible.

Le témoin cytotoxicité correspond à la filtration sur colonne de Séphadex™ du mélange de 900 µL du produit à tester avec 100 µL d'eau osmosée stérile. Le filtrat obtenu est directement inoculé aux cellules sans ajout de virus. Après révélation par coloration MGG, les cellules sont observées au microscope inversé au grossissement x200 pour s'assurer qu'il n'y ait pas de toxicité visible. Ce contrôle est réalisé en complément des tests préalables de viabilité, de cytotoxicité et spectrophotométriques, réalisés pour chaque molécule testée avec et sans filtration sur les colonnes de Séphadex™ (Matériels et Méthodes, 2.4 et 2.5, p.65 et 67).

## RESULTATS

### 1 Titrage du PV-1 : Optimisation et cinétique

Afin de pouvoir mener à bien les expériences d'antisepsie antivirale sur le PV-1, il a fallu optimiser la méthode de titrage du PV-1 en dilutions limites sur cellules L-132. Ce dernier consiste à estimer la CCID<sub>50</sub> par observation de l'ECP du PV-1 (Matériels et Méthodes, 2.3, p.62). L'ECP du PV-1 est caractérisé par une désorganisation membranaire, une ballonisation puis une lyse des cellules.



**Figure 11 : Optimisation du titrage du PV-1 sur cellules L-132**

Cette figure représente les schémas de plaques 96 puits, représentatives, obtenues lors du titrage du PV-1 sur cellules L-132 après inoculation de différentes dilutions de la suspension virale et différents temps d'incubation. Les colonnes 1 correspondent aux témoins négatifs (milieu seul). Les colonnes 2 correspondent aux témoins cellules non infectées. Les puits colorés en violet sont non infectés avec présence d'un tapis cellulaire intact. Les puits non colorés correspondent à des puits infectés avec destruction du tapis cellulaire. Les puits colorés en violet clair représentent des puits dans lesquels l'infection par le PV-1 est visible mais présence de portions de tapis cellulaires encore intactes.

En A sont représentées des plaques après inoculation de dilutions de suspensions virales de PV-1 Lsc2ab au 1/10<sup>ème</sup> sur cellules L-132 après des temps d'incubation de 24 h et 96 h.

En B sont représentées des plaques après inoculation de dilutions de suspensions virales de PV-1 Lsc2ab au 1/100<sup>ème</sup> sur cellules L-132 après des temps d'incubation de 24 h, 48 h et 72 h.

En C sont représentées des plaques après inoculation de dilutions de suspensions virales de PV-1 Lsc2ab au 1/1000<sup>ème</sup> sur cellules L-132 après des temps d'incubation de 48 h, 72 h et 96 h.

Différents paramètres devaient être optimisés : la dilution de la suspension virale à inoculer et le temps d'incubation. Cette optimisation devait répondre aux objectifs suivants :

- Le temps d'incubation doit être suffisant pour obtenir l'ECP maximum (ou CCID<sub>50</sub>) sans allonger le temps d'expérience inutilement,
- Avoir une bonne reproductibilité,
- Permettre une observation de 4 log<sub>10</sub> de réduction dans les titres viraux en cas d'efficacité d'une molécule.

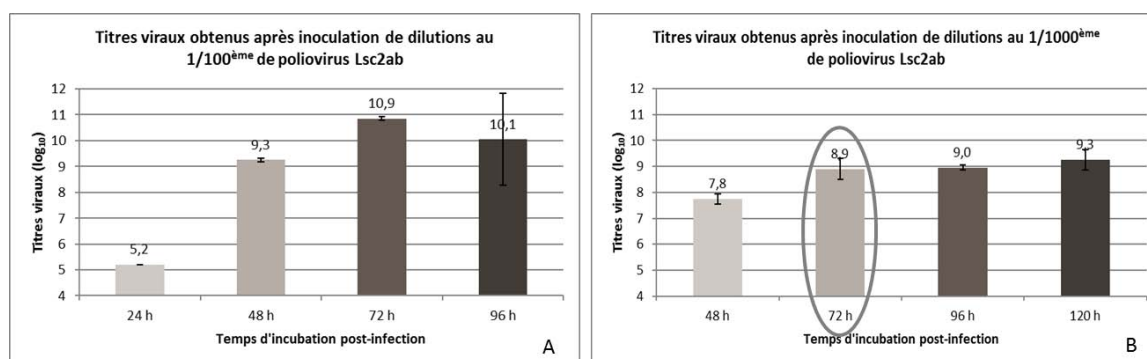
En effet, une activité (ATS-D) antivirale est caractérisée par une diminution du nombre de puits infectés. Il faut donc être en mesure de quantifier cette diminution. De plus, pour pouvoir envisager une réelle activité ATS-D, il faut une diminution de 4 log<sub>10</sub> (AFNOR, 2007).

Différentes dilutions des suspensions de PV-1 dans de l'eau osmosée stérile (pH neutre) ont été testées : 1/10<sup>ème</sup>, 1/100<sup>ème</sup> et 1/1000<sup>ème</sup>.

La dilution au 1/10<sup>ème</sup> est trop concentrée. En effet, à 24 h d'incubation, la CCID<sub>50</sub> n'est encore pas atteinte avec un titre viral de 1,6.10<sup>4</sup> particules virales infectieuses/mL soit 4,2 log<sub>10</sub>. Cependant, inoculer la dilution au 1/10<sup>ème</sup> et avec 96 h d'incubation entraînent l'apparition d'un titre viral trop élevé de 11 log<sub>10</sub> avec un nombre de puits infectés trop élevés (Figure 11A) dans la plaque pour que ce soit reproductible et pour que l'on soit sûr d'atteindre le titre maximum. Ainsi, afin d'avoir des résultats plus fiables, nous avons essayé d'inoculer des dilutions au 1/100<sup>ème</sup> et au 1/1000<sup>ème</sup>.

Lors de l'inoculation de suspensions diluées au 1/100<sup>ème</sup>, le problème se répète avec un nombre de puits infectés trop élevés à 72 h et l'ECP maximum ne semble pas atteint à 48 h (Figure 11B). En revanche, à 72 h, l'ECP maximal semble atteint puisque la différence entre les titres viraux à 72 h et à 96 h est très faible (10,9 log<sub>10</sub> à 72 h contre 10,1 log<sub>10</sub>) (Figure 12A).

Enfin, l'inoculation de dilutions au 1/1000<sup>ème</sup> apparaît être le meilleur choix avec un temps d'incubation de 72 h. Comme le montre la Figure 11C, les puits infectés représentent environ 50% des puits, ce qui permet de calculer des diminutions de titres importants et d'assurer la reproductibilité des résultats. De plus, le titre maximum semble atteint. En effet, les titrages réalisés après 96 h et 120 h d'incubation montrent que le titre viral n'augmente plus avec 8,9 log<sub>10</sub> à 72 h ; 9,0 log<sub>10</sub> à 96 h et 9,3 log<sub>10</sub> à 120 h (Figure 12B).



**Figure 12 : Cinétique du titrage du PV-1 sur cellules L-132**

Sont représentées sur ces graphiques les CCID<sub>50</sub> (exprimées en log<sub>10</sub>) obtenues par tirage du PV-1 en dilutions limites sur cellules L-132 en fonction des temps d'incubation. En A, les dilutions de la suspension virale inoculées sont de 1/100<sup>ème</sup> et en B, elles sont de 1/1000<sup>ème</sup>. Pour chaque temps d'incubation, les expériences sont répétées trois fois.

## 2 Non rétention du PV-1 par les colonnes de Séphadex™

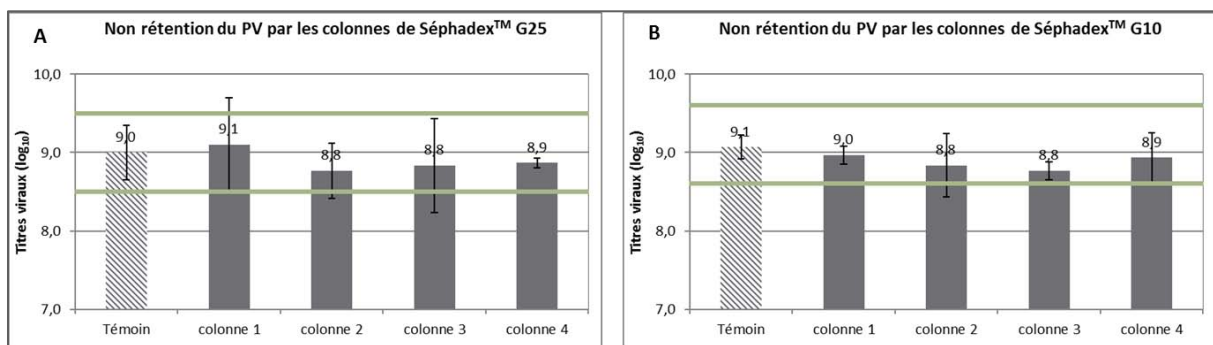
Comme nous l'avions fait pour le HCoV 229E (Geller C. *et al.*, 2009, Geller C., 2010), il a fallu valider le protocole avec le PV-1, virus nettement plus petit que le HCoV 229E (30 nm vs. 80-120 nm de diamètre). Il était nécessaire de prouver que le PV-1 n'était retenu pas les colonnes de Séphadex™ et que la filtration n'induisait pas de diminution dans les titres viraux et/ou d'interférence avec l'infectivité virale. Le principe est le même que pour le contrôle de non rétention du virus au sein même du test d'ATS-D antivirale (Matériels et Méthodes, 2.6.4.1, p.72) : le test est validé si la différence entre le titre viral sans filtration et après filtration sur colonnes de Séphadex™ est inférieure à 0,5 log<sub>10</sub>.

Pour cela, nous avons procédé à la filtration de suspensions de PV-1 diluées au 1/1000<sup>ème</sup> sur colonnes de Séphadex™ G-25 et G-10.

Pour chaque expérience : Quatre colonnes de Séphadex™ ont été préparées extemporanément (Matériels et Méthodes, 2.6.2, p.68) et une plaque témoin a été réalisée en titrant le PV sans filtration (Matériels et Méthodes, 2.3, p.62). Les suspensions de PV-1 (500 µL) ont été déposées en haut des colonnes de Séphadex™ puis après une centrifugation à 405xg pendant 1 min, les filtrats ont été inoculés sur les plaques de cultures contenant des tapis cellulaires de cellules L-132 confluent pour titrage en dilutions limites (Matériels et Méthodes, 2.6.4.1, p.72).

Pour les colonnes de Séphadex™ G25, le titre moyen des témoins virus était de 9,0 log<sub>10</sub> et les titres viraux moyens obtenus après filtration étaient de 9,1 ; 8,8 ; 8,8 et 8,9 log<sub>10</sub>. Pour les colonnes de Séphadex™ G-10, le titre viral moyen pour les témoins sans filtration était de 9,1 log<sub>10</sub> et les titres viraux obtenus après filtration étaient de 9,0 ; 8,8 ; 8,8 et 8,9 log<sub>10</sub>.

Nous avons ainsi montré que le PV-1 n'était retenu ni par les colonnes de Séphadex™ G-10, ni par les colonnes de Séphadex™ G-25 et que cette filtration n'influe pas sur l'infectivité virale (Figure 13).



**Figure 13 : Non rétention du PV-1 par les colonnes de Séphadex™**

Sont représentés sur ces graphiques les titres viraux exprimés en log<sub>10</sub> lors des tests de non rétention par les colonnes de Séphadex™. Chaque test a été répété trois fois sur quatre colonnes de Séphadex™. Les résultats représentent les moyennes obtenues pour les trois tests. Les témoins correspondent au titrage du virus sans filtration. Les lignes vertes correspondent au seuil de 0,5 log<sub>10</sub> (titre viral témoin ± 0,5 log<sub>10</sub>) à ne pas dépasser pour que le test soit validé. En A, sont représentés les résultats obtenus avec les colonnes de Séphadex™ G-25 et en B, ceux obtenus avec les colonnes de Séphadex™ G-10.

### 3 Cytotoxicité et Rétention de la CHX et du C[4]S-BTZ

Les résultats de ces expériences ont été présentés au cours du Doctorat d'Université et de publications antérieures (Geller C. *et al.*, 2009, Geller C., 2010, Geller C. *et al.*, 2010, Geller C. *et al.*, 2011). Nécessaires à la réalisation des tests d'ATS-D antivirale sur le PV-1, ils ont été succinctement résumés ci-dessous.

#### 3.1 Rétention de la CHX par les colonnes de Séphadex™ G-25

La CHX (Figure 14) avait été choisie dans les travaux précédents sur le HCoV 229E pour sa large utilisation en médecine humaine dans l'ATS-D de la peau saine et lésée (Bibliographie, 2.2, p.24). De plus, elle nous avait permis de valider notre modèle de colonnes de Séphadex™ G-25 et avait été choisie comme l'une des molécules de référence.

Ainsi, pour valider la fonctionnalité de notre protocole avec le PV-1, nous avons utilisé cette même molécule.

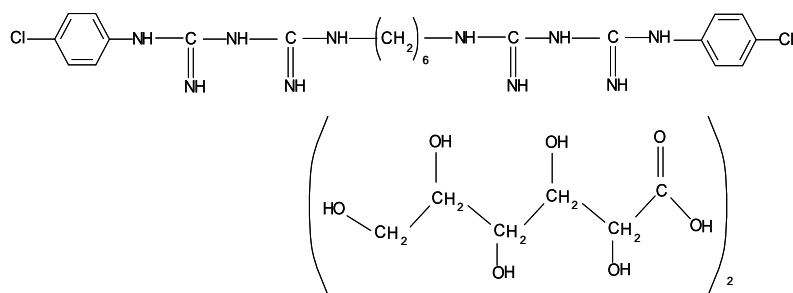


Figure 14 : Structure du digluconate de chlorhexidine (CHX)

##### 3.1.1 Cytotoxicité de la CHX sur les cellules L-132 avec et sans filtration

La cytotoxicité de la CHX avec et sans filtration sur colonnes de Séphadex™ G-25 a été préalablement évaluée, sur les cellules L-132, par les tests MTT et RN (Geller C. *et al.*, 2009, Geller C., 2010) (Matériels et Méthodes, 2.5, p.67).

Pour évaluer une éventuelle cytotoxicité résiduelle après filtration, des tests MTT et RN ont été réalisés sur les filtrats de solutions de CHX à différentes concentrations ( $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup>). Les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau 9.

La solution à  $10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> semblait complètement retenue par les colonnes de Séphadex™ G-25, comme en témoignaient les pourcentages de viabilité, proches de 100%, et de cytotoxicité, proches de 0% (Geller C. *et al.*, 2009, Geller C., 2010). Les CI<sub>50</sub> et les CC<sub>50</sub> étaient toutes supérieures à  $10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>, seule valeur accessible dans les conditions de l'expérience.

Tableau 9 :  $CI_{50}$  et des  $CC_{50}$  de la CHX sur les cellules L-132

		$CI_{50}$			$CC_{50}$		
		24 h	48 h	168 h	24 h	48 h	168 h
CHX non filtrée (n = 3)		$4,3.10^{-6}$	$2,4.10^{-6}$	$3,9.10^{-6}$	$6,0.10^{-6}$	$3,0.10^{-6}$	$3,5.10^{-6}$
CHX $10^{-2}$ mol.L <sup>-1</sup> / G25 (n = 3)		$2,5.10^{-5}$	$3,0.10^{-5}$	$1,4.10^{-5}$	$4,2.10^{-5}$	$2,1.10^{-5}$	$2,1.10^{-5}$
CHX $10^{-3}$ mol.L <sup>-1</sup> / G25	Test n°1	$>10^{-4}$	$7,9.10^{-5}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$
	Test n°2	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$9,2.10^{-5}$	$5,4.10^{-5}$
	Test n°3	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$5,5.10^{-5}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$5,1.10^{-5}$
CHX $10^{-4}$ mol.L <sup>-1</sup> / G25 (n = 3)		$>10^{-5}$	$>10^{-5}$	$>10^{-5}$	$>10^{-5}$	$>10^{-5}$	$>10^{-5}$

Les moyennes des  $CI_{50}$  et des  $CC_{50}$  obtenues pour la CHX non filtrée sont représentées ci-dessus. Les moyennes des  $CI_{50}$  et des  $CC_{50}$  obtenues avec les solutions de CHX à  $10^{-2}$  et  $10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-25 sont également représentées. Pour les solutions à  $10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>, les  $CI_{50}$  et les  $CC_{50}$  obtenues sont détaillées pour plus de précision.

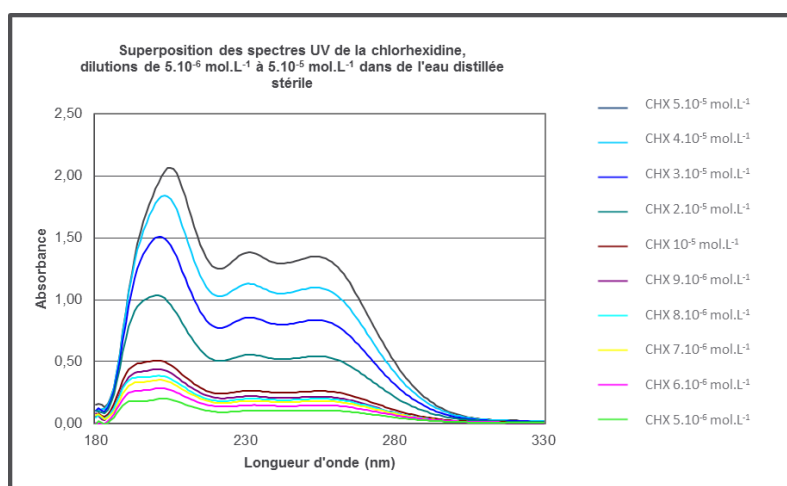
La filtration de solutions à  $10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> sur colonnes de Séphadex™ G-25 a donné également de bons résultats, les  $CI_{50}$  et les  $CC_{50}$  étaient  $> 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>. Cependant, une toxicité résiduelle a été observée dans certains tests : une  $CI_{50}$  à  $7,9.10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup> à 48 h dans le premier test et une  $CI_{50}$  à  $5,5.10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup> à 168 h dans le troisième test ont en effet été constatées. De la même façon, dans le deuxième test, les  $CC_{50}$  à 48 h et 168 h étaient respectivement de  $9,2.10^{-5}$  et de  $5,4.10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup> (Tableau 9). Ainsi, malgré une diminution d'environ 1 log<sub>10</sub> dans les  $CI_{50}$  et les  $CC_{50}$  par rapport à la CHX non filtrée, une légère toxicité était parfois visible. Ceci rendait compte d'une rétention parfois incomplète pouvant résulter d'une saturation des colonnes.

Afin de compléter ces résultats et de corroborer l'hypothèse de surcharge des colonnes par les solutions à forte concentration, nous avons évalué la toxicité résiduelle sur cellules L-132 d'une solution de CHX à  $10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup> après filtration sur les colonnes de Séphadex™ G-25. Le déplacement des courbes de cytotoxicité (Geller C. *et al.*, 2009, Geller C., 2010), que ce soit de viabilité ou de cytotoxicité, indiquait une perte de toxicité par rapport à la CHX non filtrée et donc une rétention, au moins partielle, de la CHX à  $10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup> par les colonnes de Séphadex™ G-25. Les moyennes des  $CI_{50}$  et des  $CC_{50}$  montraient 1 log<sub>10</sub> de différence environ avec la CHX non filtrée a été observé.

Ceci semblait donc confirmer les observations précédentes. D'une part, une rétention partielle de la CHX matérialisée par cette baisse globale de la toxicité, et d'autre part, l'hypothèse avancée lors des tests avec la CHX à  $10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>, i.e. une surcharge des colonnes qui ne pourraient pas retenir l'ensemble des molécules en cas de concentration élevée.

### 3.1.2 Taux de rétention de la CHX par les colonnes de Séphadex™ G-25

Après avoir mis en évidence l'élimination, concentration-dépendante, de la cytotoxicité de la CHX sur les cellules L-132 par les colonnes de Séphadex™ G-25, les TR de la CHX ont été quantifiés en faisant appel à la spectrophotométrie UV-visible. Le principe repose sur la comparaison des spectres effectués sur les solutions des molécules à tester avec les spectres des solutions après filtration sur colonnes de Séphadex™, en associant la détermination de leurs paramètres spectrophotométriques propres (Matériels et Méthodes, 2.4, p.65.).



**Figure 15 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible de la CHX**

*Dilutions de CHX analysées de  $5.10^{-5}$  à  $5.10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$*

Les paramètres spectrophotométriques spécifiques de la CHX ont été calculés à partir des spectres obtenus (Figure 15) et des analyses de régression effectués (Geller C. *et al.*, 2009, Geller C., 2010).

Deux pics d'absorption maximum ont été ainsi déterminés à 232 nm et 255 nm. Une analyse de régression simple (Matériels et Méthodes, 2.4.2, p.66) a ensuite été effectuée pour estimer les coefficients d'absorption molaire spécifiques. Le coefficient d'absorption molaire à 232 nm a donc été estimé à  $2,8.10^4 \text{ L.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$  et à 255 nm, il a été estimé à  $2,7.10^4 \text{ L.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ .

Suite à la détermination de ces paramètres, des solutions de CHX à différentes concentrations ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ), ont été filtrées sur colonnes de Séphadex™ G-25 et la concentration résiduelle mesurée, afin d'estimer leur TR (Matériels et Méthodes, 2.4, p.65).

L'observation des spectres obtenus (Figure 16) montre l'absence de différence significative entre les spectres obtenus sans filtration et après filtration de la solution de CHX à  $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ , révélant ainsi une rétention faible de la CHX à  $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ . Cependant, l'absence des pics spécifiques de la CHX sur les spectres obtenus après filtration des solutions à  $10^{-3}$  et  $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  révélait sa rétention. Un pic aux environs de 200 nm était présent, quelle que soit la concentration de la solution filtrée. Ce pic n'a pas été considéré comme spécifique car la plupart des molécules organiques absorbent aux environs de cette longueur d'onde. Il n'en est donc pas tenu compte lors de l'expression des résultats.

Les TR estimés grâce aux analyses de régression sont consignés dans le Tableau 10.

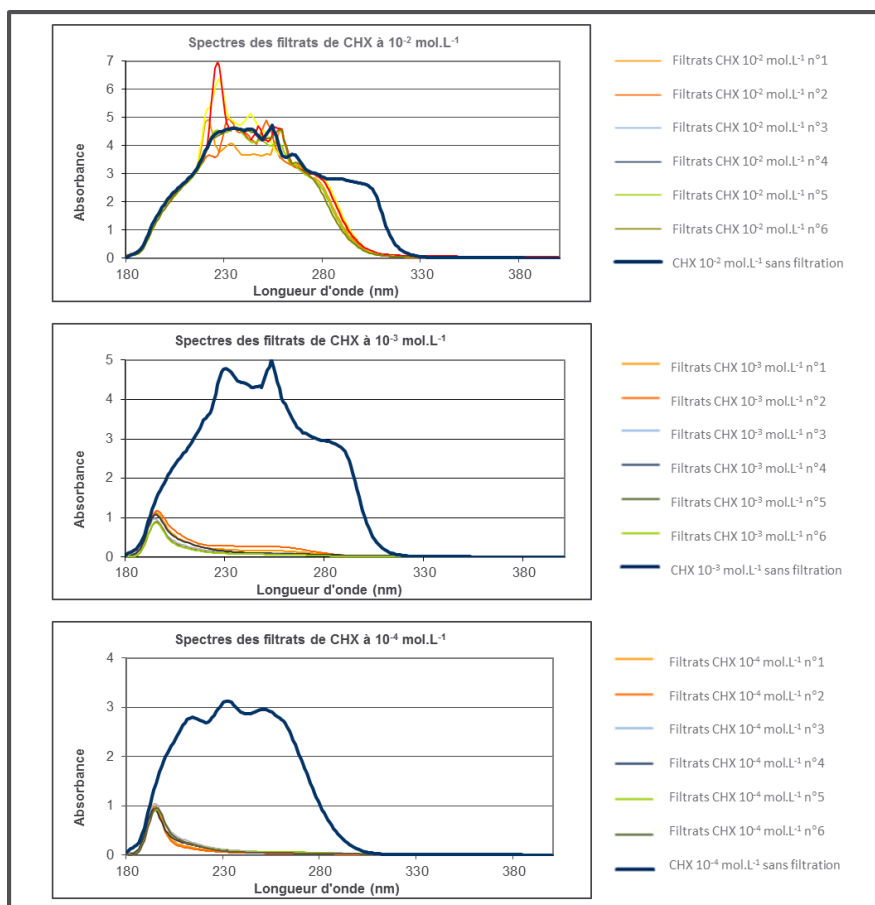


Figure 16 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible des filtrats de CHX

Les filtrats ont été obtenus par passage de solutions de CHX à  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  sur colonnes de Séphadex™ G-25. Les spectres des solutions correspondantes sans filtration ont été ajoutés pour comparaison.

Tableau 10 : Taux de rétention de la CHX par les colonnes de Séphadex™ G-25

Concentration des solutions de CHX filtrées	A à 232 nm		A à 255 nm	
	C estimée	TR (%)	C estimée	TR (%)
$10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$	$(1,66 \pm 0,12) \cdot 10^{-4}$	NC	$(1,55 \pm 0,10) \cdot 10^{-4}$	NC
$10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$	$(5,51 \pm 2,76) \cdot 10^{-6}$	$99,45 \pm 0,27$	$(4,61 \pm 2,77) \cdot 10^{-6}$	$99,54 \pm 0,28$
$10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$	$(2,92 \pm 0,65) \cdot 10^{-6}$	$97,08 \pm 0,65$	$(1,85 \pm 0,44) \cdot 10^{-6}$	$99,81 \pm 0,04$

Sont exprimées ci-dessus, les concentrations ( $\text{mol.L}^{-1}$ ) résiduelles estimées dans les filtrats après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-25 de solutions de CHX à différentes concentrations ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ). Cette estimation a été faite grâce à la loi de Beer-Lambert. Les TR en ont été déduits en se servant des analyses de régression réalisée au préalable.

NC : non calculable, TR : Taux de rétention, CHX : chlorhexidine

Pour la solution à  $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ , les absorbances des filtrats au maxima d'absorption étaient supérieures à 4 et donc en-dehors des limites de linéarité, soit des concentrations supérieures à  $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ . Le TR n'a pu donc qu'être estimé en prenant  $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  comme concentration finale et il pouvait donc être compris entre 0 et 99%. Cependant, en comparant avec les résultats obtenus précédemment dans les tests de cytotoxicité, la rétention incomplète d'une solution de CHX à  $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  pouvait être confirmée.

Les solutions de CHX à  $10^{-3}$  et  $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  étaient quant à elles retenues en quasi-totalité par les colonnes de Séphadex™ G-25 comme l'ont montré les TR obtenus :  $(99,45 \pm 0,27)\%$  à 232 nm et



(99,54 ± 0,28)% à 255 nm pour la solution à  $10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> et (97,08 ± 0,65)% à 232 nm et (99,81 ± 0,04)% à 255 nm pour la solution à  $10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> (Tableau 10).

Ces résultats confirmaient eux aussi ceux obtenus lors des tests de cytotoxicité.

Cependant, une toxicité résiduelle des filtrats de CHX à  $10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> avait été observée dans certains tests et à certain temps d'incubation, laissant penser à une rétention incomplète (Résultats, 3.1.1, p.77). Ceci a été démenti par la spectrophotométrie UV-visible. Cette technique, plus reproductible et plus spécifique que les tests de cytotoxicité de par la sensibilité des cellules à de nombreux paramètres, a montré une rétention supérieure à 99% des solutions de CHX à  $10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> et  $10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>. Cela pourrait laisser supposer que la cytotoxicité observée sur un faible nombre de plaques de cultures dans les épreuves de cytotoxicité ne serait peut-être pas directement imputable aux filtrats de CHX à  $10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>. Ces résultats nous ont par ailleurs confortés dans l'assurance de la complémentarité de ces méthodes d'évaluation de la rétention des molécules testées.

Par ailleurs, les spectres obtenus après filtration d'une solution de CHX à  $10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>, ne présentaient aucun pic spécifique ni à 232 nm ni à 255 nm. La concentration estimée était donc inférieure à  $10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>, limite inférieure de détection de la CHX. Les TR de ces solutions étaient ainsi supérieurs à 99% en utilisant la même formule pour le calcul du TR et en prenant  $10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup> comme concentration finale. Les filtrats sont donc exempts de résidus de CHX et peuvent être inoculés aux cellules en présence de virus sans interférer sur les résultats, tout du moins d'un point de vue physico-chimique.

### 3.2 Rétention du C[4]S-BTZ par les colonnes de Séphadex™ G-25

De la même façon que pour les résultats précédents, ces résultats concernant la rétention du C[4]S-BTZ (Figure 17) sont exposés succinctement pour une meilleure compréhension de la suite de l'exposé et peuvent être consulté en détail dans le Doctorat d'Université ainsi que dans la publication concernée (Geller C., 2010, Geller C. *et al.*, 2010).

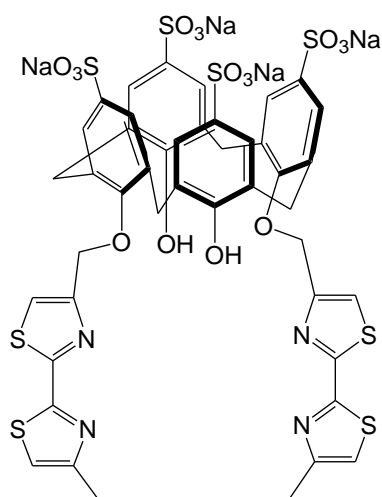


Figure 17 : Structure du C[4]S-BTZ

### 3.2.1 Cytotoxicité du C[4]S-BTZ sur les cellules L-132 avec et sans filtration

La réalisation des tests MTT et RN sur les cellules L-132 en présence de C[4]S-BTZ, de  $10^{-4}$  à  $10^{-12}$  mol.L<sup>-1</sup>, ont mis en évidence une très intéressante absence de cytotoxicité de cette molécule pour cette gamme de concentration et pour des temps de contact allant jusqu'à 168 h.

Tableau 11 : CI<sub>50</sub> et des CC<sub>50</sub> du C[4]S-BTZ sur cellules L-132

	CI <sub>50</sub>			CC <sub>50</sub>		
	24 h	48 h	168 h	24 h	48 h	168 h
C[4]S-BTZ (n = 3)	>10 <sup>-4</sup>	>10 <sup>-4</sup>	>10 <sup>-4</sup>	>10 <sup>-4</sup>	>10 <sup>-4</sup>	>10 <sup>-4</sup>
C[4]S-BTZ après filtration sur Séphadex™ G-25 (n = 3)	>10 <sup>-4</sup>	>10 <sup>-4</sup>	>10 <sup>-4</sup>	>10 <sup>-4</sup>	>10 <sup>-4</sup>	>10 <sup>-4</sup>

Les moyennes des CI<sub>50</sub> et des CC<sub>50</sub> (en mol.L<sup>-1</sup>) obtenues pour le C[4]S-BTZ non filtré et après filtration de solutions à 10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup> sur les colonnes de Séphadex™ G-25 sont représentées ci-dessus.

Par la suite, ces tests ont été répétés sur une solution de C[4]S-BTZ à 10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup> après filtration sur Séphadex™ G-25 et la non toxicité des filtrats a pu être confirmée, avec des CI<sub>50</sub> et des CC<sub>50</sub> supérieures à 10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> (Tableau 11).

### 3.2.2 Taux de rétention du C[4]S-BTZ par les colonnes de Séphadex™ G-25

Les mesures spectrophotométriques effectuées sur des solutions de C[4]S-BTZ ont tout d'abord montré qu'au-dessus de 10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup>, les valeurs d'absorbance sortaient des limites d'acceptation de la loi de Beer-Lambert.

De plus, deux pics d'absorbance maximale ont été observés : un aux environs de 200 nm, n'ayant pas été considéré comme un pic caractéristique du C[4]S-BTZ, et un second pic, aux environs de 330 nm (Figure 18). L'analyse de régression a montré une relation linéaire de 10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> à 10<sup>-6</sup> mol.L<sup>-1</sup> et a permis d'établir précisément le coefficient d'absorption molaire à 330 nm soit 2,07.10<sup>4</sup> L.cm<sup>-1</sup>.mol<sup>-1</sup>.

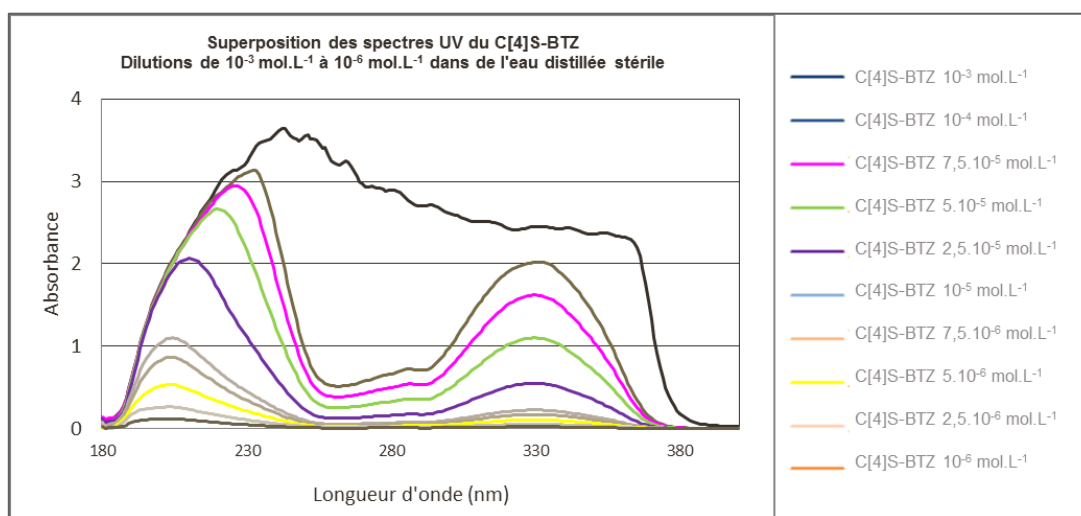


Figure 18 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible du C[4]S-BTZ

Dilutions de C[4]S-BTZ analysées de 10<sup>-3</sup> à 10<sup>-6</sup> mol.L<sup>-1</sup>

L'analyse spectrophotométrique des filtrats de solutions de C[4]S-BTZ à  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> montre une non rétention de la solution à  $10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup>. Pour les solutions à  $10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> et à  $10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>, les TR étaient de  $(94,90 \pm 1,04)\%$  et de  $(99,40 \pm 0,05)\%$ , respectivement.

#### 4 Activité de la CHX sur le PV-1 Lsc2ab

Ainsi, les travaux menés au cours de la thèse d'Université avaient permis de démontrer la rétention de la CHX par les colonnes de Séphadex™ G25 et ses limites. Par la suite, nous avons démontré la non rétention du PV-1 par les colonnes de Séphadex™ G-25 et l'absence d'interférence de la filtration sur l'infectivité du virus (Résultats, 2, p.76).

L'activité ATS de la CHX sur le PV-1 a donc pu être évaluée, selon le protocole décrit dans Matériels et Méthodes, 2.6, p.68.

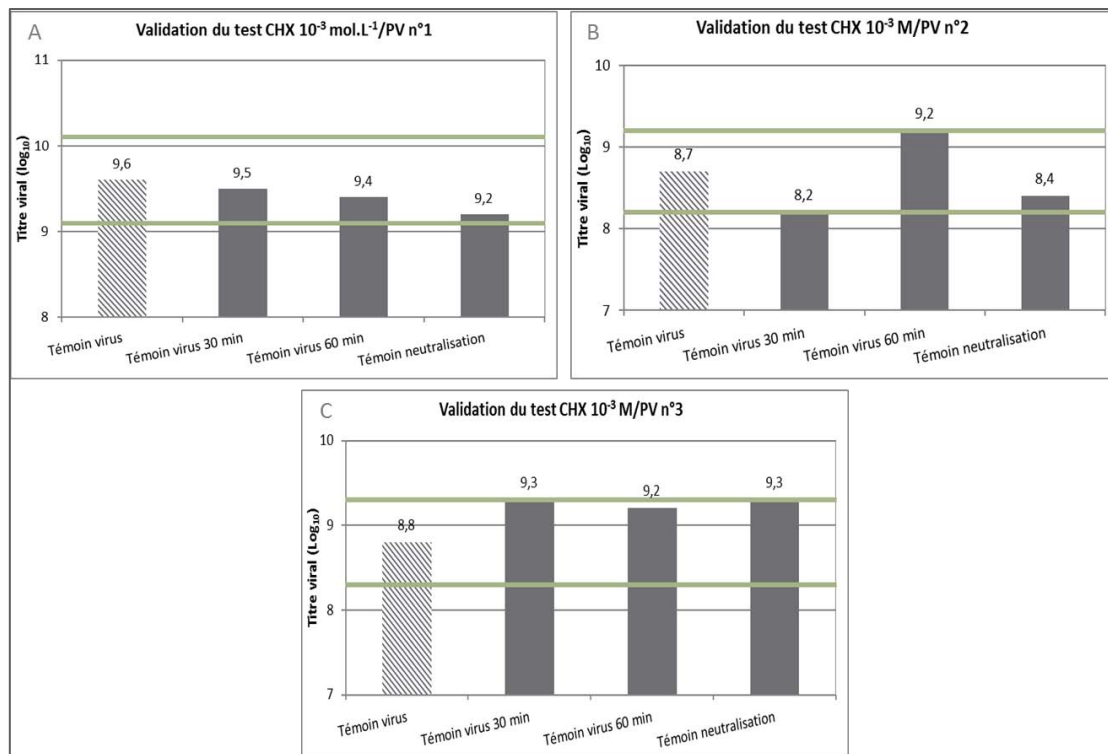
La première concentration de la CHX testée était de  $10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>, concentration dont la rétention par les colonnes de Séphadex™ G-25 avait été démontrée. Son éventuelle activité ATS-D antivirale a été évaluée pour des temps de contact de 30 min et 60 min, temps de contact recommandés par la norme NF EN 14476+A1 dans le cas de la désinfection de surfaces et d'instruments (Tableau 4, p.41).

Chaque expérience, correspondant à une concentration et à un temps de contact, a été réalisée en triplicat. Les contrôles, inhérents au test de virucidie, ont dû rendre compte de la non rétention du PV-1 par les colonnes de Séphadex™ G-25 au cours de l'expérience, de la neutralisation de l'activité potentielle de la CHX, de l'absence d'interférence de l'expérience elle-même sur le pouvoir infectieux du virus et enfin de l'élimination de la cytotoxicité de la CHX.

Les contrôles de non rétention du PV-1 ont été réalisés en comparant les titres viraux obtenus sans filtration et après filtration des suspensions virales sur les colonnes de Séphadex™ G-25. Les suspensions virales, qu'elles soient filtrées ou non, ont été soumises aux mêmes conditions notamment au niveau du temps de contact dans l'eau osmosée stérile, dans laquelle elles ont été diluées. Les différences obtenues entre les titres viraux sont inférieures à  $0,5 \log_{10}$  (Figure 19), comme cela est recommandé dans la norme NF EN 14476+A1 (AFNOR, 2007), et la non rétention du PV-1 Lsc2ab lors de ces expériences a été confirmée.

Les contrôles de neutralisation (Matériels et Méthodes, 2.6.4.2, p.72) consistaient en l'inoculation, sur les cellules L-132, des filtrats des solutions de CHX à  $10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> mélangés à une dilution au 1/100<sup>ème</sup> de la suspension virale sur les cellules (dilution de la suspension virale finale au 1/1000<sup>ème</sup>). Les titres viraux obtenus ont été comparés à ceux obtenus avec la suspension virale sans filtration. Les différences de  $\log_{10}$  obtenues étaient inférieures à  $0,5 \log_{10}$  tel que recommandé dans la norme NF EN 14476+A1 (Figure 19). L'activité potentielle de la CHX a donc bien été neutralisée par la filtration sur les colonnes de Séphadex™ G-25.

De plus, grâce à ces deux contrôles, non rétention du virus et neutralisation, l'absence d'interférence de ces expériences sur le pouvoir infectieux du virus a été confirmée.

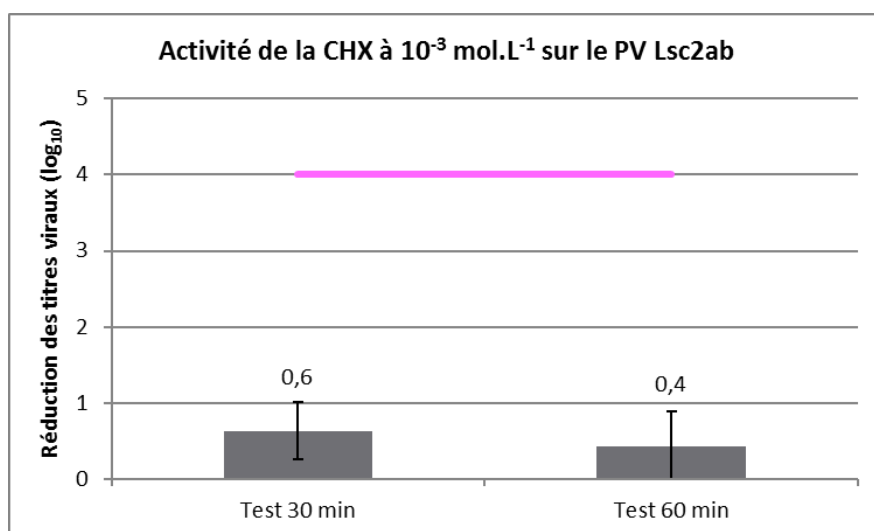


**Figure 19 : Validation des contrôles des tests d'ATS-D antivirale de la CHX sur le PV-1**

Sont représentés sur ces graphiques les titres viraux obtenus lors des contrôles effectués pour les tests d'ATS-D antivirale de la CHX sur le PV-1. Les témoins virus correspondent aux témoins virus sans filtration. Les lignes vertes représentent les seuils d'acceptabilité des contrôles pour la validité des tests (titre viral du témoin virus  $\pm 0,5 \log_{10}$ ). Les témoins virus 30 min et 60 min correspondent aux témoins virus après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-25 après 30 min et 60 min dans l'eau osmosée stérile, respectivement. Les témoins neutralisation correspondent à l'inoculation sur cellules L-132 des filtrats de solutions de CHX à  $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  mélangés à la suspension virale.

Le dernier contrôle, le contrôle de cytotoxicité (Matériels et Méthodes, 2.6.4.3, p.73) permettait de s'assurer, visuellement par observation au microscope inversé, de la non cytotoxicité des filtrats de la CHX à  $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ . Il s'agissait donc de vérifier l'intégrité des tapis cellulaires après dépôt des filtrats sur les cellules et une incubation de 72 h, durée nécessaire à l'apparition de l'ECP du PV-1 Lsc2ab. Ce contrôle était complémentaire des tests de cytotoxicité (MTT et RN) réalisés au préalable (Résultats, 3.1.1, p.77). Ces contrôles ont fait l'objet d'une observation minutieuse et aucune altération n'a été observée sur les tapis cellulaires.

Ainsi, nous avons pu, en toute fiabilité, évaluer l'éventuelle activité de la CHX sur le PV-1 Lsc2ab. Cette activité, estimée par la perte de pouvoir infectieux, a été évaluée en calculant la différence entre : (i) le titre viral obtenu après la filtration de la suspension virale diluée dans l'eau osmosée après un temps de contact  $t$  et (ii) le titre viral obtenu après la filtration du mélange suspension virale/solution de CHX soumis au même temps de contact. Ces résultats sont représentés dans la Figure 20.



**Figure 20 : Activité de la CHX à  $10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> sur le PV-1 Lsc2ab**

Sont représentées sur ce graphique, les moyennes ( $n = 3$ ) des différences entre les titres viraux, exprimées en  $\log_{10}$ , entre les témoins virus 30 min et 60 min et les tests réalisés : CHX à  $10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> + suspension virale diluée au 1/1000<sup>ème</sup> pendant 30 min ou 60 min puis filtration sur colonnes de Séphadex™ G-25 et enfin inoculation sur cellules L-132. La ligne rose représente le seuil de 4  $\log_{10}$  à atteindre pour pouvoir prétendre à une activité ATS-D antivirale selon la norme NF EN 14476+A1 (AFNOR, 2007).

La CHX à  $10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> a induit une baisse des titres viraux de 0,6 et 0,4  $\log_{10}$  pour des temps de contact de 30 min et 60 min, respectivement. La baisse de pouvoir infectieux induite est donc très inférieure au seuil de 4  $\log_{10}$ .

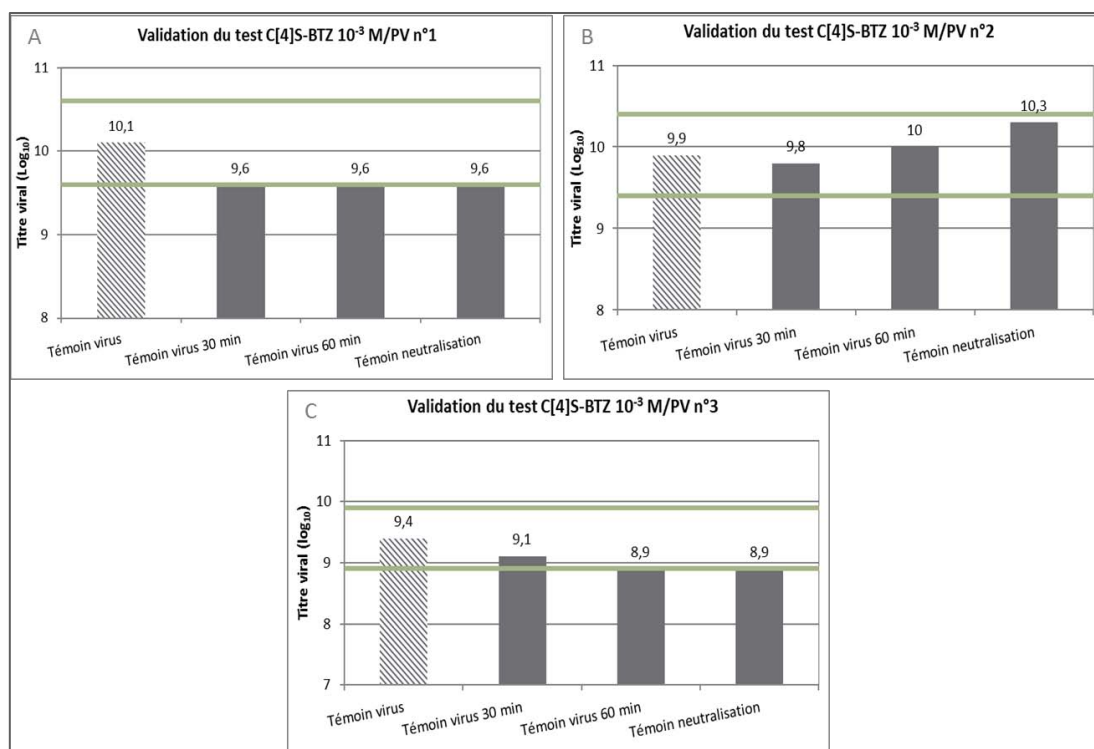
La CHX est ainsi très loin de pouvoir prétendre à une activité ATS-D sur le PV-1 Lsc2ab, ce qui est cohérent avec la littérature (Bibliographie, 3.8, p.52). Nous ne sommes donc pas allés plus avant de l'étude de l'activité ATS-D de la CHX sur le PV-1 Lsc2ab.

## 5 Activité du C[4]S-BTZ sur le PV-1 Lsc2ab

Au cours des travaux menés sur le HCoV 229E, le C[4]S-BTZ avait montré une activité très intéressante puisqu'il avait montré une activité comparable à la CHX et présentait, de plus, une activité plus rapide et avec une rémanence d'au moins 60 min (Geller C. *et al.*, 2010). De ce fait, nous avons voulu le tester sur le PV-1 Lsc2ab. De plus, le C[4]S-BTZ n'avait montré aucune toxicité sur les cellules L-132 et sa rétention par les colonnes de Séphadex™ avait été prouvée par spectrophotométrie UV-visible (Résultats, 3.2.1 et 3.2.2, p.82). Nous avons pu évaluer l'activité ATS-D du C[4]S-BTZ sur le PV-1 Lsc2ab.

Les expériences ont été réalisées en triplicat avec le C[4]S-BTZ à  $10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> pour des temps de contact de 30 min et 60 min (Matériels et Méthodes, 2.6, p.68).

Les contrôles de non rétention du PV-1, de neutralisation du C[4]S-BTZ et de l'élimination de la cytotoxicité ont été inclus dans chaque expérience et les résultats sont consignés dans la Figure 21.



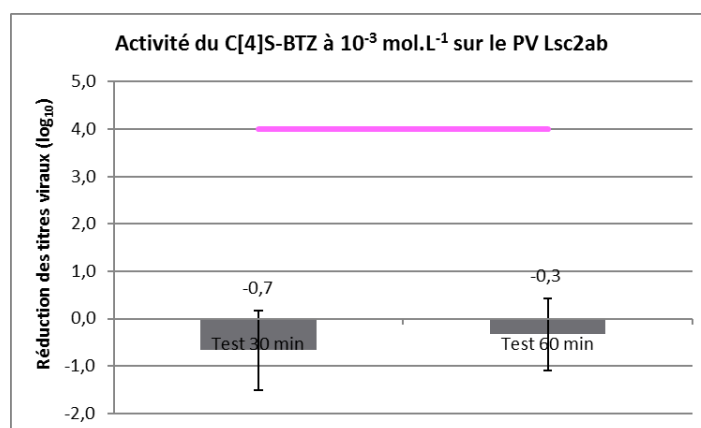
**Figure 21 : Validation des contrôles des tests d'ATS-D antivirale du C[4]S-BTZ sur le PV-1**

Sont représentés sur ces graphiques les titres viraux obtenus lors des contrôles effectués pour les tests d'ATS-D antivirale du C[4]S-BTZ sur le PV-1. Les témoins virus correspondent aux témoins virus sans filtration. Les lignes vertes représentent les seuils d'acceptabilité des contrôles pour la validité des tests (titre viral du témoin virus  $\pm 0,5 \log_{10}$ ). Les témoins virus 30 min et 60 min correspondent aux témoins virus après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-25 après 30 min et 60 min dans l'eau osmosée stérile, respectivement. Les témoins neutralisation correspondent à l'inoculation sur cellules L-132 des filtrats de solutions de C[4]S-BTZ à  $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  mélangés à la suspension virale.

Les différents contrôles ont été validés : les différences entre les titres viraux du témoin virus sans filtration et des différents contrôles étaient inférieures à  $0,5 \log_{10}$ . De plus, les contrôles de cytotoxicité n'ont montré aucune altération des tapis cellulaires.

L'évaluation de l'activité virucide du C[4]S-BTZ a présenté des résultats très décevants. En effet, à  $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , le C[4]S-BTZ a induit une réduction négative, soit finalement, une augmentation des titres viraux :  $0,7 \log_{10}$  pour 30 min de contact et  $0,3 \log_{10}$  pour 60 min de contact (Figure 22). Cependant, cette augmentation ne peut pas être considérée comme significative. Il pourrait être malgré tout intéressant de mieux comprendre ces résultats en allongeant le temps de contact par exemple pour voir si cette augmentation perdure et comprendre son mécanisme.

Du fait de ces résultats, nous n'avons pas poursuivi les travaux sur l'éventuelle activité ATS-D du C[4]S-BTZ sur le PV-1 Lsc12ab.



**Figure 22 : Activité du C[4]S-BTZ à  $10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> sur le PV-1 Lsc2ab**

Sont représentées sur ce graphique, les moyennes ( $n = 3$ ) des différences entre les titres viraux, exprimés en  $\log_{10}$ , entre les témoins virus 30 min et 60 min et les tests réalisés : C[4]S-BTZ à  $10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> + suspension virale diluée au 1/1000<sup>ème</sup> pendant 30 min ou 60 min puis filtration sur colonnes de Séphadex™ G-25 et enfin inoculation sur cellules L-132. La ligne rose représente le seuil de 4  $\log_{10}$  à atteindre pour pouvoir prétendre à une activité ATS-D antivirale selon la norme NF EN 14476+A1 (AFNOR, 2007).

## 6 Etudes préliminaires à l'évaluation de l'activité ATS-D antivirale de la Bétadine®

La PVP-I est une molécule ATS-D ayant montré une activité sur les virus nus et en particulier sur les PV (Bibliographie, 2.2.4.1, p.27). Il nous a alors paru intéressant de tester cette molécule grâce à notre protocole.

La PVP-I est commercialisée sous forme d'une solution complexe sous le nom de Bétadine® et est très largement utilisée que ce soit à l'hôpital ou dans la communauté.

Or nos colonnes de Séphadex™ n'ont pour l'instant été évaluées que pour la rétention de molécules simples. Il est donc primordial de tester leur efficacité sur des mélanges complexes.

Ainsi, afin de pouvoir évaluer précisément les TR de la PVP-I au sein de la Bétadine®, une première série d'expériences a été réalisée sur la PVP-I seule en solution aqueuse pour déterminer ses paramètres spectrophotométriques propres et les TR de cette molécule par les colonnes de Séphadex™ G-25. Une deuxième série d'expériences a ensuite été menée sur la Bétadine® afin de comparer les résultats obtenus entre la molécule seule et la molécule incluse dans une solution complexe.

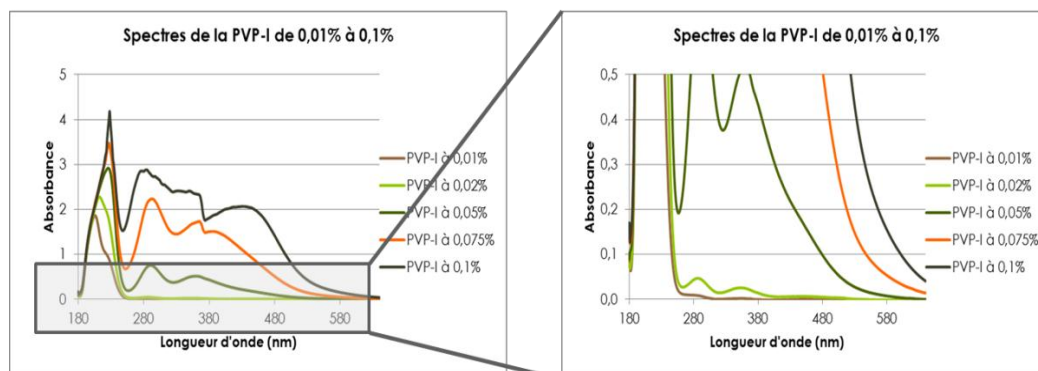
### 6.1 Analyse spectrophotométrique de la PVP-I en solution aqueuse

Le premier problème rencontré a été une très mauvaise solubilité de la PVP-I en solution aqueuse. En effet, la solution à 10% (concentration de la PVP-I au sein de la solution commerciale de Bétadine®, Matériels et Méthodes, 1.2, p.60) s'est avérée très épaisse et donc impossible à doser par spectrophotométrie UV-visible. Nous avons donc travaillé sur des solutions beaucoup plus diluées.

### 6.1.1 Spectres de la PVP-I

Nous avons réalisé différentes gammes de dilutions et établi leurs spectres d'absorption dans l'UV-visible (Matériels et Méthodes, 2.4, p.65).

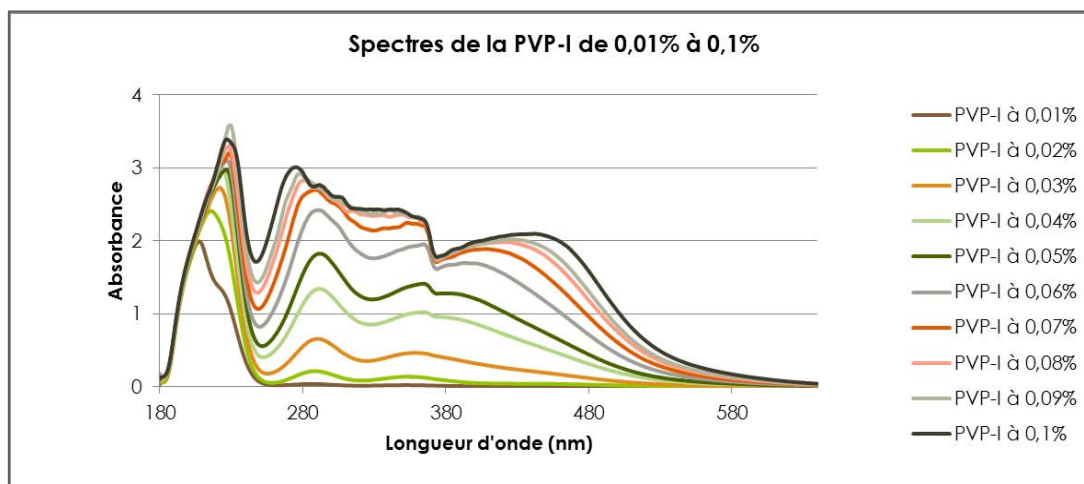
Des premiers essais ont permis d'établir les zones d'acceptabilité : gammes de concentrations de PVP-I pouvant être dosées par spectrophotométrie UV-visible en respect de la loi de Beer-Lambert (Équation 1). Nous avons pu ainsi observer qu'en-dessous de 0,02%, la PVP-I ne semblait plus présenter de pics d'absorption spécifiques et qu'au-dessus de 0,1%, la linéarité semblait être perdue (Figure 23).



**Figure 23 : Spectres de la PVP-I en solution aqueuse (1/2)**

Les spectres représentés dans cette figure correspondent aux spectres UV-visibles obtenus pour différentes concentrations de PVP-I (0,01%, 0,02%, 0,05%, 0,075% et 0,1%).

Nous avons donc préparé une nouvelle gamme de PVP-I (Figure 24), plus précise, de 0,01% à 0,1% pour établir les paramètres spectrophotométriques spécifiques de la PVP-I.



**Figure 24 : Spectres de la PVP-I en solution aqueuse (2/2)**

Les spectres représentés dans cette figure correspondent aux spectres UV-visibles obtenus pour des concentrations de PVP-I allant de 0,01% à 0,1% et d'intervalle 0,01%.



### 6.1.2 Etablissement des paramètres spectrophotométriques de la PVP-I

Les gammes réalisées précédemment ont permis l'établissement des caractères spectrophotométriques propres de la PVP-I (longueurs d'onde d'absorption maximum  $\lambda_{\max}$  et coefficients d'absorption massique  $\epsilon$ ).

Nous parlons de coefficient d'absorption massique et non de coefficient d'absorption molaire car la PVP-I étant un complexe organique, elle n'a pas de masse molaire définie précisément. Cependant, le coefficient d'absorption étant un rapport de proportionnalité entre l'absorbance et la concentration, il est théoriquement possible d'extrapoler le coefficient d'absorption molaire à un coefficient d'absorption en pourcentage massique répondant à l'équation  $\epsilon = A/l.c$ ,  $c$  étant exprimée en % (m/V) et  $\epsilon$  en  $L.cm^{-1}.g^{-1}$ .

Deux pics d'absorption maximum, un à 290 nm et un à 355 nm, ont été définis en faisant la moyenne de ceux obtenus pour chaque spectre. Pour chaque  $\lambda_{\max}$ , des analyses de régression  $A=f(c)$  ont été effectuées grâce au logiciel Statview®, pour définir les coefficients d'absorption massique spécifiques (Matériels et Méthodes, 2.4.2, p.66).

- **Analyse de régression de la PVP-I à 290 nm** (Annexe 2, p.127)

L'analyse de régression a été menée sur les moyennes des absorbances obtenues à 290 nm pour chaque concentration.

Nous avons ainsi pu déterminer que le coefficient d'absorption massique de la PVP-I à 290 nm est de  $35,14 L.cm^{-1}.g^{-1}$  avec un coefficient de détermination  $R^2$  de 0,973.

- **Analyse de régression de la PVP-I à 355 nm** (Annexe 2, p.127)

De la même façon, l'analyse de régression a été menée sur les moyennes des absorbances obtenues à 355 nm pour chaque concentration.

Nous avons ainsi pu déterminer que le coefficient d'absorption massique de la PVP-I à 355 nm est de  $28,637 L.cm^{-1}.g^{-1}$  avec un coefficient de détermination  $R^2$  de 0,989.

### 6.1.3 Taux de rétention de la PVP-I par les colonnes de Séphadex™ G-25

#### 6.1.3.1 Filtration de solutions de PVP-I et spectres obtenus

Les paramètres spectrophotométriques de la PVP-I établis, nous avons mesuré les TR de solutions de PVP-I en solution aqueuse à différentes concentrations (5%, 2% et 1%) ; la faible solubilité de la PVP-I dans l'eau nous ayant empêché de travailler à des concentrations plus élevées.

Ainsi, ces trois dilutions ont été filtrées sur colonnes de Séphadex™ G-25 (6 colonnes pour chaque concentration) et les filtrats ont été soumis à une analyse spectrophotométrique (Matériels et Méthodes, 2.4, p.65).

Comme cela est visible sur la Figure 25, la solution de PVP-I à 5% ne semble pas retenue (ou tout du moins pas entièrement retenue) par les colonnes de Séphadex™ G-25 (filtrat très foncé).

Les filtrats étaient donc trop concentrés pour être dosés par spectrophotométrie UV-visible et ont été dilués. Une dilution au  $1/10^{\text{ème}}$  étant insuffisante au regard de la gamme étalon de PVP-I, la dilution finale des filtrats des solutions à 5% a été de  $1/100^{\text{ème}}$ .

De la même façon, une rétention incomplète de la PVP-I a conduit à la dilution des filtrats des solutions à 2% (dilution au  $1/100^{\text{ème}}$ ) et à 1% (dilution au  $1/20^{\text{ème}}$ ). Les spectres obtenus sont représentés dans la Figure 26.



Figure 25 : Colonne de Séphadex™ G-25 après filtration d'une solution aqueuse de PVP-I à 5%

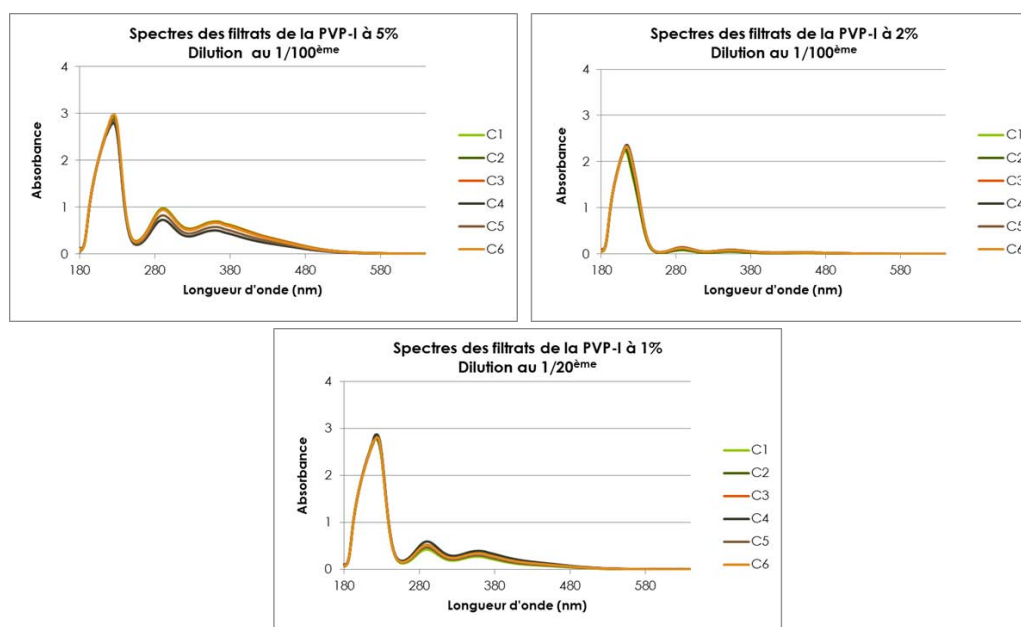


Figure 26 : Spectres des filtrats de solutions de PVP-I à 5%, 2% et 1%

Sont représentés sur ces graphiques, les spectres obtenus après filtration des solutions aux concentrations souhaitées (5%, 2% et 1%) et dilutions des filtrats, au  $1/100^{\text{ème}}$  pour les filtrats des solutions à 5% et à 2% et, au  $1/20^{\text{ème}}$  pour la solution à 1%. Pour chaque concentration, 6 colonnes ont été réalisées (C1 à C6).

#### 6.1.3.2 Estimation des TR de la PVP-I

Grâce à l'établissement des paramètres spectrophotométriques spécifiques et au logiciel XLStatistics®, nous avons établi les TR des différentes solutions de PVP-I par les colonnes de Séphadex™ G-25 à partir des valeurs extrapolées des spectres ci-dessus (Figure 26).

Comme le montre le Tableau 12, la PVP-I n'est retenue qu'à 50% environ pour les solutions à 5%. Les TR des solutions à 1% s'élèvent jusqu'à 70-76% selon la longueur d'onde. Les TR des solutions à 2%

sont plus élevés (85-88% environ). Cela provient peut-être du fait qu'une dilution au 1/100<sup>ème</sup> des filtrats était un peu forte, entraînant des absorbances faibles (0,070 – 0,122) et donc moins précises.

Tableau 12 : TR des solutions aqueuses de PVP-I à 5%, 2% et 1% (m/v)

Concentration de la solution filtrée (Ci)	5%		2%		1%	
Dilution	100		100		20	
$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	290	355	290	355	290	355
Absorbances	0,898	0,634	0,122	0,070	0,510	0,335
Concentrations estimées	0,026	0,022	0,03	0,02	0,015	0,012
Cf (concentration estimée / dilution)	2,56%	2,21%	0,35%	0,24%	0,29%	0,23%
TR	48,87%	55,72%	85,49%	88,31%	70,98%	76,63%
Ecart-type TR	5,62	5,37	1,62	1,45	3,25	2,90

Les TR ont été estimés grâce à l'Équation 2 :  $TR = (Ci - Cf)/Ci \times 100$  avec Ci, concentration initiale sans filtration en % (m/v) et Cf, concentration finale après filtration colonne de Séphadex™ G-25 en % (m/v). Les TR correspondent à la moyenne des résultats obtenus pour 6 colonnes, de même que les absorbances, les concentrations estimées et les Cf.

Ainsi, la PVP-I n'est pas entièrement retenue par notre modèle de colonnes de Séphadex™ G-25. Cela vient probablement d'un phénomène de surcharge des colonnes à forte concentration et d'autant plus dans le cas d'un complexe organique. Ceci avait déjà été observé lors d'expériences précédentes notamment avec la CHX (Résultats, 3.1.2, p.82) (Geller C., 2010).

## 6.2 Analyse spectrophotométrique de la Bétadine®

Ainsi, après avoir obtenu les résultats concernant la PVP-I seule, les mêmes expériences ont été menées sur la Bétadine®.

Nous avons choisi pour ces expériences la formulation de la Bétadine dermique à 10% (composition exacte indiquée dans Matériels et Méthodes, 1.2, p.60).

Du fait de cette composition, la solubilité est nettement améliorée en comparaison avec la PVP-I seule en solution aqueuse.

### 6.2.1 Spectres de la Bétadine®

Après avoir dilué la solution commerciale à 10% au 1/100<sup>ème</sup> dans de l'eau osmosée pour obtenir une solution à 0,1%, nous avons réalisé une gamme de concentrations de 0,01% à 0,1%. Cette gamme a ensuite été analysée par spectrophotométrie UV-visible.

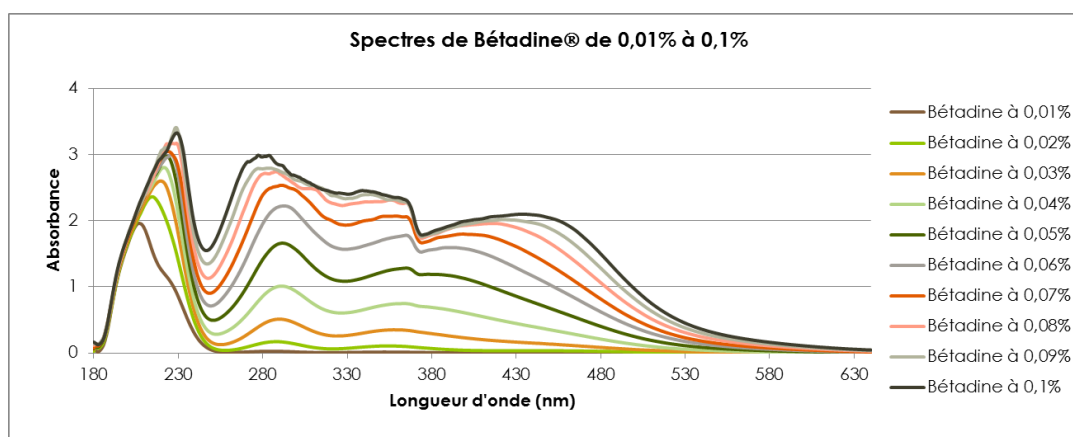


Figure 27 : Spectres d'absorption dans l'UV visible de la Bétadine®

Sont représentés sur ce graphique les spectres UV-visibles de chaque concentration (de 0,01% en 0,01%) d'une gamme de Bétadine de 0,01% à 0,1%

### 6.2.2 Etablissement des paramètres spectrophotométriques de la Bétadine®

Ainsi, comme nous l'avons effectué pour la PVP-I, les paramètres spectrophotométriques de la Bétadine® ont été extrapolés à partir des valeurs obtenues dans les spectres et sur lesquelles nous avons mené des analyses de régression. Cette expérience a été répétée deux fois.

Deux pics d'absorption maximum ont été mis en évidence. Ils se situent aux mêmes longueurs d'onde que ceux observés pour la PVP-I (290 nm et 355 nm), laissant suggérer que nous dosons bien la PVP-I au sein de ce mélange complexe. Cependant, des analyses complémentaires ont été nécessaires pour confirmer (ou infirmer) ce résultat.

- **Analyse de régression de la Bétadine® avec Statview® à 290 nm** (Annexe 2, p.127)

L'analyse de régression a été menée sur les moyennes des absorbances obtenues à 290 nm pour chaque concentration.

Nous avons ainsi pu déterminer que le coefficient d'absorption massique de la Bétadine® à 290 nm est de  $32,993 \text{ L.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$  avec un coefficient de détermination  $R^2$  de 0,967.

- **Analyse de régression de la Bétadine® avec Statview® à 355 nm** (Annexe 2, p.127)

L'analyse de régression a ensuite été menée sur les moyennes des absorbances obtenues à 355 nm pour chaque concentration.

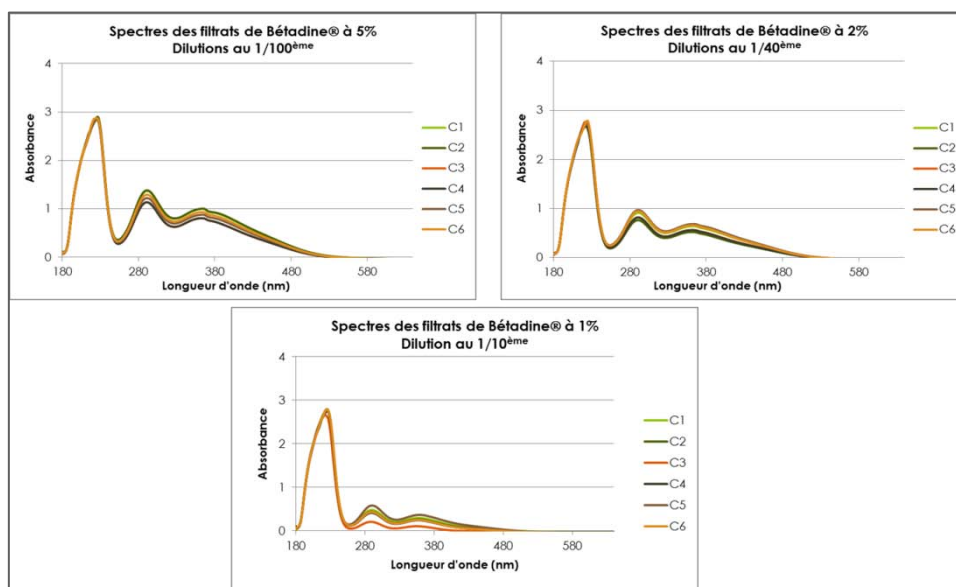
Nous avons ainsi pu déterminer que le coefficient d'absorption massique de la Bétadine® à 355 nm est de  $26,545 \text{ L.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$  avec un coefficient de détermination  $R^2$  de 0,979.

### 6.2.3 Taux de rétention de la Bétadine® par les colonnes de Séphadex™ G-25

Après avoir établi les paramètres spectrophotométriques permettant le dosage de la Bétadine®, nous avons estimé les TR de solutions de Bétadine®. Dans un but de comparaison, nous avons choisi les mêmes dilutions que dans le cas de la PVP-I (5%, 2% et 1%).

Les solutions diluées ont été préparées dans l'eau osmosée stérile puis filtrée sur colonnes de Séphadex™ G-25 (Matériels et Méthodes, 2.4.1, p.65), chaque concentration testée étant filtrée sur 6 colonnes. Les filtrats ont ensuite été soumis à analyse spectrophotométrique.

Cependant, comme pour la PVP-I, les filtrats étaient trop concentrés pour être dosés directement, ils ont donc été dilués dans l'eau osmosée stérile. Les filtrats des solutions à 5% ont été dilués au 1/100<sup>ème</sup>, ceux des solutions à 2% ont été dilués au 1/40<sup>ème</sup> et ceux des solutions à 1% ont été dilués au 1/10<sup>ème</sup>. Les spectres obtenus sont représentés dans la Figure 28.



**Figure 28 : Spectres des filtrats de solutions de Bétadine® à 5%, 2% et 1%**

Sont représentés sur ces graphiques, les spectres obtenus après filtration des solutions aux concentrations souhaitées (5%, 2% et 1%) et dilutions des filtrats, au 1/100<sup>ème</sup> pour les filtrats des solutions à 5%, au 1/40<sup>ème</sup> pour les filtrats à 2% et au 1/10<sup>ème</sup> pour les filtrats de la solution à 1%. Pour chaque concentration, 6 colonnes ont été réalisées (C1 à C6).

Grâce à l'établissement des paramètres spectrophotométriques spécifiques et au logiciel XLStatistics®, nous avons établi les TR des différentes dilutions de Bétadine® par les colonnes de Séphadex™ G-25. Les résultats sont consignés dans le Tableau 13.

**Tableau 13 : TR de la Bétadine® à 5%, 2% et 1% (m/v)**

Concentration de la solution filtrée (Ci)	5%		2%		1%	
Dilution	100		40		10	
$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	290	355	290	355	290	355
Absorbances	1,247	0,904	0,873	0,607	0,427	0,256
Concentrations estimée	0,038	0,034	0,026	0,023	0,013	0,010
Cf (concentration estimée x dilution)	3,78	3,41	1,06	0,91	0,13	0,10
TR	24,41%	31,89%	47,06%	54,30%	87,05%	90,36%
Ecart-type TR	5,96	6,72	4,99	4,92	3,72	3,22

Les taux de rétention (TR) ont été estimés grâce à l'Équation 2 :  $TR = (Ci - Cf) / Ci \times 100$  avec Ci, concentration initiale sans filtration en % (m/v) et Cf, concentration finale après filtration colonne de Séphadex™ G-25 en % (m/v). Les TR correspondent à la moyenne des résultats obtenus pour 6 colonnes. Il en est de même pour les absorbances, les concentrations estimées et les Cf.

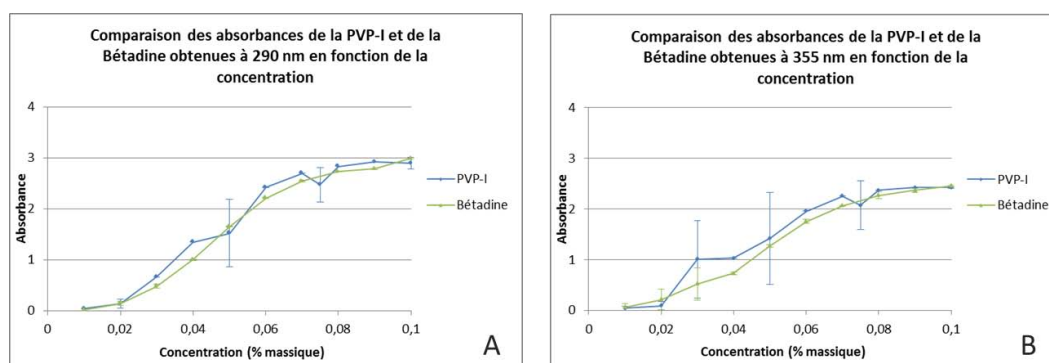
Nous pouvons observer que les TR de la Bétadine® à l'instar de la PVP-I sont incomplets (<100%) même pour les solutions à 1%. Il se produit certainement un phénomène de saturation des colonnes comme nous l'avons déjà évoqué pour la PVP-I.

### 6.3 Analyse statistique

Les résultats obtenus pour les paramètres spectrophotométriques de la PVP-I seule et de la Bétadine® étant très proches, avec des longueurs d'onde d'absorption maximum identiques, nous voulions confronter ces résultats pour s'assurer qu'il s'agissait bien de la PVP-I qui était dosée lors du dosage de la Bétadine® (Figure 29).

Nous avons pour cela comparé les droites de régression obtenues pour chaque molécule (comparaison des pentes, des coefficients d'absorption massique et des ordonnées à l'origine) (Matériels et Méthodes, 2.4.2, p.66). Dans notre cas, les ordonnées à l'origine étant nulles, nous n'avons pas eu besoin de les comparer. Les comparaisons doivent être effectuées pour chaque longueur d'onde d'absorption maximum.

Une telle analyse nécessite au préalable de s'assurer de l'homogénéité des variances par un test de Fisher-Snedecor suivie du calcul de la variance résiduelle commune. Un test de Student permet alors de réaliser la comparaison des coefficients d'absorption massique.



**Figure 29 : Comparaison des absorbances obtenues entre la PVP-I et la Bétadine®**

*Les courbes représentées sur ces graphiques représentent les moyennes des absorbances obtenues pour chaque concentration testée de PVP-I et de Bétadine® à 290 nm (en A) et à 355 nm (en B).*

#### 6.3.1 Comparaison des droites de régression entre la PVP-I et la Bétadine® à 290 nm

Dans un souci de lisibilité, la démarche et les calculs sont détaillés pour la comparaison des droites de régression à 290 nm mais pas à 355 nm, les étapes étant identiques.

Tableau 14 : Calculs préliminaires pour la comparaison de la PVP-I et de la Bétadine® à 290 nm

	Données extraites de	PVP-I		Bétadine®	
Caractéristique					
Taille des échantillons	Statview	$n_1$	7	$n_2$	7
Ordonnée à l'origine	Statview	$a_1$	0	$a_2$	0
Coefficient directeur	Statview	$b_1$	35,14	$b_2$	32,993
Coefficient de corrélation	Statview	$r_1$	0,986	$r_2$	0,984
Moyennes	Statview	$\bar{X}_1$	0,50	$\bar{X}_2$	0,50
Somme des carrés des écarts sur x (total)	Calculé sur Excel	$SCE_{1x}$	0,0015	$SCE_{2x}$	0,0015
Somme des carrés des écarts sur y (total)	Calculé sur Excel	$SCE_{1y}$	6,49	$SCE_{2y}$	6,27
Somme des carrés des écarts (résidus)	Statview	$SCE_{1r}$	0,697	$SCE_{2r}$	0,747
Ecart-type résiduel	Statview	$S_{1r}$	0,341	$S_{2r}$	0,353
Variance des résidus	Calculé sur Excel	$S^2_{1r}$	0,116281	$S^2_{2r}$	0,124609
Variance résiduelle commune	Calculé sur Excel	$S^2c = (SCE_{1r} + SCE_{2r}) / (n_1 + n_2 - 4)$		0,1444	

Note :

$$SCE_x = \sum (x_i - \bar{X}_1)^2$$

$$SCE_y = \sum (y_i - \bar{Y})^2$$

$$SCE_r = SCE_{tr} / (n^1 - 2)$$

Le coefficient de corrélation R est la racine carré du coefficient de détermination  $R^2$ .

#### Comparaison des variances résiduelles : Test de Fisher-Snedecor

La comparaison entre les coefficients des droites de régression ne peut se faire que si les variances résiduelles des deux séries ne sont pas significativement différentes l'une de l'autre. On réalise donc un test de Fisher-Snedecor sur  $s^2_1$  et  $s^2_2$ .

$$F_{\text{test}} = (\text{variance des résidus la plus forte}) / (\text{variance des résidus la plus faible})$$

$$F_{\text{test}} = s^2_{2r} / s^2_{1r} = 1,071619611$$

$$F_{\text{table}} = 5,05 \text{ pour } (v_1 = n_1 - 2 \text{ et } v_2 = n_2 - 2) \text{ degrés de liberté et au risque de 5\%}.$$

La valeur du test (1,07) est inférieure à la valeur de la table (5,05), on peut donc conclure que les variances des résidus ne sont pas significativement différentes ( $\alpha=5\%$ ) On peut donc procéder à la comparaison des deux droites de régression.

#### Calcul de la variance résiduelle commune

Si les deux variances résiduelles ne diffèrent pas de façon significative, on peut calculer la variance résiduelle commune aux deux séries.

$$s^2c = (SCE_{1r} + SCE_{2r}) / (n_1 + n_2 - 4)$$

$$s^2c = 0,1444$$

#### Test de Student sur les pentes (coefficients d'absorption)

$$T_{\text{test}} = \frac{b_1 - b_2}{\sqrt{s^2c \left[ \frac{1}{\sum (x_{1i} - \bar{x}_1)^2} + \frac{1}{\sum (x_{2i} - \bar{x}_2)^2} \right]}} = \frac{b_1 - b_2}{\sqrt{s^2c \left[ \frac{1}{SCE_{1x}} + \frac{1}{SCE_{2x}} \right]}} = 0,48930435 \text{ pour ddl} = n_1 + n_2 - 4 = 10 \text{ ddl}$$

Risque bilatéral donc  $0,5/2 = 0,025\%$

$$T_{\text{table}} = 2,228$$

$$- 2,228 < 0,489 < 2,228$$

La valeur  $T_{\text{test}}$  (0,489) est comprise entre les valeurs positives et négatives de la valeur  $T_{\text{table}}$  (- 2,228 et 2,228). On accepte donc l'hypothèse d'égalité des pentes des deux droites de régression ( $\alpha=5\%$ ).

### Test de comparaison des ordonnées à l'origine (test de Student)

Les ordonnées à l'origine étant nulles par définition, il n'est pas nécessaire de les comparer.

Les deux tests ayant conclu à l'égalité des pentes des deux droites de régression et des deux ordonnées à l'origine, nous pouvons conclure que les droites de régression de la PVP-I seule et de la Bétadine® à 290 nm sont similaires.

### 6.3.2 Comparaison des droites de régression entre la PVP-I et la Bétadine® à 355 nm

Tableau 15 : Calculs préliminaires pour la comparaison de la PVP-I et de la Bétadine® à 355 nm

	Données extraites de	PVP-I		Bétadine®	
Caractéristique					
Taille des échantillons	Statview	$n_1$	9	$n_2$	9
Ordonnée à l'origine	Statview	$a_1$	0	$a_2$	0
Coefficient directeur	Statview	$b_1$	28,637	$b_2$	26,545
Coefficient de corrélation	Statview	$r_1$	0,994	$r_2$	0,990
Moyennes	Statview	$\bar{X}_1$	0,057	$\bar{X}_2$	0,050
Somme des carrés des écarts sur x (total)	Calculée sur Excel	$SCE_{1x}$	0,0045555	$SCE_{2x}$	0,006
Somme des carrés des écarts sur y (total)	Calculée sur Excel	$SCE_{1y}$	4,73	$SCE_{2y}$	6,51
Somme des carrés des écarts (résidus)	Statview	$SCE_{1r}$	0,323	$SCE_{2r}$	0,426
Ecart-type résiduel	Statview	$S_{1r}$	0,201	$S_{2r}$	0,231
Variance des résidus	Calculée sur Excel	$S^2_{1r}$	0,040401	$S^2_{2r}$	0,053361
Variance résiduelle commune	Calculée sur Excel	$S^2_c = (SCE_{1r} + SCE_{2r}) / (n_1 + n_2 - 4)$		0,030857143	

### Comparaison des variances résiduelles : test de Fisher-Snedecor

$F_{\text{test}} = (\text{variance des résidus la plus forte}) / (\text{variance des résidus la plus faible})$

$$F_{\text{test}} = S^2_{2r} / S^2_{1r} = 1,320784139$$

$$F_{\text{table}} = 3,79$$

$$F_{\text{test}} (1,32) < F_{\text{table}} (3,79)$$

Les variances des résidus ne sont donc pas significativement différentes ( $\alpha=5\%$ ) On peut donc procéder à la comparaison des deux droites de régression.

### Calcul de la variance résiduelle commune

$$S^2_c = (SCE_{1r} + SCE_{2r}) / (n_1 + n_2 - 4) = 0,030857143$$

### Test sur les pentes (coefficients d'absorption) : test de Student



$$T_{test} = \frac{b_1 - b_2}{\sqrt{s^2 c \left[ \frac{1}{\sum (x_{1i} - \bar{x}_1)^2} + \frac{1}{\sum (x_{2i} - \bar{x}_2)^2} \right]}} = \frac{b_1 - b_2}{\sqrt{s^2 c \left[ \frac{1}{SCE_{1x}} + \frac{1}{SCE_{2x}} \right]}} =$$

$$T_{test} = 0,489304353$$

$$T_{table} = 2,145 \text{ (ddl} = n_1 + n_2 - 4 = 14, \text{ Risque bilatéral donc } 0,5/2 = 0,025\%)$$

$$-2,145 < T_{test} = 0,489304353 < 2,145$$

**L'hypothèse d'égalité des pentes des deux droites de régression est donc acceptée ( $\alpha = 5\%$ ).**

Les deux tests ayant conclu à l'égalité des pentes des deux droites de régression, nous pouvons conclure que les droites de régression de la PVP-I seule et de la Bétadine® à 355 nm sont similaires.

### 6.3.3 Conclusion sur la comparaison des droites de régression de la PVP-I et de la Bétadine®

Lors du dosage spectrophotométrique UV-visible de la Bétadine®, nous pouvons conclure au dosage de la PVP-I et donc estimer la rétention de cette molécule par les colonnes de Séphadex™ G-25.

### 6.3.4 Comparaison des taux de rétention de la PVP-I et de la Bétadine®

Ainsi, après avoir démontré statistiquement qu'il s'agissait bien de la PVP-I que l'on dosait lors des mesures spectrophotométriques de la Bétadine®, nous avons mené des études de comparaisons des TR entre la PVP-I en solution aqueuse et la PVP-I dans une formulation complexe, la Bétadine®.

Nous avons détaillé ci-dessous les différentes étapes ayant permis d'établir cette comparaison (Matériel et Méthodes, 2.4.2, p.66). Le principe général repose sur la réalisation d'un test de Student sur les moyennes des TR obtenus de façon bilatérale puis unilatérale pour conclure à la présence, ou non, d'une différence significative entre ces TR et ce, après avoir vérifié l'homogénéité des variances par un test de Fisher-Snedecor.

Le test de Student bilatéral permet de savoir s'il existe une différence significative, ou non, entre les moyennes des TR et le test unilatéral permet de savoir si l'une est supérieure à l'autre de façon significative. Ce test est un test suffisamment robuste pour permettre la comparaison des petits échantillons.

#### **Homogénéité des variances : Test de Fisher-Snedecor (Tableau 16)**

$F_{test} = (\text{variance des résidus la plus forte}) / (\text{variance des résidus la plus faible})$  avec ( $v_1 = n_1 - 1$  et  $v_2 = n_2 - 1$ ) degrés de liberté et au risque de 5%.

Comme  $F_{test} < F_{table}$ , nous pouvons conclure à l'homogénéité des variances.

#### **Estimation de la variance commune aux 2 échantillons (Tableau 16)**

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

**Estimation de l'écart-type sd de la différence entre les moyennes des TR obtenues (Tableau 16)**

$$s_d = \sqrt{\frac{s^2}{n_1} + \frac{s^2}{n_2}}$$

**Test de Student (Tableau 16)**

$$T_{test} = \frac{|m_1 - m_2|}{s_d} \text{ avec } n_1 + n_2 - 2 = 10 \text{ degrés de liberté}$$

$m_1$  : moyenne des TR de Bétadine® et  $m_2$  : moyenne des TR de la PVP-I

Toutes les valeurs  $T_{test} > T_{table}$  (bilatérale) :  $m_1$  diffère significativement de  $m_2$ .

Toutes les valeurs  $T_{test} > T_{table}$  (unilatérale) :  $m_1$  est significativement inférieure à  $m_2$ .

**Tableau 16 : Comparaison des TR de la PVP-I et de la Bétadine®**

	Solutions à 5%		Solutions à 2%		Solutions à 1%		F <sub>table</sub> : 5,05
	290 nm	355 nm	290 nm	355 nm	290 nm	355 nm	
F <sub>Test</sub>	1,12	1,57	1,79	2,50	1,31	1,23	
s <sup>2</sup>	33,57	37,00	19,43	16,97	12,19	9,38	
s <sub>d</sub>	3,34	3,51	2,54	2,38	2,02	1,77	
T <sub>Test</sub>	7,31	6,78	15,10	14,30	7,97	7,76	T <sub>table</sub> test bilatéral 2,228 T <sub>table</sub> test unilatéral 1,812

Les TR de la PVP-I seule et de la Bétadine® par les colonnes de Séphadex™ G-25 diffèrent significativement.

La PVP-I contenue dans la Bétadine®, certainement à cause de sa formulation plus complexe, présente des TR plus faibles que la PVP-I seule en solution aqueuse. Cela n'est guère étonnant à la vue des résultats précédents. En effet, les composants de la Bétadine®, même s'ils ne sont pas dosés, doivent participer au phénomène de saturation des colonnes.

## DISCUSSION

### 1 Activités (ATS-D ?) antivirales de la CHX et du C[4]S-BTZ sur le PV-1

En réponse à l'un de nos objectifs, nous avons validé le protocole de référence sur un virus nu, le PV-1.

Nous avons ainsi établi que ce virus n'était pas retenu par les colonnes de Séphadex™, que ce soit par les colonnes de Séphadex™ G-10 et G-25 et que ce traitement n'influit pas sur l'infectivité virale (Résultats, 2, p.76).

Ceci nous a permis de conclure dans un premier temps sur l'aspect fonctionnel du protocole de référence lorsqu'il est extrapolé à d'autres virus. Des essais sont encore nécessaires avec d'autres virus mais ces résultats sont très encourageants.

Nous avons alors évalué l'activité de la CHX et du C[4]S-BTZ sur le PV-1.

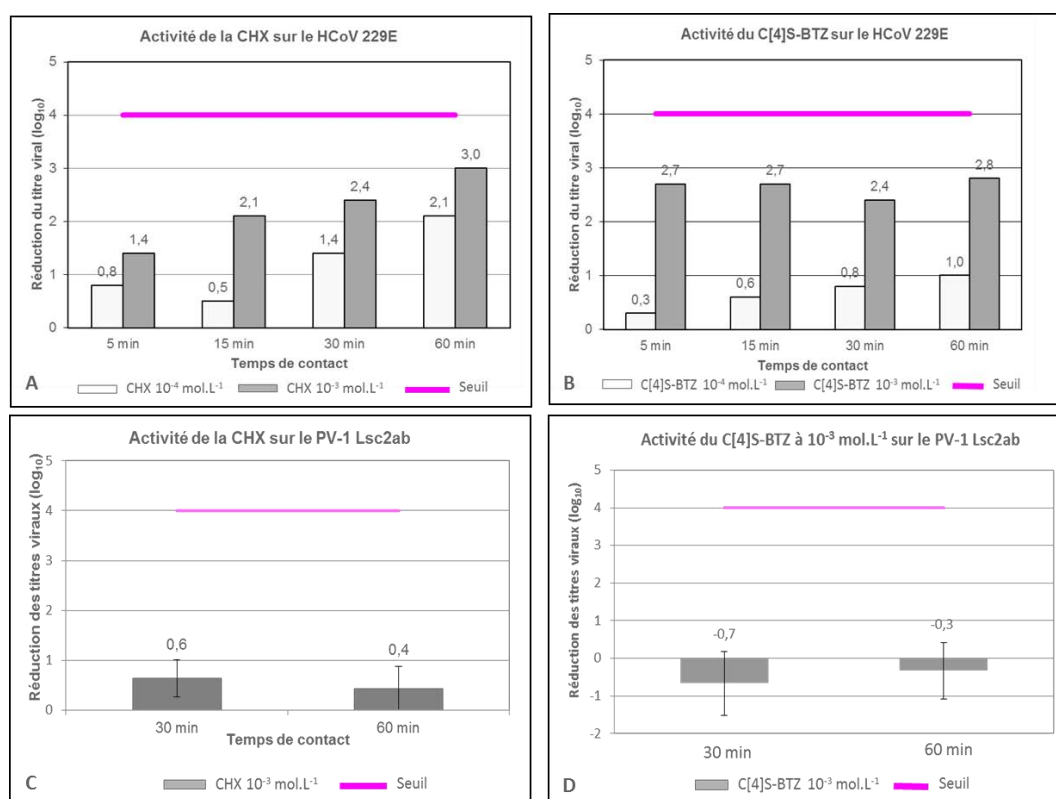


Figure 30 : Activités de la CHX et du C[4]S-BTZ sur le HCoV 229E et sur le PV-1

### 1.1 Activité ATS-D antivirale de la CHX

La CHX a été choisie comme molécule de référence en rapport avec les travaux effectués précédemment sur le HCoV 229E.

Bien qu'elle ait démontré une activité antivirale sur ce virus enveloppé (réduction de 3 log<sub>10</sub> en 60 min et à 10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup>), elle n'avait pas atteint le seuil des 4 log<sub>10</sub> (Figure 30A). Elle ne pouvait donc pas, dans les conditions de l'essai, prétendre à une réelle activité ATS-D sur le HCoV 229E.

Les résultats obtenus avec le PV-1 sont beaucoup moins probants puisqu'en 60 min, la réduction dans les titres viraux n'était de 0,4 log<sub>10</sub>, donc très du loin du seuil d'activité ATS-D (Figure 30C).

Ces résultats ne sont pas surprenants puisque cette molécule est connue pour être inactive sur les virus nus et en particulier sur le PV-1 (Bibliographie, 2.2.1, p.24).

Ainsi cette molécule, bien que très largement utilisée en médecine humaine, doit être utilisée avec une certaine précaution selon les risques infectieux en présence.

### 1.2 Activité antivirale (ATS-D) du C[4]S-BTZ

#### Une activité antivirale dirigée contre les virus enveloppés

De façon très décevante mais non totalement surprenante, le C[4]S-BTZ n'a pas non plus montré d'activité sur le PV-1.

Il avait auparavant montré une activité très prometteuse sur le HCoV 229E (Figure 30B). En effet, comme nous l'avons déjà évoqué au cours de cet exposé, son efficacité était comparable à celle de la CHX sur le HCoV 229E mais plus rapide et avec un effet rémanent (pas de perte d'activité en 60 min). De plus, et contrairement à la CHX, cette molécule n'avait montré aucune cytotoxicité sur les cellules L-132, pour des temps de contact allant jusqu'à 168 h et des concentrations de 10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup> (Résultats, 3.2.1, p82). Ces résultats sont cohérents avec des travaux précédemment menés sur cette molécule au sein de notre équipe (Psychogios N., 2003, Mourer M. *et al.*, 2010).

Nous avons donc souhaité évaluer son activité sur un virus nu. Cette dernière s'est finalement révélée nulle voire négative, 0,3 log<sub>10</sub> en 60 min à 10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup> (Figure 30D).

Des études antérieures avaient montré des résultats similaires.

Le C[4]S-BTZ montrait effectivement une activité antivirale intéressante sur des virus enveloppés comme le HSV-1 et 2 (avec des CI<sub>50</sub> de l'ordre de 2.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup>) mais son activité à l'égard du PV-2 s'est avérée très faible, nécessitant des concentrations cinquante fois plus élevées que dans le cas des HSV (Psychogios N., 2003).

Son activité à l'égard du VIH était la plus intéressante puisque la CI<sub>50</sub> du C[4]S-BTZ sur ce virus est de 1,6.10<sup>-6</sup> mol.L<sup>-1</sup>, même si cette dernière restait inférieure à celle de la zidovudine (CI<sub>50</sub> de 0,01.10<sup>-6</sup> mol.L<sup>-1</sup>) (Mourer M. *et al.*, 2010).

Au cours des travaux de recherche du Doctorat d'Université, nous avons testé un autre calixarène, le C[4]S, équivalent non bithiazolé du C[4]S-BTZ. Son activité s'était révélée très faible sur le HCoV 229E

avec seulement 0,6 log<sub>10</sub> de réduction en 60 min et à 10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup>, mettant alors en exergue le rôle fondamental des groupements bithiazolés.

Nous avons alors songé à une activité virucide liée à une interaction de ces groupements avec l'enveloppe virale. Les calixarènes sont en effet supposés interagir avec les charges ioniques des membranes virales (Hwang K. *et al.*, 1992, Hwang K.M. *et al.*, 1994). Son inefficacité sur un virus nu comme le PV-1, semble aller dans ce sens.

### **Des interactions avec les membranes lipidiques**

Les interactions probables du C[4]S-BTZ avec les membranes lipidiques peuvent être à l'origine d'autres phénomènes.

Il se produit en effet une très légère augmentation du titre viral. Est-ce que cette augmentation peut être considérée comme significative ?

L'exemple du macrocyclon a illustré des phénomènes pouvant être corrélés avec cette augmentation (Bibliographie, 4.2.2, p.56). En effet, selon la longueur des chaînes polyoxyéthyléniques, ces composés pouvaient avoir un effet pro-tuberculeux ou anti-tuberculeux. Il avait été alors montré une interaction parallèle avec la lipase et le métabolisme des acides gras.

Une interaction de ce type semble peu probable directement sur des virus nus comme le PV-1 mais elle pourrait avoir lieu avec la cellule hôte modifiant par là même les possibilités d'infection par le virus. Nous avons observé lors de quelques expériences de viabilité du C[4]S-BTZ une augmentation de la viabilité cellulaire (à 110% environ) à 10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> et 48 h d'incubation. Des résultats similaires avaient été observés avec le C[4]S. Cependant, ces résultats n'ayant pas été obtenus de façon reproductible et n'avaient pas été publiés.

Peut-être que ces deux observations, légère augmentation du titre viral et de la viabilité cellulaire sont-elles corrélées ?

A l'heure actuelle rien ne permet de l'affirmer mais des efforts de recherche en ce sens pourraient être intéressants et permettre une meilleure compréhension du mécanisme d'action du C[4]SBTZ.

### **Un mécanisme d'action à approfondir**

Afin de mieux comprendre ce mécanisme d'action, différentes perspectives sont envisageables :

- la microscopie électronique permettant une visualisation directe de l'enveloppe virale et d'une possible interaction avec le C[4]S-BTZ (désorganisation membranaire par exemple),
- des essais de compétition avec des anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines d'enveloppe du HCoV 229E,
- des essais comparés sur d'autres HCoV,
- des essais sur des virus enveloppés autres que les HCoV.

De plus, dans le cadre de l'ATS-D, il est primordial que le composé testé soit actif sur différents microorganismes, même si le spectre microbicide n'est pas complet.

Par ailleurs, il serait intéressant, considérant la cinétique d'action du C[4]S-BTZ, de le coupler, par exemple, à l'éthanol à 70%. En effet, ce dernier possède une assez bonne activité antivirale, sur les virus enveloppés et sur les virus nus (Bibliographie, 2.2.3, p.27) et un mode d'action rapide. Cependant, l'éthanol étant très volatil, l'association avec le C[4]S-BTZ, pourrait être avantageuse. De

plus, il pourrait se produire une synergie d'action entre ces deux composés agissant sur les membranes lipidiques.

Malgré son absence d'efficacité sur le PV-1, la famille des calixarènes apparaît donc très prometteuse dans le domaine de l'ATS-D antivirale et plus généralement dans le domaine de la médecine humaine.

## 2 Vers la neutralisation de solutions complexes ?

### **Une rétention certes incomplète mais qu'en-est-il de la neutralisation ?**

Les travaux préliminaires quant à la rétention de molécules complexes menés sur la Bétadine® montrent tout d'abord que, dans les conditions testées, les solutions ne sont qu'incomplètement retenues.

Cela conforte l'hypothèse de surcharge des colonnes. A l'heure de la rédaction de ce manuscrit, seules des études physico-chimiques et statistiques ont été réalisées.

Peut-être ce problème serait-il résolu par l'utilisation de colonnes plus grandes, mais une telle modification impliquerait des échantillons de plus grand volume et donc des inocula viraux plus importants.

Cependant, des tests supplémentaires sont nécessaires pour conclure à une mauvaise rétention et donc à une mauvaise neutralisation. En effet, le but de la neutralisation est d'éliminer la potentielle cytotoxicité du produit testé ainsi que son éventuelle activité antivirale. Il sera donc nécessaire de procéder à des tests d'ATS-D antivirale à proprement parler sur ces solutions. Des tests de cytotoxicité au MTT et au RN sont peu envisageables en regard de la coloration des solutions de PVP-I et de Bétadine® ainsi que de leur filtrat. Cependant, d'autres tests mesurant la viabilité cellulaire comme les tests basés sur la luminescence et l'évaluation de la production d'ATP pourraient être une alternative intéressante.

Par ailleurs, il s'était avéré que les colonnes n'étaient pas capables de retenir toutes les molécules, notamment les plus petites comme le glutaraldéhyde (Geller C., 2010) et par extrapolation des molécules telles que l'éthanol ou l'hypochlorite de sodium. Or l'éthanol, par exemple, est utilisé très fréquemment, que ce soit seul ou en adjuvant d'autres molécules, pour son action propre et/ou pour une synergie d'action.

### **Une méthode universelle ?**

Comme nous l'avons souligné au cours des travaux précédents, il ne peut exister de technique de neutralisation universelle.

La dilution, méthode recommandée en première intention par la norme NF EN 14476+A1, est efficace dans un nombre très restreint de cas (composés ou mélanges de composés peu cytotoxiques) et induit une dilution importante de l'inoculum viral, ce qui nécessite d'avoir des titres viraux très élevés.

La neutralisation chimique présente l'avantage indéniable, comme le fait d'ailleurs la méthode par dilution, de garantir le temps de contact de façon très précise par l'arrêt théoriquement instantané

de l'activité du produit. Cependant, la diversité chimique des ATS-D exclut l'existence d'un neutralisant chimique universel. En outre, lors de l'utilisation de cette méthode, il faut absolument s'assurer de la non toxicité du neutralisant chimique et de l'association ATS-D testé/neutralisant ainsi que de l'absence d'interférence sur l'infectivité du virus.

Certaines normes, comme la norme NF EN 13610 applicable pour les secteurs agro-alimentaire et industriel (AFNOR, 2003), proposent l'utilisation d'un neutralisant approprié. La norme NF EN 14476+A1 ne suggère pas, quant à elle, l'emploi de la méthode par neutralisation chimique.

La combinaison de différentes techniques apparaît alors comme une solution très intéressante avec par exemple, une neutralisation chimique stoppant à un temps  $t$  l'activité du produit suivie d'une méthode par filtration, pour éliminer la toxicité résiduelle. Ce couplage est d'ailleurs proposé par certaines normes ou certains auteurs.

Par exemple, la norme Américaine E1482-04, norme décrivant les méthodes de neutralisation utilisables dans les tests d'ATS-D antivirale, propose de combiner la méthode de filtration sur gel à la méthode de neutralisation chimique, si l'une ou l'autre méthode est insuffisante (ASTM, 2004). D'autres auteurs ont couplé dilution et filtration sur gel ou encore dilution et filtration sur membrane, pour éliminer la cytotoxicité des composés testés (Rabenau H.F. *et al.*, 2005, Dellanno C. *et al.*, 2009).

Il faut ainsi selon les produits testés, et le modèle cellules/virus, trouver la meilleure combinaison possible.

### 3 Importance du choix de la souche virale lors des tests d'ATS antivirale

L'évaluation de l'activité ATS-D, qu'elle soit antivirale ou dirigée contre d'autres microorganismes, est basée sur les résultats obtenus avec un petit nombre de souches. Ces résultats étant destinés à être extrapolés à un nombre beaucoup plus large de microorganismes, il est primordial de choisir les souches concernées en respect, notamment, de la future utilisation du produit testé ; le risque majeur encouru étant un échec de la désinfection en pratique.

Les principales normes, qu'elles soient Européennes ou Américaines, proposent différentes souches selon la finalité des essais. Cependant, la pondération des critères pris en compte diffère selon le continent.

#### 3.1 Critères de choix

Afin de répondre le plus justement possible aux conditions réelles d'utilisation des ATS-D, le choix des souches virales doit répondre à un certain nombre d'impératifs.

Afin de permettre une extrapolation des résultats, les modèles viraux doivent être représentatifs de différentes familles de virus et notamment des virus enveloppés.

Le virus choisi doit être résistant à la désinfection chimique mais choisir des virus très résistants peut induire l'élimination d'ATS-D qui pourraient être efficaces à l'égard d'un certain nombre de virus plus fragiles (enveloppés par exemple) et rencontrés dans un environnement hospitalier. La norme NF EN 14476+A1 ne propose que des virus nus.

L'ATS-D étant employée comme mesure préventive notamment dans la désinfection d'instruments chirurgicaux, les modèles viraux doivent être pertinents par rapport au degré de contamination et à la nature des virus pouvant contaminer ces-dits instruments (ou surfaces). Ceci nécessite une bonne connaissance de l'épidémiologie virale au sein des établissements de soins.

Le modèle viral doit également être pertinent quant à son pouvoir pathogène chez l'homme.

Les souches virales utilisées comme modèles doivent être stables dans le temps et en culture cellulaire, et supporter un nombre de passages conséquent.

Il faut de plus pouvoir les multiplier à des titres suffisamment élevés afin de pouvoir observer la diminution de 4  $\log_{10}$  imposée par la norme NF EN 14476+A1 en cas d'efficacité de l'agent chimique testé. Les normes Américaines imposent, quant à elles, une réduction de 3  $\log_{10}$  pour prétendre à une activité ATS-D antivirale.

### Critères de choix

Selon Sattar et coll., idéalement, les souches virales choisies comme modèles devraient :

- (i) Appartenir à un groupe de virus connu pour engendrer l'apparition de pathologies voire d'épidémies au sein de structures institutionnelles,
- (ii) Permettre l'obtention de titres élevés en culture cellulaire et le nombre de particules infectieuses doit pouvoir être évalué par une méthode comme le titrage en dilution limite ou par plages de lyse,
- (iii) Survivre dans différentes conditions environnementales, comme sur les surfaces inertes ou les mains, et que cela soit prouvé,
- (iv) Ne pas nécessiter de niveau de confinement élevé et ne pas engendrer de risques pour le manipulateur (Sattar S.A. *et al.*, 1989, Sattar S.A. *et al.*, 2003).

Le choix des souches testées doit également répondre à la finalité du test : Ces souches doivent-elles correspondre à une flore normale ou alors seules certaines souches, de résistance particulière ou engendrant un risque précis dans un environnement particulier, doivent être visées?

### Taille de l'inoculum

La taille de l'inoculum doit être suffisante pour observer la réduction de titre infectieux nécessaire, et valider le critère d'efficacité. Elle doit cependant rester représentative des conditions réelles, sachant que certains virus ne pourront pas être obtenus à des titres très élevés.

La norme Européenne NF EN 14476+A1 conseille un titre minimum de  $10^8$  particules infectieuses.mL<sup>-1</sup> (AFNOR, 2007). Les normes Américaines recommandent, quant à elles, des titres d'environ  $10^6$  particules infectieuses.mL<sup>-1</sup> pour les tests en suspension et des titres de  $10^7$  à  $10^8$  particules infectieuses.mL<sup>-1</sup> pour les tests sur support (ASTM, 1996, 1997).

Par ailleurs, la limite de détection de la méthode de titrage viral est aussi à prendre en compte dans la définition de la taille de l'inoculum.

Par exemple, par la méthode de titrage en dilutions limites, la limite de détection du PV-1 Lsc2ab, obtenue au cours de notre étude (Matériels et Méthodes, 2.3, p.62) est de  $5.10^4$  particules infectieuses.mL<sup>-1</sup>, soit 4,7  $\log_{10}$ . Il est donc nécessaire que les titres viraux soit au



moins égaux à  $8,7 \log_{10}$ , soit  $5.10^8$  particules infectieuses.mL<sup>-1</sup>, ce qui est légèrement inférieur aux titres de PV-1 obtenus en moyenne ( $10^9$  particules infectieuses.mL<sup>-1</sup>), pour pouvoir visualiser, si nécessaire, une diminution  $\geq 4 \log_{10}$ .

### 3.2 Quels sont les recommandations officielles ?

Un certain nombre de virus qu'ils soient nus ou enveloppés répondent aux critères définis précédemment. Mais quel serait le meilleur modèle viral en considérant l'utilisation souhaitée du produit testé ?

En effet, les conséquences d'un choix de souches tests mal adapté peuvent avoir de désastreuses conséquences. Par exemple, si des virus trop sensibles sont choisis comme seules souches tests, des virus plus résistants peuvent alors être sélectionnés, survivre et être transmis à d'autres individus. Cependant, si seules des souches virales très résistantes sont choisies pour évaluer l'activité ATS-D d'agents chimiques, certes la désinfection aboutira dans la plupart des cas, mais une telle approche accroît le coût de la désinfection mais aussi les risques pour l'environnement et pour l'usager.

La norme NF EN 14476+A1 ne recommande que l'utilisation de souches virales nues et distingue les potentielles utilisations du produit testé. Pour la désinfection de surfaces et d'instruments ainsi que pour le lavage et l'imprégnation hygiénique des mains, deux virus sont recommandés, le PV-1, souche LSc-2ab et l'AdV-5. Pour la désinfection chimiothermique, il est recommandé d'utiliser le parvovirus bovin (Tableau 4, p.41). Cependant, cette norme propose, en annexe, une liste de virus, non exhaustive, pouvant contaminer les instruments utilisés en médecine humaine, les mains et/ou les surfaces. Cette liste comporte également des virus enveloppés comme le HCoV 229E.

Les normes Américaines, que ce soit celle pour l'évaluation de l'activité ATS-D antivirale par des tests en suspension (ASTM, 1996) ou par des tests sur support inanimé (ASTM, 1997) proposent des souches virales nues et enveloppées. Trois virus sont suggérés en premier lieu, selon leurs comportements vis-à-vis des agents chimiques testés, le PV-1 pour représenter les virus les plus résistants, un herpesvirus, pour les plus facilement inactivés et un AdV, de résistance intermédiaire. Elles proposent également d'autres types viraux, en suggérant les lignées cellulaires pour les cultiver (VHA, CMV, VRS, etc.). Ces normes précisent que, compte tenu du nombre de nouveaux virus découverts et de l'amélioration des techniques de culture et d'isolement, il ne s'agit que de suggestions. D'autres souches peuvent ainsi être utilisées selon les objectifs du produit testé.

### 3.3 HCoV 229E vs. PV-1 Lsc2ab ? Atouts et limites

#### **Pourquoi le PV-1 comme virus modèle pour toutes les normes d'évaluation de l'activité ATS-D antivirale ?**

Historiquement, ce virus a en effet été l'un des plus étudiés et a permis le développement de nombreuses techniques virologiques (Bibliographie, 3.2, p.43).

Le PV-1 a ensuite été très largement utilisé dans les tests d'ATS-D antivirale pour sa résistance élevée aux produits chimiques, sa stabilité par rapport aux acides, aux solvants des lipides et à la plupart des détergents.

Un autre avantage certain de ce virus ayant favorisé son utilisation est qu'il peut être obtenu à des titres élevés d'au moins  $10^9$  particules infectieuses.mL<sup>-1</sup>. Ceci permet d'utiliser et/ou de coupler différentes méthodes de neutralisation selon l'agent chimique testé, notamment la dilution et/ou la neutralisation chimique. Ce titre viral permet aussi d'atteindre les seuils recommandés par les normes si l'agent testé s'avère efficace.

Cependant, malgré une grande résistance aux agents chimiques, sa survie dans l'environnement et dans différentes conditions, notamment d'humidité, est très variable et souvent moins bonne que celle d'autres virus entériques comme le VHA ou le rotavirus (Bibliographie, 3.7, p.51).

Un autre problème évident est son implication en pathologie humaine. En effet, bien qu'il soit encore endémique dans quatre pays et qu'il existe quelques cas d'importation, ce virus ne circule plus notamment en Europe grâce au programme d'éradication de la poliomyélite (Bibliographie, 3.6, p.48). L'inclure dans les tests d'évaluation de l'efficacité d'ATS-D chimique utilisés dans cette région du monde a-t-elle une réelle signification pratique ?

De plus, l'existence de souches vaccinales mutantes et neurovirulentes (Bibliographie, 3.6.2.1, p.49) pouvant induire une PPAV ne pourrait-elle pas engendrer un risque pour le manipulateur et l'environnement ?

Enfin, cette résistance importante aux agents chimiques entraîne que seules quelques molécules vont être actives sur ce virus et donc très peu seront retenues. De plus, ces dernières montreront très souvent une toxicité accrue, soit par l'utilisation de concentrations élevées, soit par une toxicité intrinsèque.

C'est l'exemple typique du C[4]S-BTZ. En effet, si ce dernier n'avait été testé que sur le PV-1, sa très bonne activité sur les virus enveloppés comme le HCoV 229E et sa non cytotoxicité n'auraient pas été révélées.

Il est ainsi fondamental d'inclure des virus représentant différentes familles et notamment des virus enveloppés, pour ne pas écarter maladroitement des molécules à fort potentiel.

#### **Pourquoi le HCoV 229E comme modèle d'étude ?**

Le choix de ce virus a été largement discuté au cours du Doctorat d'Université et seuls les éléments fondamentaux sont retranscrits ci-dessous (Geller C., 2010).

Le HCoV 229E avait tout d'abord été choisi pour son implication en médecine humaine, où son rôle dans des IR hautes et basses ainsi que dans des ILS, a été reconnu.

La capacité de survie des HCoV, bien qu'ils soient des virus enveloppés, a été démontrée dans différentes conditions environnementales (en suspension, après séchage ou encore dans les fluides biologiques). Quoique leur transfert à partir de surfaces contaminées, animées ou inanimées, n'ait pas été formellement démontré, cette capacité de résistance suggère sans conteste son éventualité.

Considérant alors l'absence de traitement spécifique et efficace à l'encontre de ce virus, l'évaluation de l'activité des ATS-D à leur égard s'était révélée nécessaire et pertinente. De plus, les coronavirus sont proposés comme virus d'étude en annexe de la norme NF EN 14476+A1.

Pour ces différentes raisons, le HCoV 229E nous était alors apparu comme un modèle d'étude judicieux pour évaluer l'efficacité du protocole de référence en cours d'élaboration.

### 3.4 Autres modèles viraux ?

Un certain nombre d'autres virus, qu'ils soient nus ou enveloppés, peuvent répondre aux critères de choix et seraient certainement tout aussi pertinents, selon la finalité des essais, que le PV-1.

#### 3.4.1 Virus nus

##### **Adénovirus**

Parmi les virus nus, l'AdV est un virus de choix. Ce dernier est d'ailleurs déjà intégré dans les différentes normes Européennes et Américaines. Les AdV sont responsables d'infections (oculaires, respiratoires et gastro-intestinales fréquentes, en général bénignes, sauf dans le cas de patients immunodéprimés où la morbidité/mortalité est beaucoup plus élevée (Bibliographie, 1.1.2, p.16). Ils montrent une sensibilité variable aux agents chimiques selon les géotypes peut-être à cause des variations dans la composition de la capsid (Sauerbrei A. *et al.*, 2004). En général, ils sont considérés comme des virus de résistance intermédiaire aux ATS-D. Leur résistance à la dessiccation et à l'humidité est très voisine de celle du PV et très nettement inférieure à celle du VHA et du rotavirus.

##### **VHA**

Un autre picornavirus comme le VHA, appartenant également au genre *Enterovirus* résiste assez bien au séchage et aux dommages mécaniques et fait partie des virus les plus résistants aux ATS-D. Il est, de plus, connu pour se propager par contact avec des matières fécales, les aliments et l'eau contaminés ou encore les objets souillés. Il est plutôt résistant à l'action des ATS-D et sa survie dans l'environnement a été démontrée (Mbithi J.N. *et al.*, 1990, Mbithi J.N. *et al.*, 1992).

Cependant, ce virus ne circule quasiment plus dans nos régions, mis à part quelques petites épidémies sporadiques et il n'apparaît peut-être pas judicieux de l'introduire dans des tests pour deux raisons : (i) il pourrait représenter un risque pour l'environnement et le manipulateur (sauf en cas de vaccination des manipulateurs) et (ii) ce virus ne circulant pratiquement plus en Europe ou en Amérique du Nord, l'intérêt d'évaluer l'activité d'ATS-D à son égard paraît limité.

Cependant, dans le cadre de l'usage d'ATS-D dans les zones de haute endémicité comme l'Afrique subsaharienne ou le Moyen-Orient, le VHA comme modèle d'étude prend alors tout son sens. Ceci souligne le fait, fondamental, que les essais doivent être réalisés en vue d'une finalité précise.

##### **Norovirus**

Les norovirus pourraient également être un modèle intéressant dans la mesure où ils ont impliqués dans un grand nombre d'épidémies de gastro-entérites, tant nosocomiales que communautaires (Bibliographie, 1.1.2, p.16). Cependant, aucun modèle de culture cellulaire pour les norovirus n'est encore disponible.

##### **Rotavirus**

Les rotavirus sont, quant à eux, responsables d'épidémies de gastro-entérites particulièrement chez les enfants et quasiment 100% des adultes sont immunisés contre ce virus, ce qui réduit les risques pour le manipulateur. Ils sont, de plus, fréquemment responsables d'épidémies dans les services de

pédiatrie. Leur propagation est liée, comme pour le VHA, à ce qui est appelé le "péril fécal". Sa survie dans l'environnement (meilleure que celle du PV-1 dans certaines conditions) et notamment sur les mains a été démontrée ainsi que son transfert des surfaces contaminées vers des surfaces non contaminées (Ansari S.A. *et al.*, 1988).

Il constituerait donc un modèle de choix pour les études d'ATS-D antivirale.

### **Rhinovirus**

Enfin, les rhinovirus (famille des *Picornaviridae*) sont de petits virus nus responsables d'IR hautes en général bénignes mais qui peuvent se compliquer sur un terrain fragilisé. Ils ont également été impliqués dans des ILS. Ils sont assez sensibles à la dessiccation et à l'action des acides, ce qui les différencie des autres picornavirus auxquels ils appartiennent. Ils montrent cependant une assez grande résistance à l'action des ATS-D (Sattar S.A. *et al.*, 2003).

Les rhinovirus seraient donc également un modèle très intéressant de virus nus responsables d'IR.

### *3.4.2 Virus enveloppés*

Il est avéré que les virus enveloppés sont plus facilement inactivés que les virus nus. Cependant, même aux concentrations recommandées, les ATS-D ne sont pas systématiquement actifs sur les virus enveloppés comme certains mélanges de composés phénoliques ou d'ammoniums quaternaires. De plus, les comportements des virus enveloppés peuvent différer l'un par rapport à l'autre. Par exemple, la CHX à 0,008% associée au cétrimide à 0,08% permet d'inactiver le PIV-3 mais pas le HCoV 229E (Sattar S.A. *et al.*, 1989). C'est pourquoi, il apparaît nécessaire d'inclure un membre de cette catégorie de virus lors de l'évaluation de l'activité ATS-D antivirale, ce qu'a fait la norme Américaine avec un herpesvirus.

### **Herpesvirus**

Les herpesvirus ont d'ailleurs été utilisés dans de nombreuses études sur l'activité virucide des ATS-D chimiques. Leur fragilité ne les rend que rarement responsables d'épidémies. Cependant, leur contagiosité importante implique qu'ils sont fréquemment rencontrés en pathologie humaine.

Le CMV, cité par les normes Américaines, est largement retrouvé au sein de la population humaine et son pouvoir pathogène s'exprime particulièrement lors d'infections materno-fœtales et chez les patients immunodéprimés.

Ces virus se transmettant par contact étroit ne sont peut-être pas un modèle de choix sauf pour disposer d'ATS-D efficaces à leur égard avec une toxicité faible et ainsi utilisables notamment dans des services sensibles comme les services de néonatalogie.

### **Influenzavirus**

Les virus grippaux, bien qu'assez fragiles, sont également des virus intéressants à inclure dans ces tests. Cela permettrait de disposer, en cas de pandémie comme cela a été le cas récemment avec le virus A(H1N1)v, de moyens efficaces pour limiter la propagation virale. L'inclusion de tels virus peut permettre le développement de produits à action ciblée et moins toxiques.

### **Autres virus respiratoires : VRS, hMPV**

Les autres virus respiratoires comme le VRS et/ou le hMPV, responsables d'épidémies nosocomiales fréquentes et pouvant avoir des conséquences dramatiques chez les personnes sensibles,

notamment les nourrissons, devraient également être inclus dans les tests d'évaluation de l'activité ATS-D.

Par ailleurs, un virus doit être évincé de ce genre d'évaluation : le VIH. En effet, ainsi que la norme NF EN 14476+A1 le préconise, le VIH n'est pas considéré comme un virus qui requiert d'être soumis à essai car il est extrêmement fragile. Cependant, un certain nombre de fabricants, pour des raisons commerciales évidentes, continuent de revendiquer des activités ATS-D à l'encontre de ce virus.

### *3.4.3 Virus modèles animaux et bactériophages ?*

L'utilisation de virus animaux ou de bactériophages entraîne un problème évident de représentativité et des difficultés quant à l'extrapolation des résultats. Cependant, certaines contraintes, comme le fait que l'espèce virale infectant l'homme ne soit pas cultivable sur cellules, peut inciter à travailler avec d'autres souches notamment animales.

Par exemple, Sattar et coll. ont utilisé une souche de calicivirus félin comme modèle d'étude pour représenter les norovirus (Sattar S.A. *et al.*, 2003).

La norme NF EN 14476+A1 fait, elle-même, appel à un parvovirus bovin lors de l'évaluation de la désinfection chimio-thermique.

Certaines études et certaines normes, notamment la norme NF EN 13610 (AFNOR, 2003), font appel à des bactériophages comme virus modèles. Bien qu'il se pose un problème évident de représentativité, les bactériophages offrent des avantages pratiques indéniables, notamment la facilité et la rapidité de reproduction. Leur utilisation pour cribler l'activité de nouvelles molécules peut présenter des intérêts certains mais relevant plutôt des étapes préliminaires à de telles études.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

---

Nous avons, au cours de ce travail, amélioré et extrapolé le protocole d'évaluation de l'activité antivirale des ATS-D que nous avons conçu et validé au cours de nos précédents travaux.

Nous avons ainsi évalué l'activité de deux molécules, la CHX et le C[4]S-BTZ, à l'égard d'un virus nu, le PV-1. Ces deux molécules n'ont malheureusement montré aucune activité sur le PV-1. Des études sont actuellement en cours pour évaluer l'activité ATS-D d'un mélange complexe : la Bétadine®.

Ce travail a donné lieu à différentes réflexions, notamment sur les mécanismes d'action de cette molécule à fort potentiel qu'est le C[4]S-BTZ. Son activité très intéressante sur les virus enveloppés et nulle sur les virus nus, nous oriente vers une interaction des groupements bithiazolés avec les enveloppes virales. Il serait maintenant intéressant de connaître plus précisément la cible d'action de ce calixarène : agit-il par désorganisation membranaire, interaction avec des récepteurs, a-t-il une action au niveau des cellules hôtes ? Autant de questions sur lesquelles nous travaillons actuellement afin de mieux comprendre cette activité et d'en exploiter au mieux les qualités.

Un autre axe majeur de réflexion est le choix du modèle viral dans les tests d'ATS-D antivirale.

En effet, un certain nombre de critères doivent régir ce choix mais, selon les nécessités du terrain, ces critères pourront et devront être interprétés différemment.

Il n'existe, en effet, pas un modèle viral unique et universel. Ces modèles doivent s'adapter aux besoins réels de la pratique. Un modèle viral comme le VRS sera, par exemple, un modèle extrêmement judicieux si l'on souhaite disposer d'ATS-D efficaces en cas d'épidémie de bronchiolites, et suffisamment peu toxiques pour être utilisés dans un service de néonatalogie. Cependant, ce virus étant relativement plus fragile qu'un virus nu, il n'apportera pas le niveau de preuve suffisant pour confiner une épidémie de rotavirus.

Ainsi, l'ATS-D doit s'adapter et répondre aux nécessités du terrain. Pour cela, une bonne connaissance des risques épidémiologiques viraux et une évaluation fiable et standardisée de l'activité antivirale des ATS-D chimiques est fondamentale. Enfin, la mise en évidence de nouvelles molécules doit être un axe majeur de recherche pour le futur.

## BIBLIOGRAPHIE

---

**Abad F. X., Pinto R. M. et Bosch A. 1994.** Survival of enteric viruses on environmental fomites. Appl. Environ. Microbiol. 60: 3704-3710.

**AFNOR. 2003.** Désinfectants chimiques - Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité virucide contre les bactériophages des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine de l'agro-alimentaire et dans l'industrie - Méthode d'essai et exigences (phase 2, étape 1). NF EN 13610.

**AFNOR. 2006a.** Antiseptiques et désinfectants chimiques - Application des Normes européennes relatives aux antiseptiques et désinfectants chimiques. NF EN 14885.

**AFNOR. 2006b.** Antiseptiques et désinfectants chimiques - Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité virucide des antiseptiques et des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine vétérinaire - Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1). NF EN 14675.

**AFNOR. 2007.** Essai virucide quantitatif de suspension pour les antiseptiques et désinfectants chimiques utilisés en médecine humaine - Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1). NF EN 14476+A1.

**AFNOR. 2010.** Antiseptiques et désinfectants chimiques : AFNOR/T72Q. [en ligne]. Date de consultation: 01/04/2010.  
[http://www2.afnor.org/espace\\_normalisation/structure.aspx?commid=1914#netude](http://www2.afnor.org/espace_normalisation/structure.aspx?commid=1914#netude).

**AFSSET. 2004.** Saisine AFSSET (Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail) n°2004/016 Relative aux risques sanitaires liés à la présence de formaldéhyde dans les environnements professionnels.

**Aly R. et Maibach H. I. 1979.** Comparative study on the antimicrobial effect of 0.5% chlorhexidine gluconate and 70% isopropyl alcohol on the normal flora of hands. Appl. Environ. Microbiol. 37: 610-613.

**Anderson E. J. 2008.** Rotavirus vaccines: viral shedding and risk of transmission. Lancet Infect. Dis. 8: 642-649.

**Anderson E. J., Rupp A., Shulman S. T., Wang D., Zheng X. et Noskin G. A. 2011.** Impact of rotavirus vaccination on hospital-acquired rotavirus gastroenteritis in children. Pediatrics. 127: e264-270.

**Andino R., Boddeker N., Silvera D. et Gamarnik A. V. 1999.** Intracellular determinants of picornavirus replication. Trends Microbiol. 7: 76-82.

**Ansari S. A., Sattar S. A., Springthorpe V. S., Wells G. A. et Tostowaryk W. 1988.** Rotavirus survival on human hands and transfer of infectious virus to animate and nonporous inanimate surfaces. J. Clin. Microbiol. 26: 1513-1518.

**Ansari S. A., Sattar S. A., Springthorpe V. S., Wells G. A. et Tostowaryk W. 1989.** In vivo protocol for testing efficacy of hand-washing agents against viruses and bacteria: experiments with rotavirus and Escherichia coli. Appl. Environ. Microbiol. 55: 3113-3118.

**Ansari S. A., Springthorpe V. S., Sattar S. A., Rivard S. et Rahman M. 1991.** Potential role of hands in the spread of respiratory viral infections: studies with human parainfluenza virus 3 and rhinovirus 14. *J. Clin. Microbiol.* 29: 2115-2119.

**ASTM. 1996.** Standard Test Method for Efficacy of Antimicrobial Agents Against Viruses in Suspension. E1052-96 (last reapproval in 2002).

**ASTM. 1997.** Standard Test Method for Efficacy of Virucidal Agents Intended for Inanimate Environmental Surfaces. E1053-97 (last reapproval in 2002).

**ASTM. 2004.** Standard Test Method for Neutralization of Virucidal Agents in Virucidal Efficacy Evaluations. E1482-04.

**Bailey A. et Longson M. 1972.** Virucidal activity of chlorhexidine on strains of Herpesvirus hominis, poliovirus, and adenovirus. *J. Clin. Pathol.* 25: 76-78.

**Baqui A. A., Kelley J. I., Jabra-Rizk M. A., Depaola L. G., Falkler W. A. et Meiller T. F. 2001.** In vitro effect of oral antiseptics on human immunodeficiency virus-1 and herpes simplex virus type 1. *J. Clin. Periodontol.* 28: 610-616.

**Barker J., Vipond I. B. et Bloomfield S. F. 2004.** Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of Norovirus contamination via environmental surfaces. *J. Hosp. Infect.* 58: 42-49.

**Bean B., Moore B. M., Sterner B., Peterson L. R., Gerding D. N. et Balfour H. H., Jr. 1982.** Survival of influenza viruses on environmental surfaces. *J. Infect. Dis.* 146: 47-51.

**Bellamy K. 1995.** A review of the test methods used to establish virucidal activity. *J. Hosp. Infect.* 30 Suppl: 389-396.

**Belnap D. M., McDermott B. M., Jr., Filman D. J., Cheng N., Trus B. L., Zuccola H. J., Racaniello V. R., Hogle J. M. et Steven A. C. 2000.** Three-dimensional structure of poliovirus receptor bound to poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 73-78.

**Ben Salem A. et Regnouf-de-Vains J.-B. 2001.** Synthesis and characterisation of a new podand based on a calixarene and a [beta]-lactam. *Tet. Lett.* 42: 7033-7036.

**Ben Salem A. et Regnouf-de-Vains J.-B. 2003.** Towards a new family of calixarene-based podands incorporating quinolone arms. An example using nalidixic acid. *Tetrahedron Letters.* 44: 6769-6771.

**Bernstein D., Schiff G., Echler G., Prince A., Feller M. et Briner W. 1990.** In vitro virucidal effectiveness of a 0.12%-chlorhexidine gluconate mouthrinse. *J. Dent. Res.* 69: 874-876.

**Blondel B., Colbere-Garapin F., Couderc T., Wirotius A. et Guivel-Benhassine F. 2005.** Poliovirus, pathogenesis of poliomyelitis, and apoptosis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 289: 25-56.

**Borenfreund E. et Borrero O. 1984.** In vitro cytotoxicity assays. Potential alternatives to the Draize ocular allergy test. *Cell Biol. Toxicol.* 1: 55-65.

**Borenfreund E. et Puerner J. A. 1985.** Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* 24: 119-124.



**Casnati A., Fabbi M., Pelizzi N., Pochini A., Sansone F., Unguro R., Di Modugno E. et Tarzia G. 1996.** Synthesis, antimicrobial activity and binding properties of calix[4]arene based vancomycin mimics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 6: 2699-2704.

**CDC. 2001.** Acute flaccid paralysis associated with circulating vaccine-derived poliovirus, Philippines, 2001. [en ligne]. Date de consultation: 31/03/11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11688085>.

**CDC. 2008.** Norovirus outbreak in an elementary school--District of Columbia, February 2007. *Morb. Mortal Wkly Rep.* 56: 1340-1343.

**Chaberny I. E., Schnitzler P., Geiss H. K. et Wendt C. 2003.** An outbreak of epidemic keratoconjunctivitis in a pediatric unit due to adenovirus type 8. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 24: 514-519.

**Chandran A., Heinzen R. R., Santosham M. et Siberry G. K. 2006.** Nosocomial rotavirus infections: a systematic review. *J. Pediatr.* 149: 441-447.

**CNHIM (Centre National Hospitalier d'Information sur le Médicament). Thériaque Infos Médicaments. Bétadine dermique 10% sol FP 125 mL pour application locale.** [en ligne]. Date de consultation: 28/03/11. Dernière mise à jour : 28/03/11. <http://www.theriaque.org/InfoMedicaments/home.cfm>

**Colston M. J., Hailes H. C., Stavropoulos E., Herve A. C., Herve G., Goodworth K. J., Hill A. M., Jenner P., Hart P. D. et Tascon R. E. 2004.** Antimycobacterial calixarenes enhance innate defense mechanisms in murine macrophages and induce control of *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Infect. Immun.* 72: 6318-6323.

**Cornforth J. W., Hart P. D., Nicholls G. A., Rees R. J. et Stock J. A. 1955.** Antituberculous effects of certain surface-active polyoxyethylene ethers. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 10: 73-88.

**Cornforth J. W., Morgan E. D., Potts K. T. et Rees R. J. W. 1973.** Preparation of antituberculous polyoxyethylene ethers of homogeneous structure. *Tetrahedron.* 29: 1659-1667.

**Couch R. B., Englund J. A. et Whimbey E. 1997.** Respiratory viral infections in immunocompetent and immunocompromised persons. *Am. J. Med.* 102: 2-9; discussion 25-26.

**Crémieux A., Fleurette J., Fourtillan J. B., Joly B. et Soussy C. J. 1982.** Les antiseptiques. Editions Sarget. France. 179 p.

**Crémieux A., Freney J. et Davin-Regli A. 2001.** Methods of testing disinfectants. In: *Disinfection, Sterilization and Preservation (Fifth Edition)*. S. S. Block (Eds). Philadelphia. pp.1305-1327.

**Cuevas F., Di Stefano S., Magrans J. O., Prados P., Mandolini L. et de Mendoza J. 2000.** Toward an Artificial Acetylcholinesterase. *Chem. Eur. Journal.* 6: 3228-3234.

**Da Silva E., Shahgaldian P. et Coleman A. W. 2004.** Haemolytic properties of some water-soluble para-sulphonato-calix-[n]-arenes. *Int. J. Pharm.* 273: 57-62.

**Dalakas M. C. 1995.** The post-polio syndrome as an evolved clinical entity. Definition and clinical description. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 753: 68-80.

**Dancer S. J. 2009.** The role of environmental cleaning in the control of hospital-acquired infection. *J. Hosp. Infect.* 73: 378-385.

**Daniel T. M. et Robbin M. L. 1997.** A history of poliomyelitis. In: Polio. T. M. Daniels and M. L. Robbin (Eds). Rochester, Etats-Unis. pp.5-22.

**Darnell M. E., Subbarao K., Feinstone S. M. et Taylor D. R. 2004.** Inactivation of the coronavirus that induces severe acute respiratory syndrome, SARS-CoV. *J. Virol. Methods.* 121: 85-91.

**Dauphin A. et Mazin C. 1994.** Les antiseptiques et les désinfectants. Editions Arnette. Paris. 233 p.

**Davies J. G., Babb J. R., Bradley C. R. et Ayliffe G. A. 1993.** Preliminary study of test methods to assess the virucidal activity of skin disinfectants using poliovirus and bacteriophages. *J. Hosp. Infect.* 25: 125-131.

**de Rougemont A., Ambert-Balay K., Belliot G. et Pothier P. 2010.** [Norovirus infections: an overview]. *Med. Sci. (Paris).* 26: 73-78.

**Dellanno C., Vega Q. et Boesenberg D. 2009.** The antiviral action of common household disinfectants and antiseptics against murine hepatitis virus, a potential surrogate for SARS coronavirus. *Am. J. Infect. Control.* 37: 649-652.

**DGS/DHOS (Direction Générale de la Santé et Direction de l'Hospitalisation et de l'Organisation de Soins). 2003.** Circulaire DHOS/E2/DGS/SD5C/2003/N°591 du 17/12/2003 relative aux modalités de traitement manuel pour la désinfection des endoscopes non autoclavables dans les lieux de soins.

**Dibama H. M., Clarot I., Fontanay S., Salem A. B., Mourer M., Finance C., Duval R. E. et Regnouf-de-Vains J.-B. 2009.** Towards calixarene-based prodrugs: Drug release and antibacterial behaviour of a water-soluble nalidixic acid/calix[4]arene ester adduct. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19: 2679-2682.

**Droogmans G., Prenen J., Eggermont J., Voets T. et Nilius B. 1998.** Voltage-dependent block of endothelial volume-regulated anion channels by calix[4]arenes. *Am. J. Physiol.* 275: 646-652.

**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. et 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.

**Dunnebacke T. H., Levinthal J. D. et Williams R. C. 1969.** Entry and release of poliovirus as observed by electron microscopy of cultured cells. *J. Virol.* 4: 505-513.

**El-Sahly H. M., Atmar R. L., Glezen W. P. et Greenberg S. B. 2000.** Spectrum of clinical illness in hospitalized patients with "common cold" virus infections. *Clin. Infect. Dis.* 31: 96-100.

**Evans M. R., Meldrum R., Lane W., Gardner D., Ribeiro C. D., Gallimore C. I. et Westmoreland D. 2002.** An outbreak of viral gastroenteritis following environmental contamination at a concert hall. *Epidemiol. Infect.* 129: 355-360.

**Falsey A. R., Walsh E. E. et Hayden F. G. 2002.** Rhinovirus and coronavirus infection-associated hospitalizations among older adults. *J. Infect. Dis.* 185: 1338-1341.

**Fischer T. K. et Molbak K. 2001.** The costs of an outbreak--an example from a Danish day care setting. *Vaccine.* 20: 637-638.

**Fleurette J. 1995.** Diamidines aromatiques. In: Antisepsie et désinfection. Eska (Eds). Paris. pp.320-324.

**Fleurette J., Freney J. et Reverdy M. E. 1995.** Antisepsie et désinfection. Edition Eska. Paris. 639 p.

**Foulongne V., Guyon G., Rodiere M. et Segondy M. 2006.** Human metapneumovirus infection in young children hospitalized with respiratory tract disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 25: 354-359.

**Fournel I., Soulias M., Bour J. B., Gouyon J. B., Huet F. et Aho L. S. 2010.** [Evolution of the number of rotavirus and respiratory syncytial virus infections in children hospitalised in a French university hospital between 1998 and 2005]. *Pathol. Biol. (Paris)*. 58: 406-414.

**Freymuth F. 2003a.** *Orthomyxoviridae*. In: Traité de virologie médicale. ESTEM (Eds). Paris. pp.439-457.

**Freymuth F. 2003b.** *Paramyxoviridae*. In: Traité de virologie médicale. ESTEM (Eds). Paris. pp.459-479.

**Gagneur A., Sizun J., Vallet S., Legr M. C., Picard B. et Talbot P. J. 2002.** Coronavirus-related nosocomial viral respiratory infections in a neonatal and paediatric intensive care unit: a prospective study. *J. Hosp. Infect.* 51: 59-64.

**Gallimore C. I., Taylor C., Gennery A. R., Cant A. J., Galloway A., Iturriza-Gomara M. et Gray J. J. 2006.** Environmental monitoring for gastroenteric viruses in a pediatric primary immunodeficiency unit. *J. Clin. Microbiol.* 44: 395-399.

**Geller C. 2010.** Développement d'une méthode originale pour l'évaluation de l'activité virucide des antiseptiques - désinfectants : détermination du pouvoir antiseptique de calixarènes sur le coronavirus Humain. Thèse de Doctorat d'Université. Discipline: Sciences de la Vie et de la Santé. Université Henri Poincaré. Nancy. [http://www.scd.uhp-nancy.fr/docnum/SCD\\_T\\_2010\\_0042\\_GELLER.pdf](http://www.scd.uhp-nancy.fr/docnum/SCD_T_2010_0042_GELLER.pdf). 337 p.

**Geller C., Finance C. et Duval R. E. 2011.** Method(s) for Evaluation of Antiseptic Antiviral Activity of Chemical Agents. In: Current Protocols in Cell Biology. (Eds). Accepted.

**Geller C., Fontanay S., Finance C. et 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. *J. Virol. Methods*. 159: 217-226.

**Geller C., Fontanay S., Mourer M., Dibama H. M., Regnouf-de-Vains J. B., Finance C. et Duval R. E. 2010.** Antiseptic properties of two calix[4]arenes derivatives on the human coronavirus 229E. *Antiviral Res.* 88: 343-346.

**Gerber S. I., Erdman D. D., Pur S. L., Diaz P. S., Segreti J., Kajon A. E., Belkengren R. P. et Jones R. C. 2001.** Outbreak of adenovirus genome type 7d2 infection in a pediatric chronic-care facility and tertiary-care hospital. *Clin. Infect. Dis.* 32: 694-700.

**Gordon Y. J., Gordon R. Y., Romanowski E. et Araullo-Cruz T. P. 1993.** Prolonged recovery of desiccated adenoviral serotypes 5, 8, and 19 from plastic and metal surfaces in vitro. *Ophthalmology*. 100: 1835-1839; discussion 1839-1840.

**Grare M., Dibama H. M., Lafosse S., Ribon A., Mourer M., Regnouf-de-Vains J. B., Finance C. et Duval R. E. 2010a.** Cationic compounds with activity against multidrug-resistant bacteria: interest of a new compound compared with two older antiseptics, hexamidine and chlorhexidine. *Clin. Microbiol. Infect.* 6: 432-438.

**Grare M., Fontanay S., Massimba Dibama H., Mourer M., Regnouf-de-Vains J. B., Finance C. et Duval R. E. 2010b.** [Time-kill curves and evolution of membrane permeability after para-guanidinoethylcalix[4]arene exposure]. *Pathol. Biol.* 58: 46-51.

**Gualbert J., Shahgaldian P. et Coleman A. W. 2003.** Interactions of amphiphilic calix[4]arene-based Solid Lipid Nanoparticles with bovine serum albumin. *Int. J. Pharm.* 257: 69-73.

**Gutsche C. D. et Muthukrishnan R. 1978.** Calixarenes. 1. Analysis of the product mixtures produced by the base-catalyzed condensation of formaldehyde with para-substituted phenols. *J. Org. Chem.* 43: 4905-4906.

**Gwaltney J. M., Moskalski P. B. et Hendley J. O. 1980.** Interruption of experimental rhinovirus transmission. *J. Infect. Dis.* 142: 811-815.

**Hall C. B., Douglas R. G., Jr. et Geiman J. M. 1980.** Possible transmission by fomites of respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.* 141: 98-102.

**Hara J., Okamoto S., Minekawa Y., Yamazaki K. et Kase T. 1990.** Survival and disinfection of adenovirus type 19 and enterovirus 70 in ophthalmic practice. *Jpn J. Ophthalmol.* 34: 421-427.

**Harrington R. D., Hooton T. M., Hackman R. C., Storch G. A., Osborne B., Gleaves C. A., Benson A. et Meyers J. D. 1992.** An outbreak of respiratory syncytial virus in a bone marrow transplant center. *J. Infect. Dis.* 165: 987-993.

**Harris S. J. 1995.** Brevet n°WO95/19974. Calixarene-based compounds having antibacterial, antifungal, anticancer-HIV activity.

**Harris S. J. 2002.** Brevet n°WO02/44121. Anti-viral compounds.

**Hart P. D., Armstrong J. A. et Brodaty E. 1996.** Calixarenes with host-mediated potency in experimental tuberculosis: further evidence that macrophage lipids are involved in their mechanism of action. *Infect. Immun.* 64: 1491-1493.

**He Y., Bowman V. D., Mueller S., Bator C. M., Bella J., Peng X., Baker T. S., Wimmer E., Kuhn R. J. et Rossmann M. G. 2000.** Interaction of the poliovirus receptor with poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 79-84.

**Higgins P. G., Phillpotts R. J., Scott G. M., Wallace J., Bernhardt L. L. et Tyrrell D. A. 1983.** Intranasal interferon as protection against experimental respiratory coronavirus infection in volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24: 713-715.

**Hioki H., Yamada T., Fujioka C. et Kodama M. 1999.** Peptide library based on calix[4]arene. *Tet. Lett.* 40: 6821-6825.

**Hogle J. M. 2002.** Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 677-702.

**Hota S. et McGeer A. 2007.** Antivirals and the control of influenza outbreaks. *Clin. Infect. Dis.* 45: 1362-1368.

**Hulmes D., Coleman A. et Aubert-Foucher E. 2000.** Brevet n°WO00/7585. Use of calix(n)arenes for treating fibrotic diseases.

**Hwang K., Liu S. Y., Lee T. et Choy W. 1992.** Brevet n°WO92/12708. Anti-coagulant properties of macrocyclic compounds and method of treatment.

**Hwang K. M., Qi Y. M., Liu S. Y. et Choy W. 1994.** Brevet n°WO94/03164. Inhibition and treatment of infection by envelopped virus with calix(n)arene compounds.

**ICTV. 2009.** ICTV Master Species List 2009 - Version 3. [en ligne]. Date de consultation: 08/04/11. [http://talk.ictvonline.org/files/ictv\\_documents/m/msl/1231.aspx](http://talk.ictvonline.org/files/ictv_documents/m/msl/1231.aspx).

**Ijaz M. K., Brunner A. H., Sattar S. A., Nair R. C. et Johnson-Lussenburg C. M. 1985a.** Survival characteristics of airborne human coronavirus 229E. *J. Gen. Virol.* 66 ( Pt 12): 2743-2748.

**Ijaz M. K., Sattar S. A., Johnson-Lussenburg C. M. et Springthorpe V. S. 1985b.** Comparison of the airborne survival of calf rotavirus and poliovirus type 1 (Sabin) aerosolized as a mixture. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 289-293.

**Ishiko H., Shimada Y., Konno T., Hayashi A., Ohguchi T., Tagawa Y., Aoki K., Ohno S. et Yamazaki S. 2008.** Novel human adenovirus causing nosocomial epidemic keratoconjunctivitis. *J. Clin. Microbiol.* 46: 2002-2008.

**Jalal H., Bibby D. F., Tang J. W., Bennett J., Kyriakou C., Peggs K., Cubitt D., Brink N. S., Ward K. N. et Tedder R. S. 2005.** First reported outbreak of diarrhea due to adenovirus infection in a hematology unit for adults. *J Clin Microbiol.* 43: 2575-2580.

**Jartti T., van den Hoogen B., Garofalo R. P., Osterhaus A. D. et Ruuskanen O. 2002.** Metapneumovirus and acute wheezing in children. *Lancet.* 360: 1393-1394.

**Jin T., Kinjo M., Kobayashi Y. et Hirata H. 1998.** Ion transport activity of calix[n]arene (n=4, 5, 6, 7, 8) esters toward alkali-metal cations in a phospholipid bilayer membrane. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 94: 3135-3140.

**Kariwa H., Fujii N. et Takashima I. 2006.** Inactivation of SARS coronavirus by means of povidone-iodine, physical conditions and chemical reagents. *Dermatology.* 212 Suppl 1: 119-123.

**Krilov L. R. 2011.** Respiratory syncytial virus disease: update on treatment and prevention. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 9: 27-32.

**Kurtz J. B. 1979.** Virucidal effect of alcohols against echovirus 11. *Lancet.* 1: 496-497.

**Lackenby A., Hungnes O., Dudman S. G., Meijer A., Paget W. J., Hay A. J. et Zambon M. C. 2008.** Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A(H1N1) viruses in Europe. *Euro Surveill.* 13: pii: 8026.

**Lai M. Y., Cheng P. K. et Lim W. W. 2005.** Survival of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Clin. Infect. Dis.* 41: e67-71.

**Lambert R. J. W. 2004.** Evaluation of antimicrobial efficacy. In: Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization (fourth edition). A. P. Fraiese, Lambert, P.A., Maillard, J.Y. (Eds). Etats-Unis. pp.345-360.

**Leekha S., Zitterkopf N. L., Espy M. J., Smith T. F., Thompson R. L. et Sampathkumar P. 2007.** Duration of influenza A virus shedding in hospitalized patients and implications for infection control. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 28: 1071-1076.

**Love S. S., Jiang X., Barrett E., Farkas T. et Kelly S. 2002.** A large hotel outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis among three groups of guests and hotel employees in Virginia. *Epidemiol. Infect.* 129: 127-132.

**Lukashok S. A. et Horwitz M. S. 1998.** New perspectives in adenoviruses. *Curr. Clin. Top. Infect. Dis.* 18: 286-305.

**Maltezou H. C. 2008.** Nosocomial influenza: new concepts and practice. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21: 337-343.

**Maltezou H. C. et Drancourt M. 2003.** Nosocomial influenza in children. *J. Hosp. Infect.* 55: 83-91.

**Manoha C., Espinosa S., Aho S. L., Huet F. et Pothier P. 2007.** Epidemiological and clinical features of hMPV, RSV and RVs infections in young children. *J. Clin. Virol.* 38: 221-226.

**Marshall J., Botes J., Gorrie G., Boardman C., Gregory J., Griffith J., Hogg G., Dimitriadis A., Catton M. et Bishop R. 2003.** Rotavirus detection and characterisation in outbreaks of gastroenteritis in aged-care facilities. *J. Clin. Virol.* 28: 331-340.

**Marx A., Shay D. K., Noel J. S., Brage C., Bresee J. S., Lipsky S., Monroe S. S., Ando T., Humphrey C. D., Alexander E. R. et Glass R. I. 1999.** An outbreak of acute gastroenteritis in a geriatric long-term-care facility: combined application of epidemiological and molecular diagnostic methods. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 20: 306-311.

**Mbithi J. N., Springthorpe V. S., Boulet J. R. et Sattar S. A. 1992.** Survival of hepatitis A virus on human hands and its transfer on contact with animate and inanimate surfaces. *J. Clin. Microbiol.* 30: 757-763.

**Mbithi J. N., Springthorpe V. S. et Sattar S. A. 1990.** Chemical disinfection of hepatitis A virus on environmental surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3601-3604.

**Mbithi J. N., Springthorpe V. S. et Sattar S. A. 1991.** Effect of relative humidity and air temperature on survival of hepatitis A virus on environmental surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1394-1399.

**Mbithi J. N., Springthorpe V. S. et Sattar S. A. 1993.** Comparative in vivo efficiencies of hand-washing agents against hepatitis A virus (HM-175) and poliovirus type 1 (Sabin). *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3463-3469.

**Meunier S. J. et Roy R. 1996.** Polysialosides scaffolded on p-Tert-butylcalix[4]arene. *Tet. Lett.* 37: 5469-5472.

**Millership J. S. 2001.** A Preliminary Investigation of the Solution Complexation of 4-Sulphonic calix[n]arenes with Testosterone. *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.* 39: 327-331.

- Molenveld P., Engbersen J. F. J. et Reinhoudt D. N. 1999a.** Dinuclear Bisimidazolyl-Cu(II) Calix[4]arenes as Metalloenzyme Models. Synthesis and Bifunctional Catalysis in Phosphate Diester Transesterification. *J. Org. Chem.* 64: 6337-6341.
- Molenveld P., Kapsabelis S., Engbersen J. F. J. et Reinhoudt D. N. 1997.** Highly Efficient Phosphate Diester Transesterification by a Calix[4]arene-Based Dinuclear Zinc(II) Catalyst. *J. Am. Chem. Soc.* 119: 2948-2949.
- Molenveld P., Stikvoort W. M. G., Kooijman H., Spek A. L., Engbersen J. F. J. et Reinhoudt D. N. 1999b.** Dinuclear and Trinuclear Zn(II) Calix[4]arene Complexes as Models for Hydrolytic Metallo-Enzymes. Synthesis and Catalytic Activity in Phosphate Diester Transesterification. *J. Org. Chem.* 64: 3896-3906.
- Mosmann T. 1983.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65: 55-63.
- Motornaya A. E., Alimbarova L. M., Shokova E. A. et Kovalev V. V. 2006.** Synthesis and antiherpetic activity of N-(3-amino-1-adamantyl)calix[4]arenes. *Pharm. Chem. J.* 40: 68-72.
- Mourer M. 2006.** Calixarènes hydrosolubles à propriétés antivirales et antibactériennes. Thèse de Doctorat d'Université. Discipline: Chimie et Physico-Chimie Moléculaires. Henri Poincaré - Nancy 1 - UFR Sciences et Techniques de la Matière et des Procédés. Nancy. 351 p.
- Mourer M., Dibama H. M., Fontanay S., Grare M., Duval R. E., Finance C. et Regnouf-de-Vains J.-B. 2009.** p-Guanidinoethyl calixarene and parent phenol derivatives exhibiting antibacterial activities. Synthesis and biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* 17: 5496-5509.
- Mourer M., Psychogios N., Laumond G., Aubertin A. M. et Regnouf-de-Vains J. B. 2010.** Synthesis and anti-HIV evaluation of water-soluble calixarene-based bithiazolyl podands. *Bioorg. Med. Chem.* 18: 36-45.
- Narang H. K. et Codd A. A. 1983.** Action of commonly used disinfectants against enteroviruses. *J. Hosp. Infect.* 4: 209-212.
- Nerurkar L. S., West F., May M., Madden D. L. et Sever J. L. 1983.** Survival of herpes simplex virus in water specimens collected from hot tubs in spa facilities and on plastic surfaces. *JAMA.* 250: 3081-3083.
- Nicholson K. G., McNally T., Silverman M., Simons P., Stockton J. D. et Zambon M. C. 2006.** Rates of hospitalisation for influenza, respiratory syncytial virus and human metapneumovirus among infants and young children. *Vaccine.* 24: 102-108.
- Norkin L. C. 2010a.** History of the nature of viruses. In: *Virology - Molecular biology and pathogenesis*. L. C. Norkin (Eds). Washington. pp.3-19.
- Norkin L. C. 2010b.** RNA viruses: single stranded - Picornaviruses. In: *Virology - Molecular biology and pathogenesis*. L. C. Norkin (Eds). Washington. pp.171-206.
- Nugent C. I., Johnson K. L., Sarnow P. et Kirkegaard K. 1999.** Functional coupling between replication and packaging of poliovirus replicon RNA. *J. Virol.* 73: 427-435.

- Ohka S. et Nomoto A. 2001.** Recent insights into poliovirus pathogenesis. *Trends Microbiol.* 9: 501-506.
- Papageorgiou G. T., Moce-Llivina L. et Jofre J. 2001.** New method for evaluation of virucidal activity of antiseptics and disinfectants. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5844-5848.
- Parashar U. D., Gibson C. J., Bresse J. S. et Glass R. I. 2006.** Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 304-306.
- Parashar U. D., Hummelman E. G., Bresee J. S., Miller M. A. et Glass R. I. 2003.** Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 565-572.
- Park H. S., Lin Q. et Hamilton A. D. 1998.** Protein Surface Recognition by Synthetic Receptors: A Route to Novel Submicromolar Inhibitors for  $\hat{\pm}$ -Chymotrypsin. *J. Am. Chem. Soc.* 121: 8-13.
- Pellet-Rostaing S., Regnouf-de-Vains J.-B. et Lamartine R. 1996.** 2,2'-Bithiazolyl-p-tert-butylcalix[4]arene podands. Synthesis and fluorescence properties. *Tet. Lett.* 37: 5889-5892.
- Platt J. et Bucknall R. A. 1985.** The disinfection of respiratory syncytial virus by isopropanol and a chlorhexidine-detergent handwash. *J. Hosp. Infect.* 6: 89-94.
- Psychogios N. 2003.** Synthèse de calixarènes hydrosolubles porteurs d'unités chélatantes. Evaluation des propriétés de complexation d'ions métalliques ; étude toxicologique et évaluation des activités antivirales et antibactériennes. Thèse de Doctorat d'Université. Discipline: Science du médicament. Henri Poincaré - Nancy 1 - UFR Sciences pharmaceutiques et biologiques. Nancy. 187 p.
- Rabenau H. F., Cinatl J., Morgenstern B., Bauer G., Preiser W. et Doerr H. W. 2005.** Stability and inactivation of SARS coronavirus. *Med. Microbiol. Immunol.* 194: 1-6.
- Ratner A. J., Neu N., Jakob K., Grumet S., Adachi N., Della-Latta P., Marvel E. et Saiman L. 2001.** Nosocomial rotavirus in a pediatric hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 22: 299-301.
- Reed L. J. et Muench H. 1938.** A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27: 493-497.
- Reed S. E. 1975.** An investigation of the possible transmission of Rhinovirus colds through indirect contact. *J. Hyg. (Lond).* 75: 249-258.
- Robertson S. 1993.** The Immunological Basis for Immunization Series - Poliomyelitis. WHO (World Health Organization). Genève. [http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF-IBI-e/mod6\\_e.pdf](http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF-IBI-e/mod6_e.pdf).
- Robinson J. L., Lee B. E., Bastien N. et Li Y. 2005.** Seasonality and clinical features of human metapneumovirus infection in children in Northern Alberta. *J. Med. Virol.* 76: 98-105.
- Rockx B., De Wit M., Vennema H., Vinje J., De Bruin E., Van Duynhoven Y. et Koopmans M. 2002.** Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin. Infect. Dis.* 35: 246-253.
- Rousset D., Rakoto-Andrianarivelo M., Razafindratsimandresy R., Randriamanalina B., Guillot S., Balanant J., Mauciere P. et Delpeyroux F. 2003.** Recombinant vaccine-derived poliovirus in Madagascar. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 885-887.



**Sattar S. A. 2006.** Allen Denver Russell Memorial Lecture, 2006. The use of microbicides in infection control: a critical look at safety, testing and applications. *J. Appl. Microbiol.* 101: 743-753.

**Sattar S. A. et Ansari S. A. 2002.** The fingerpad protocol to assess hygienic hand antiseptics against viruses. *J. Virol. Methods.* 103: 171-181.

**Sattar S. A., Ijaz M. K., Johnson-Lussenburg C. M. et Springthorpe V. S. 1984.** Effect of relative humidity on the airborne survival of rotavirus SA11. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 879-881.

**Sattar S. A., Jacobsen H., Springthorpe V. S., Cusack T. M. et 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., Karim Y. G., Springthorpe V. S. et Johnson-Lussenburg C. M. 1987.** Survival of human rhinovirus type 14 dried onto nonporous inanimate surfaces: effect of relative humidity and suspending medium. *Can. J. Microbiol.* 33: 802-806.

**Sattar S. A., Lloyd-Evans N., Springthorpe V. S. et Nair R. C. 1986.** Institutional outbreaks of rotavirus diarrhoea: potential role of fomites and environmental surfaces as vehicles for virus transmission. *J. Hyg. (Lond).* 96: 277-289.

**Sattar S. A., Springthorpe V. S., Adegkunrin O., Zafer A. A. et 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. et Loro P. 1989.** Chemical disinfection of non-porous inanimate surfaces experimentally contaminated with four human pathogenic viruses. *Epidemiol. Infect.* 102: 493-505.

**Sauerbrei A., Sehr K., Eichhorn U., Reimer K. et Wutzler P. 2004.** Inactivation of human adenovirus genome by different groups of disinfectants. *J. Hosp. Infect.* 57: 67-72.

**Shi Y. et Schneider H. J. 1999.** Interactions between aminocalixarenes and nucleotides or nucleic acids. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.* 1797 - 1804.

**Shinkai S., Mori S., Koreishi H., Tsubaki T. et Manabe O. 1986.** Hexasulfonated calix[6]arene derivatives: a new class of catalysts, surfactants, and host molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 108: 2409-2416.

**Shinkai S., Mori S., Tsubaki T., Sone T. et Manabe O. 1984.** New water-soluble host molecules derived from calix[6]arene. *Tet. Lett.* 25: 5315-5318.

**Sizun J., Soupre D., Giroux J. D. et Legrand M. C. 1995.** [Nosocomial respiratory infection due to coronavirus in neonatal intensive care units: prospective evaluation]. *Arch. Pediatr.* 2: 1020-1021.

**Sizun J., Yu M. W. et 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.

**Spire B., Barre-Sinoussi F., Montagnier L. et Chermann J. C. 1984.** Inactivation of lymphadenopathy associated virus by chemical disinfectants. *Lancet.* 2: 899-901.

**Springthorpe V. S., Grenier J. L., Lloyd-Evans N. et Sattar S. A. 1986a.** Chemical disinfection of human rotaviruses: efficacy of commercially-available products in suspension tests. *J. Hyg. (Lond)*. 97: 139-161.

**Springthorpe V. S., Grenier J. L., Lloyd-Evans N. et Sattar S. A. 1986b.** Chemical disinfection of human rotaviruses: efficacy of commercially-available products in suspension tests. *J. Hyg. (Lond)*. 97: 139-161.

**Steinmann J. 2005.** Importance of vertebrate viruses for choosing hand antiseptics with virucidal efficacy. *Am. J. Infect. Control*. 33: 435-436; author reply 436-437.

**Stockton J., Stephenson I., Fleming D. et Zambon M. 2002.** Human metapneumovirus as a cause of community-acquired respiratory illness. *Emerg. Infect. Dis*. 8: 897-901.

**Sutton S. V. 1996.** Neutralizer evaluation as control experiments for antimicrobial efficacy tests. In: *Handbook of disinfectants and antiseptics*. J. M. Ascenzi (Eds). New York. pp.43-62.

**Sutton S. V., Wrzosek T. et Proud D. W. 1991.** Neutralization efficacy of Dey-Engley medium in testing of contact lens disinfecting solutions. *J. Appl. Bacteriol*. 70: 351-354.

**Teo W. Y., Rajadurai V. S. et Sriram B. 2010.** Morbidity of parainfluenza 3 outbreak in preterm infants in a neonatal unit. *Ann. Acad. Med. Singapore*. 39: 837-836.

**Tsan L., Davis C., Langberg R., Hojlo C., Pierce J., Miller M., Gaynes R., Gibert C., Montgomery O., Bradley S., Richards C., Danko L. et Roselle G. 2008.** Prevalence of nursing home-associated infections in the Department of Veterans Affairs nursing home care units. *Am. J. Infect. Control*. 36: 173-179.

**Tu E. T., Bull R. A., Kim M. J., McIver C. J., Heron L., Rawlinson W. D. et White P. A. 2008.** Norovirus excretion in an aged-care setting. *J. Clin. Microbiol*. 46: 2119-2121.

**Turner R. B. et Hendley J. O. 2005.** Virucidal hand treatments for prevention of rhinovirus infection. *J. Antimicrob. Chemother*. 56: 805-807.

**Tyler R. et Ayliffe G. A. 1987.** A surface test for virucidal activity of disinfectants: preliminary study with herpes virus. *J. Hosp. Infect*. 9: 22-29.

**Van Bommel K. J. C., Verboom W., Hulst R., Kooijman H., Spek A. L. et Reinhoudt D. N. 2000.** Calix[4]arene Rhenium(V) Complexes as Potential Radiopharmaceuticals. *Inorg. Chem*. 39: 4099-4106.

**Van den Hoogen B. G., de Jong J. C., Groen J., Kuiken T., de Groot R., Fouchier R. A. et Osterhaus A. D. 2001.** A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat. Med*. 7: 719-724.

**WHO. 2009.** Influenza (Seasonal) - Fact sheet N°211. [en ligne]. Date de consultation: 07/04/11. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html>.

**WHO. 2010a.** Poliomyelitis. [en ligne]. Date de consultation: 30/03/2011. <http://www.who.int/immunization/topics/polio/en/index.html>.

**WHO. 2010b.** Vaccination et vaccins antipoliomyélitiques au cours de la période précédant l'éradication: note d'information de l'OMS. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 85: 213-228.

**WHO. 2011.** Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2011-2012 northern hemisphere influenza season. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 86: 81-92.

**Wieser C., Dieleman C. B. et Matt D. 1997.** Calixarene and resorcinarene ligands in transition metal chemistry. *Coord. Chem. Rev.* 165: 93-161.

**Williams J. V., Harris P. A., Tollefson S. J., Halburnt-Rush L. L., Pingsterhaus J. M., Edwards K. M., Wright P. F. et Crowe J. E., Jr. 2004.** Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N. Engl. J. Med.* 350: 443-450.

**Wood A. et Payne D. 1998.** The action of three antiseptics/disinfectants against enveloped and non-enveloped viruses. *J. Hosp. Infect.* 38: 283-295.

**Wu H. M., Fornek M., Schwab K. J., Chapin A. R., Gibson K., Schwab E., Spencer C. et Henning K. 2005.** A norovirus outbreak at a long-term-care facility: the role of environmental surface contamination. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 26: 802-810.

**Yang C. F., Naguib T., Yang S. J., Nasr E., Jorba J., Ahmed N., Campagnoli R., van der Avoort H., Shimizu H., Yoneyama T., Miyamura T., Pallansch M. et Kew O. 2003.** Circulation of endemic type 2 vaccine-derived poliovirus in Egypt from 1983 to 1993. *J. Virol.* 77: 8366-8377.

**Yang W. et de Villiers M. M. 2004.** The solubilization of the poorly water soluble drug nifedipine by water soluble 4-sulphonic calix[n]arenes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58: 629-636.

## ANNEXE 1 : ACTIVITE ANTIVIRALE D'ATS-D COURANTS

	Temps de contact	Activité sur virus enveloppés	Activité sur virus nus	Références
<b>CHX et associations</b>				
<b>0,02%</b>	90 min	Actif sur HSV-1 et 2	Inactif sur PV-2, AdV-2	(Bailey A. et Longson M., 1972)
<b>0,05%</b>	10 min	Actif sur VRS (1 log <sub>10</sub> )		(Platt J. et Bucknall R.A., 1985)
<b>0,09% (10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup>)</b>	60 min	Actif sur HCoV 229E (3 log <sub>10</sub> )		(Geller C. <i>et al.</i> , 2009)
<b>0,12%</b>	30 s	Actif sur HSV-1, CMV, Influenza A, PIV-3	Inactif sur PV-1	(Bernstein D. <i>et al.</i> , 1990)
<b>0,2%</b>	30 s	Actif sur VIH-1 et sur HSV-1		(Baqui A.A. <i>et al.</i> , 2001)
<b>0,25%</b>	1 min	Faible activité sur VRS (0,7 log <sub>10</sub> )		(Platt J. et Bucknall R.A., 1985)
	10 min	Actif sur VRS (3,3 log <sub>10</sub> )		
<b>0,5%</b>	10 min	Actif sur HSV-1 (1,1 log <sub>10</sub> )		(Tyler R. et Ayliffe G.A., 1987)
<b>5%</b>	60 min		Inactif sur PV-1	(Papageorgiou G.T. <i>et al.</i> , 2001)
<b>CHX 0,5% +70% isopropanol</b>	1 min	Actif sur HSV-1	Inactif sur Echovirus 11	(Kurtz J.B., 1979)
<b>CHX 0,01% + cétrimide 0,1%</b>	1 min	Actif sur HSV-1		(Wood A. et Payne D., 1998)
	10 min	Actif sur VIH-1	Inactif sur PV-1, AdV-25, coxsackievirus	
		Inactif sur HCoV OC43		
<b>CHX 0,05% + éthanol 70%</b>			Actif sur rotavirus	(Ansari S.A. <i>et al.</i> , 1989)
<b>CHX 1,5% +cétrimide 15% (dilué au 2/100<sup>ème</sup>)</b>	2 h		Inactif sur Echovirus 11, sur PV-1 et sur coxsackievirus	(Narang H.K. et Codd A.A., 1983)
<b>CHX 1,5% +Cétrimide 15% (dilué à 3,3%)</b>	10 min	Actif sur HSV-1 (1,2 log <sub>10</sub> )		(Tyler R. et Ayliffe G.A., 1987)
<b>CHX 1,5% + cétrimide 15% (dilué au 1/30<sup>ème</sup> dans éthanol 70%)</b>	10 s		Actif sur rotavirus	(Ansari S.A. <i>et al.</i> , 1989)
<b>CHX 0,2% + détergent</b>	1 min	Actif sur VRS (3,3 log <sub>10</sub> )		(Platt J. et Bucknall R.A., 1985)
<b>(détergent seul)</b>	1 min	Actif sur VRS (2,3 log <sub>10</sub> )		
<b>CHX 0,1% + 0,5% QUAT + 5% isopropanol</b>				
<b>CHX 0,05% + Cétrimide 0,5% + éthanol à 70%</b>	10 s		Actif sur VHA et PV-1	(Mbithi J.N. <i>et al.</i> , 1993)
<b>CHX 4% + isopropanol 4%</b>				

Dérivés iodés				
PVP-I 10%	10 min	Actif sur HSV-1 (2,5 log <sub>10</sub> )		(Tyler R. et Ayliffe G.A., 1987)
PVP-I 10%	10 s		Actif sur rotavirus	(Ansari S.A. <i>et al.</i> , 1989)
PVP-I 0,25%	1 min	Actif sur SARS-CoV (> 4 log <sub>10</sub> )		(Kariwa H. <i>et al.</i> , 2006)
Mélange iode, iodure de potassium et éthanol (50%)	< 10 min		Actif sur PV-1 (4,5 log <sub>10</sub> )	(Papageorgiou G.T. <i>et al.</i> , 2001)
PVP-I		Active sur HSV, virus influenza, VIH	Active sur AdV, rotavirus, PV-1 et 3, coxsackievirus, rhinovirus	(Rabenau H.F. <i>et al.</i> , 2005)
Alcools				
Ethanol 5%, 75%	1 min	Actif sur HSV-1	Inactif sur Echovirus 11	(Kurtz J.B., 1979)
Ethanol à 95%	1 min	Actif sur HSV-1	Actif sur Echovirus 11 (> 3 log <sub>10</sub> )	
Ethanol à 70%	10 s		Actif sur rotavirus	(Ansari S.A. <i>et al.</i> , 1989)
Ethanol à 70%	10 s		Actif sur VHA, PV-1	(Mbithi J.N. <i>et al.</i> , 1993)
Ethanol à 70%	1 min		Inactif sur Coxsackievirus B3	(Sattar S.A. <i>et al.</i> , 1989)
Ethanol à 70%	1 min	Actif sur HSV-1 (>4 log <sub>10</sub> )		(Tyler R. et Ayliffe G.A., 1987)
Ethanol à 90%	1 min	Inactif sur HSV-1		
	5 min	Actif HSV-1 (> 4 log <sub>10</sub> )		
Isopropanol à 35%	1 min	Actif sur VRS (>4 log <sub>10</sub> )		(Platt J. et Bucknall R.A., 1985)
Isopropanol à 60%	1 min	Actif sur HSV-1 (> 4 log <sub>10</sub> )		(Tyler R. et Ayliffe G.A., 1987)
Hypochlorite de sodium				
11% de chlore libre – dilué au 2/100 <sup>ème</sup>	30 min		Actif sur Echovirus 11, PV-1, cosackievirus	(Narang H.K. et Codd A.A., 1983)
Chlore (1 mg/L)	60 min		Actif sur PV-1	(Papageorgiou G.T. <i>et al.</i> , 2001)
Chlore (2 mg/L)	60 min		Actif sur PV-1 (3,5 log <sub>10</sub> )	(Papageorgiou G.T. <i>et al.</i> , 2001)
1000 ppm chlore libre	5 min	HSV-1 (1,2 log <sub>10</sub> )		(Tyler R. et Ayliffe G.A., 1987)
	10 min	HSV-1 (> 4 log <sub>10</sub> )		
2500 ppm chlore libre	5 min	HSV-1 (> 4 log <sub>10</sub> )		
5000 ppm chlore libre	1 min	Actif sur HCoV 229E, PIV-3 (> 3 log <sub>10</sub> )	Actif sur coxsackievirus B3, AdV-5 (> 3 log <sub>10</sub> )	(Sattar S.A. <i>et al.</i> , 1989)
800 ppm chlore libre	10 min		Actif sur rhinovirus (≈ 3 log <sub>10</sub> )	(Sattar S.A. <i>et al.</i> , 1993)
Phénoliques				
Crésol à 50%, dilué au 2/100 <sup>ème</sup>	2 h		Activité faible sur échovirus 11, PV-1, coxsackievirus	(Narang H.K. et Codd A.A., 1983)
o-phénylphénol 0,1% + éthanol 79%	1 min		Actif sur rhinovirus (> 4 log <sub>10</sub> )	(Sattar S.A. <i>et al.</i> , 1993)
Phénol 14,7%	10 min		Activité faible sur rhinovirus (<< 3 log <sub>10</sub> )	
o-phénylphénol 0,02% +		Inactif sur PIV-3 et HCoV 229E	Inactif sur AdV-5, coxsackievirus	(Sattar S.A. <i>et al.</i> , 1989)

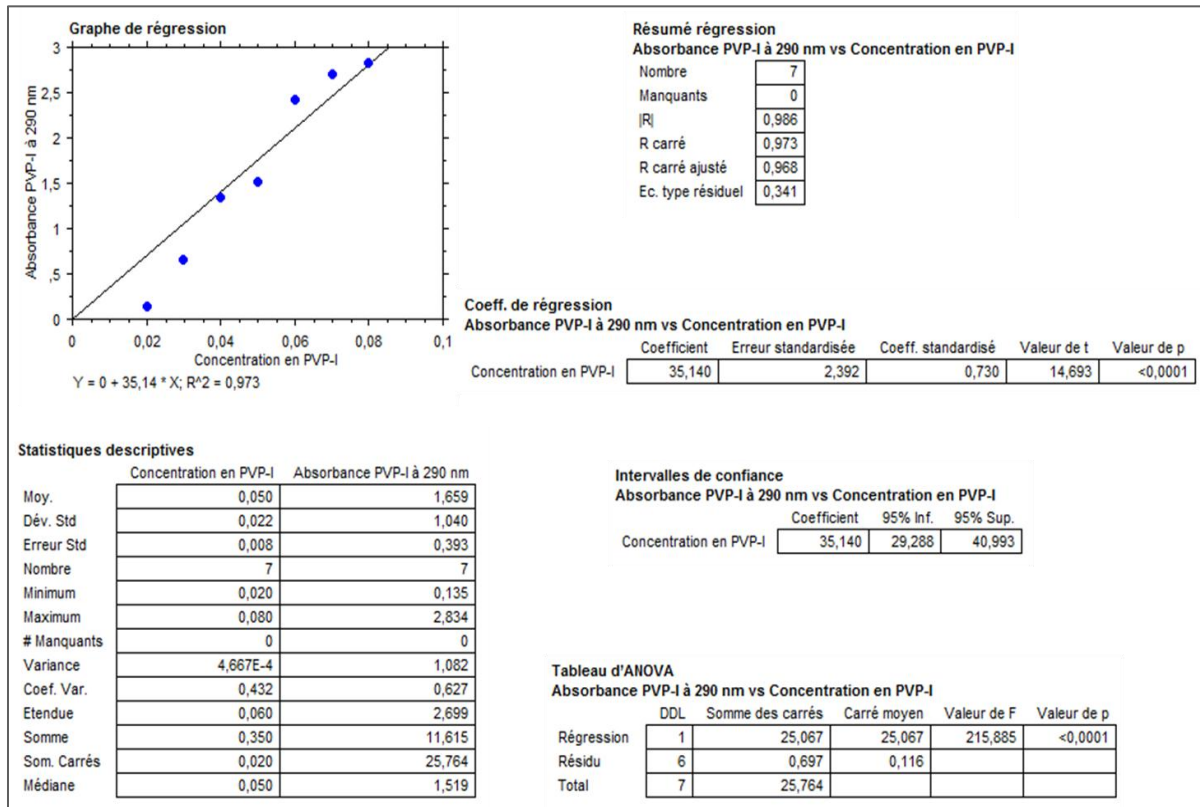
<b><i>o</i>-benzylchlorophénol 0,03% + <i>p</i>-tertiary-amylphénol 0,01%</b>			
<b><i>o</i>-phénylphénol 0,02% + <i>o</i>-benzylchlorophénol 0,03% + <i>p</i>-tertiary-amylphénol 0,01%+ SDS (0,6%)</b>			
		Actif sur PIV-3 et HCoV 229E	Inactif sur AdV-5, coxsackievirus
<b><i>o</i>-phénylphénol 0,02% + <i>o</i>-benzylchlorophénol 0,03% + <i>p</i>-tertiary-amylphénol 0,01%+ éthanol à 70%</b>			
		Actif sur PIV-3 et HCoV 229E	Actif sur AdV-5 Inactif sur coxsackievirus
<b>Aldéhydes</b>			
<b>Glutaraldéhyde 2% -dilué au 2/100<sup>ème</sup></b>	2 h		Actif sur échovirus 11, PV-1, (Narang H.K. et Codd A.A., 1983) coxsackievirus
<b>Glutaraldéhyde 0,05%</b>	60 min		Actif sur PV-1 (1,5 log <sub>10</sub> ) (Papageorgiou G.T. <i>et al.</i> , 2001)
<b>Glutaraldéhyde 1%</b>	60 min		Actif sur PV-1 (3,5 log <sub>10</sub> ) (Papageorgiou G.T. <i>et al.</i> , 2001)
<b>Glutaraldéhyde 2%</b>	1 min	Actif sur HSV-1 (> 4 log <sub>10</sub> )	(Tyler R. et Ayliffe G.A., 1987)
<b>Glutaraldéhyde 2%</b>	1 min	Actif sur HCoV 229E, PIV-3 (> 3 log <sub>10</sub> )	Actif sur coxsackievirus B3, AdV-5 (> 3 log <sub>10</sub> ) (Sattar S.A. <i>et al.</i> , 1989)
<b>Ammoniums quaternaires (QUAT)</b>			
<b>Chlorure de benzalkonium 0,1%</b>	10 min	Actif sur HSV-1 (1,2 log <sub>10</sub> )	(Tyler R. et Ayliffe G.A., 1987)
<b>QUAT + HCl 7%</b>	1 min	Actif sur HCoV 229E, PIV-3 (> 3log <sub>10</sub> )	Actif sur coxsackievirus B3, AdV-5 (> 3 log <sub>10</sub> ) (Sattar S.A. <i>et al.</i> , 1989)
<b>QUAT 7,05%</b>	10 min		Activité faible sur rhinovirus (<< 3 log <sub>10</sub> ) (Sattar S.A. <i>et al.</i> , 1993)
<b>Hexamidine</b>			
<b>10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup></b>	60 min	Inactif sur HCoV 229E (0,9 log <sub>10</sub> )	(Geller C. <i>et al.</i> , 2009)

Entre parenthèse sont indiquées les diminutions de titres viraux exprimées en log<sub>10</sub>.

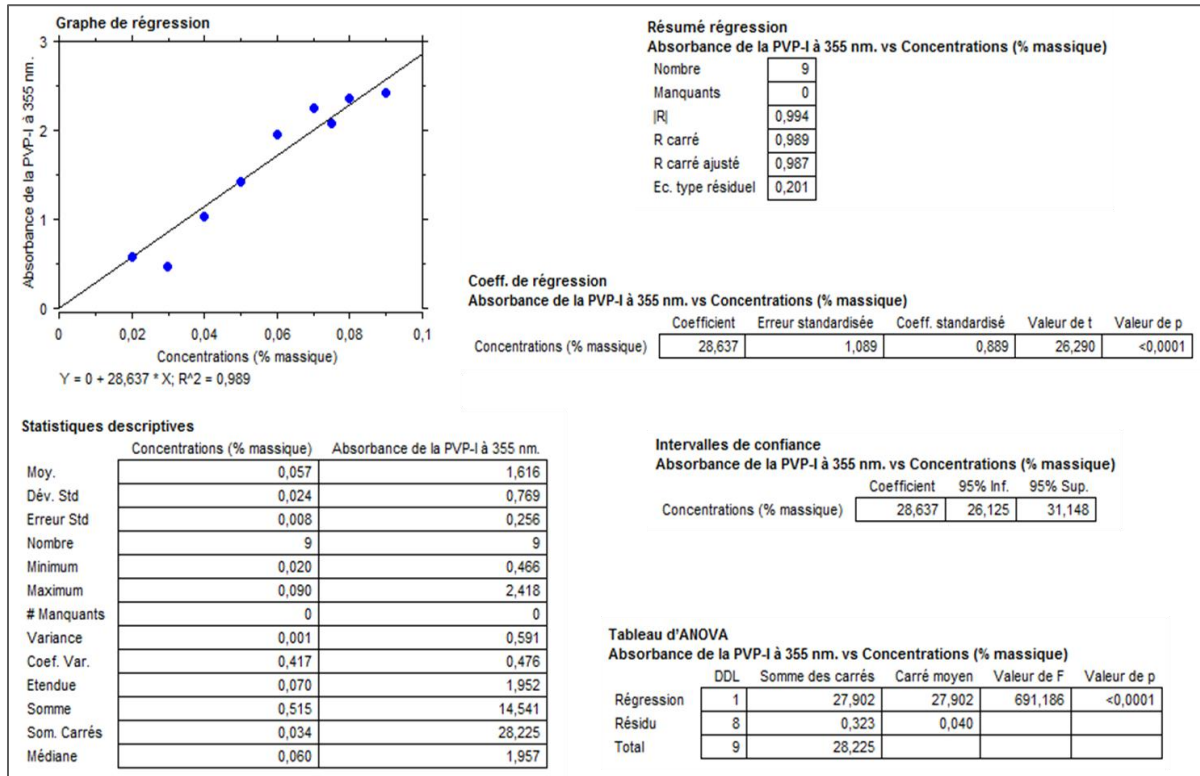
## ANNEXE 2 : ANALYSES STATISTIQUES SUR LA PVP-I ET LA BETADINE®

Les analyses ont été réalisées grâce au logiciel Statview®

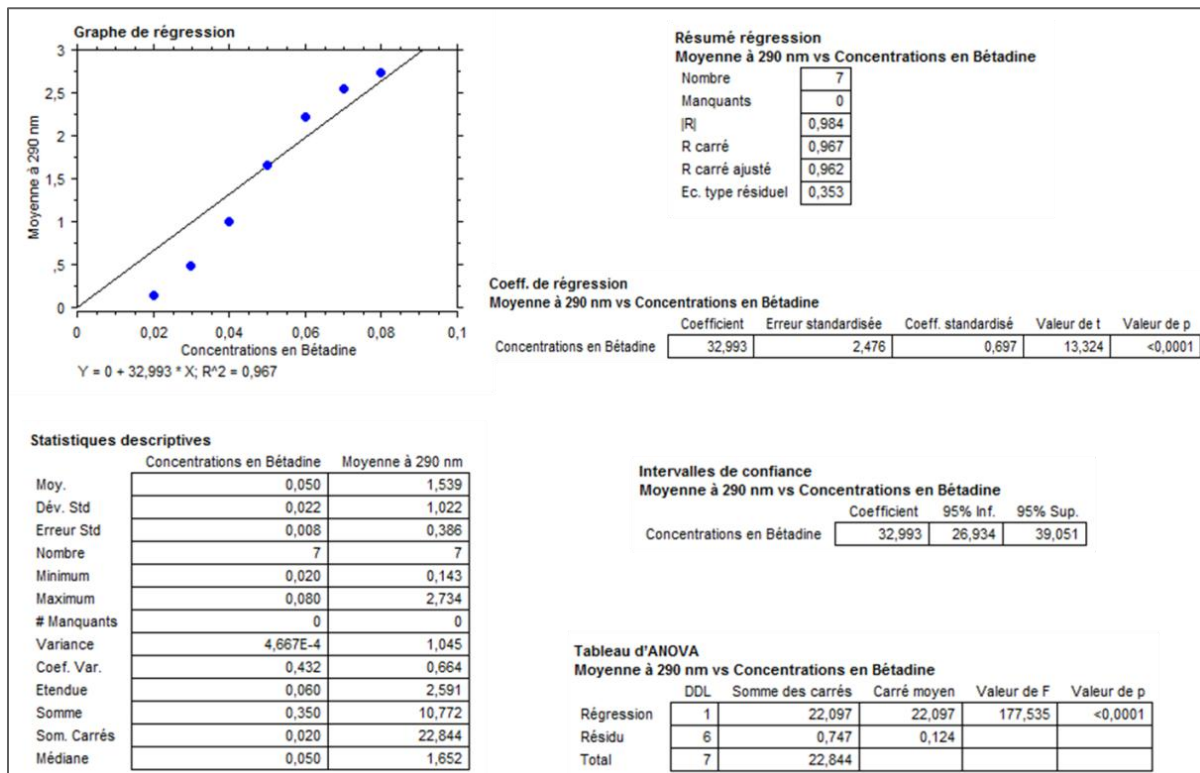
### 1- Analyse de régression A=f(c) de la PVP-I à 290 nm



## 2- Analyse de régression A=f(c) de la PVP-I à 355 nm

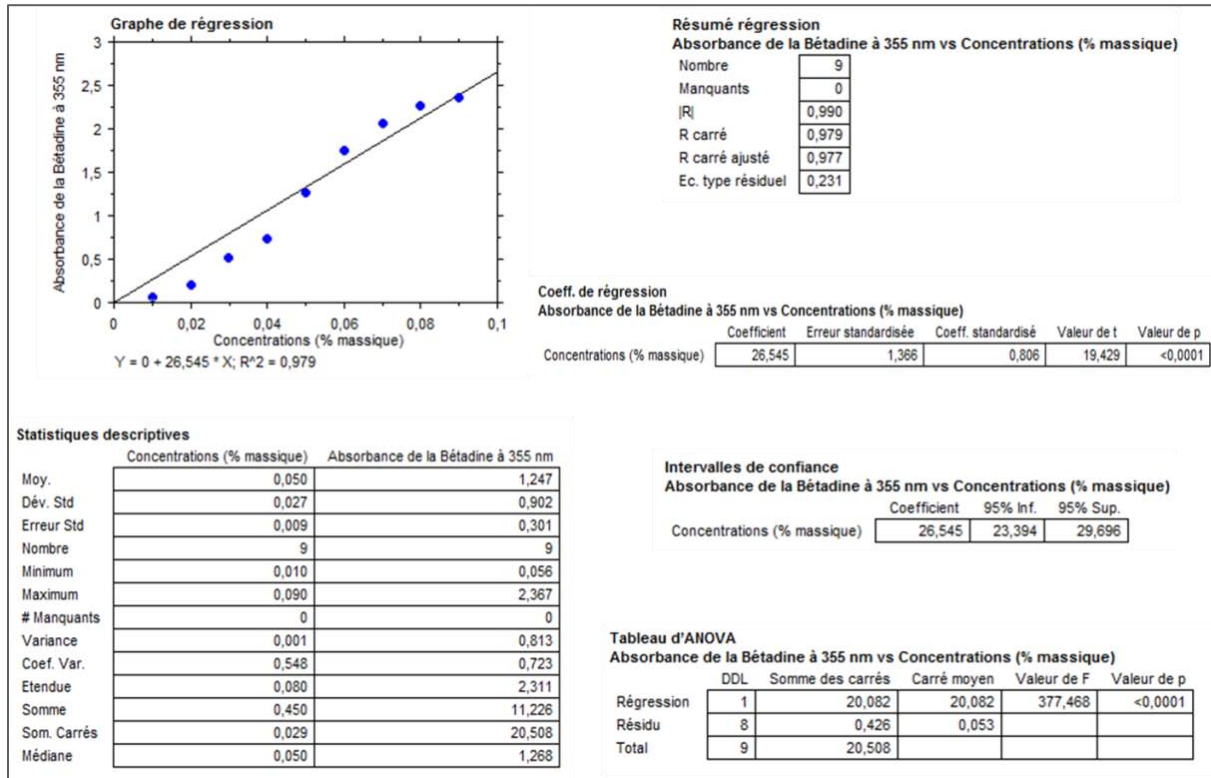


## 3- Analyse de régression A=f(c) de la Bétadine® à 290 nm









#### 4- Analyse de régression A=f(c) de la Bétadine® à 355 nm



## DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : Lundi 9 Mai 2011

<p align="center"><b>DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</b></p> <p>présenté par Chloé GELLER</p> <p><u>Sujet</u> : <i>Antisepsie-désinfection antivirale : Pertinence du choix des modèles viraux pour un usage en Etablissements de Soins</i></p> <p><u>Jury</u> :</p> <p>Président : Pr. Chantal Finance, PU-PH, Faculté de Pharmacie, UHP Nancy 1</p> <p>Directeur : Pr. Chantal Finance, PU-PH, Faculté de Pharmacie, UHP Nancy 1</p> <p>Juges :</p> <p>Pr. Jean Freney, PU-PH, Faculté de Pharmacie, UCBL Lyon 1 Pr. Alain Le Faou, PU-PH, Faculté de Médecine, UHP Nancy 1 Dr. Patricia Franck, PH, Maternité Régionale de Nancy Dr. Raphaël Duval, MCF, Faculté de Pharmacie, UHP Nancy 1</p>	<p align="center">Vu, Nancy, le 08/04/11</p> <p align="center">Le Président du Jury      Le Directeur de Thèse</p> <p align="center"> Chantal Finance</p>
<p align="center">Vu et approuvé, Nancy, le 11/04/2011</p> <p align="center">Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1</p> <p align="center"> Francine PAULUS</p> <p align="center"></p>	<p align="center">Vu, Nancy, le 28.04.2011</p> <p align="center">Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1, Pour le Président et par Délégation, La Vice-Présidente du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire,</p> <p align="center"> Jean-Pierre FINANCE</p> <p align="center">N° d'enregistrement : 3595</p>

N° d'identification :

**Titre**

***Antiseptie-désinfection antivirale :  
Pertinence du choix des modèles viraux pour un usage en Etablissements de Soins***

**Thèse soutenue le 09 Mai 2011**

**Par Chloé GELLER**

**Résumé**

Devant le manque persistant de traitements antiviraux spécifiques, une antiseptie-désinfection (ATS-D) adaptée reste l'un des moyens les plus sûrs pour limiter la propagation des infections liées aux soins. Nous avons précédemment développé et validé un protocole original d'évaluation de l'activité ATS-D des agents chimiques faisant appel à une méthode de filtration sur gel comme moyen de neutralisation avec, comme modèle, le coronavirus humain, souche 229E (HCoV 229E).

Dans ce travail, nous nous sommes attachés à un autre modèle viral : le poliovirus de type 1 (PV-1) souche Lsc2ab, sur lequel nous avons évalué l'activité de la chlorhexidine (CHX) et du 1,3-bis(bithiazolyl)-*tetra-para*-sulfonato-calix[4]arène (C[4]S-BTZ). Ce virus a été notamment choisi pour sa présence dans la seule norme Européenne réglementant l'évaluation de l'activité ATS-D antivirale des agents chimiques en médecine humaine, la norme NF EN 14476+A1.

La CHX n'a pas montré d'activité ATS-D antivirale sur le PV-1, ce qui est cohérent avec les données de la littérature. Le C[4]S-BTZ, molécule non cytotoxique et qui avait présenté des résultats prometteurs sur le HCoV 229E, n'a montré aucune activité antivirale sur le PV-1 à  $10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> et 60 min de temps de contact. Des essais sont actuellement en cours pour évaluer l'activité ATS-D antivirale d'un mélange complexe contenant de la povidone iodée ainsi que pour mieux comprendre les mécanismes d'action du C[4]S-BTZ.

**MOTS CLES :**

Antiseptie antivirale – Séphadex™ – poliovirus type 1 – calixarène – chlorhexidine – Polyvinylpyrrolidone iodée

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Pr. Chantal Finance	GEVSM – UMR 7565 Nancy Université CNRS	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/>
		Bibliographique <input type="checkbox"/>
		Thème 2/5

Thèmes	1 – Sciences fondamentales	2 – Hygiène/Environnement
	3 – Médicament	4 – Alimentation – Nutrition
	5 - Biologie	6 – Pratique professionnelle