

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

Chloé Geller

▶ **To cite this version:**

Chloé Geller. 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. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2010. Français. NNT : 2010NAN10042 . tel-01748553

HAL Id: tel-01748553
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748553

Submitted on 29 Mar 2018

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

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

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

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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Nancy-Université
Université Henri Poincaré

paul verlaine université - metz

Ecole Doctorale BioSE (Biologie, Santé, Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par **Chloé GELLER**

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

13 Juillet 2010

Membres du jury :

Rapporteurs	**Mme Astrid VABRET**	**PU-PH, EA 2128, Université de Caen Basse-Normandie**
	M. Jean FRENEY	**PU-PH, UMR 5557, CNRS, Université Lyon 1**
Examinateurs	**M. Pierre MARIS**	**Directeur-adjoint, AFSSA, Site de Fougères, Javene**
	M. Jean-Bernard REGNOUF-de-VAINS	**PU, UMR 7565, Nancy Université, CNRS**
	Mme Chantal FINANCE	**PU-PH, UMR 7565, Nancy Université, CNRS, Directeur de thèse**
	M. Raphaël E. DUVAL	**MCF, UMR 7565, Nancy Université, CNRS, Co-encadrant de thèse**

UMR 7565 Nancy – Université, CNRS

Faculté de Pharmacie - 5, rue Albert Lebrun - BP 80403 - 54001 NANCY Cédex

Nancy-Université
Université Henri Poincaré

paul verlaine université - metz

Ecole Doctorale BioSE (Biologie, Santé, Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par **Chloé GELLER**

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

13 Juillet 2010

Membres du jury :

Rapporteurs	**Mme Astrid VABRET**	**PU-PH, EA 2128, Université de Caen Basse-Normandie**
	M. Jean FRENEY	**PU-PH, UMR 5557, CNRS, Université Lyon 1**
Examinateurs	**M. Pierre MARIS**	**Directeur-adjoint, AFSSA, Site de Fougères, Javene**
	M. Jean-Bernard REGNOUF-de-VAINS	**PU, UMR 7565, Nancy Université, CNRS**
	Mme Chantal FINANCE	**PU-PH, UMR 7565, Nancy Université, CNRS, Directeur de thèse**
	M. Raphaël E. DUVAL	**MCF, UMR 7565, Nancy Université, CNRS, Co-encadrant de thèse**

UMR 7565 Nancy – Université, CNRS

Faculté de Pharmacie - 5, rue Albert Lebrun - BP 80403 - 54001 NANCY Cédex

"Dans le champ de l'observation, le hasard ne favorise que les esprits préparés"

Louis Pasteur, 1854

Remerciements

Je dédicace ce travail à tous ceux qui m'ont accompagnée, famille, amis et collègues, au cours de ces dernières années et auparavant, à vous tous MERCI !

Et plus particulièrement,

Aux membres du Jury

A M. Le Professeur Freney,

Pour avoir accepté d'être rapporteur de cette étude mais aussi et surtout pour m'avoir transmis la passion de la Microbiologie (et de son Histoire) et pour m'avoir guidée depuis le tout début de mes études, je vous assure de ma sincère gratitude.

A Mme Le Professeur Vabret,

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

A M. Maris,

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

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. Raphaël Duval, Maître de Conférences,

Pour ton aide quotidienne, tes conseils, ta patience,

Pour avoir bien voulu réfléchir à mes "quelques" questions
Pour tous les bons moments passés, et surtout pour ton amitié,
qui m'ont permis, entre autres, de mener à bien ce projet,
Je te remercie infiniment.

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 mes collègues,

A l'équipe du GEVSM et plus particulièrement,

Mme Francine Kedzierewicz, Maître de Conférences,
Pour vos conseils pratiques (notamment diététiques !) et surtout pour votre soutien moral.

Mme Catherine Colson, notre inestimable secrétaire,
Pour votre gentillesse incroyable, votre disponibilité et nos petites "pauses".

Stéphane Fontanay, jeune doctorant…
je laisserai à nos stagiaires le soin de discourir sur ta diplomatie et ta pédagogie… Je tiens plutôt à te remercier pour nos discussions métaphysiques et/ou pratiques et pour les innombrables questions que l'on n'a pas manqué de se poser au cours de ces cinq dernières années, bref pour ton amitié !

Et aussi *Barbara*, pour nos discussions qui m'ont apporté rire et soutien,

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 M. le Professeur Sattar,

Pour m'avoir accueillie au sein de votre équipe, pour m'avoir ouvert les portes (parfois ésotériques) de l'antisepsie antivirale et m'en avoir transmis les princeps fondamentaux, pour votre gentillesse et votre altruisme, je vous remercie profondément.

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,

Parce que sans vous, je ne serais sans doute pas ici aujourd'hui,

Pour tout l'amour et le courage que vous m'apportez,

Pour m'avoir transmis les valeurs fondamentales de l'existence,

Je ne pourrai trouver de mots assez forts pour exprimer ma reconnaissance et mon amour, mais je sais que vous saurez lire entre les lignes car vous me connaissez si bien…

A mes Amis,

Pour m'avoir soutenue et supportée,

Pour m'avoir fait rire et m'avoir appris blagues et calembours que je n'arrive jamais à retenir,

Pour les moments de détente inestimables que l'on a passé ensemble (Merci à D. Coquelet et aux Wampas…),

Pour avoir été présents, pour l'apport quasi-quotidien de petits moments de bonheur,

En bref, vous m'êtes juste indispensables,

Et de tout mon cœur, je vous en remercie.

A mon Amoureux,

Pour ta patience, ton soutien, pour la motivation et le courage que tu m'apportes chaque jour pour aller plus loin, Pour m'avoir expliqué l'importance Sol majeur et celle de savoir compter jusqu'à 4…

Pour toutes les raisons qui font que j'ai le sourire le matin à tes côtés,

Et aussi, pour tous les futurs bons moments d'oisiveté que nous allons enfin pouvoir passer !

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.

Je vous dédicace donc ce travail comme signe de toute ma reconnaissance.

Sommaire

REMERCIEMENTS V

SOMMAIRE XI

LISTE DES FIGURES XIX

LISTE DES TABLEAUX XXV

ABRÉVIATIONS XXIX

INTRODUCTION 1

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE 7

1 L'ANTISEPSIE-DÉSINFECTION : LES AGENTS ET L'ÉVALUATION DE LEUR ACTIVITÉ ANTIVIRALE 8

1.1 L'antisepsie au cours du temps 8

1.2 Les principes fondamentaux de l'évaluation de l'activité ATS-D antivirale 12

1.3 Les différents types des tests 13

1.3.1 Les tests en suspension 13

1.3.2 Les tests sur support 13

1.3.3 Les tests évaluant la pratique réelle 14

1.3.4 Cas particulier de l'ATS des mains 15

1.4 L'évaluation de l'activité ATS antivirale et ses particularités 16

1.4.1 Les étapes critiques : Neutralisation et cytotoxicité 18

1.4.1.1 La neutralisation 18

1.4.1.2 La cytotoxicité 20

1.4.2 Les facteurs impliqués dans l'activité ATS antivirale 20

1.5 Le contexte normatif 22

1.5.1 Généralités 22

1.5.2 Normes Européennes pour l'évaluation de l'activité virucide des ATS-D 23

1.5.3 Normes Américaines pour l'évaluation de l'activité virucide des ATS-D 26

1.6 Les grandes familles chimiques d'antiseptiques-désinfectants 27

1.6.1 Les bisbiguanides et la chlorhexidine 27
1.6.2 Les diamidines aromatiques et l'hexamidine 30
1.6.3 Les alcools 32
1.6.4 Les dérivés halogénés 34
1.6.4.1 Les dérivés iodés 34
1.6.4.2 Les dérivés chlorés 36
1.6.5 Les ammoniums quaternaires 38
1.6.6 Les composés phénoliques 40
1.6.7 Les aldéhydes 42
1.6.7.1 Le formaldéhyde 42
1.6.7.2 Le glutaraldéhyde 43
1.6.8 Les autres familles 45

2 LES CALIXARÈNES 47

2.1 Historique et structure 47

2.2 Activités biologiques des calixarènes 49
2.2.1 Potentiels pharmacologiques 49
2.2.2 Outils de reconnaissance moléculaire 50
2.2.3 Catalyseurs biomimétiques 50
2.2.4 Solubilisation de principes actifs liposolubles 51
2.2.5 Autres potentiels thérapeutiques : prodrogues et complexes radioactifs 51
2.2.6 Calixarènes et pouvoir microbicide 52

3 LE MODÈLE VIRAL : LES CORONAVIRUS 55

3.1 Historique 56

3.2 Classification 57

3.3 Structure des coronavirus 61
3.3.1 Le génome des coronavirus 62
3.3.2 Les protéines structurales 63
3.3.3 Les protéines non structurales ou "accessoires" 66

3.4 Une structure génomique caractéristique et une réplication "nichée" originale 67

3.5 Pouvoir évolutif des coronavirus 71

3.6 Epidémiologie et pouvoir pathogène chez les animaux 73

3.7 Epidémiologie et pouvoir pathogène chez l'Homme 78
3.7.1 Les HCoV “classiques” et les HCoV nouvellement identifiés 78
3.7.1.1 Les HCoV “classiques”: les souches 229E et OC43 78
3.7.1.2 La souche NL63 79
3.7.1.3 La souche HKU1 80
3.7.1.4 Pathologies respiratoires et diagnostic 81
3.7.1.5 Pathologies digestives 83
3.7.1.6 Pathologies neurologiques 84
3.7.2 Le coronavirus Humain associé au syndrome respiratoire aigu sévère 85
3.7.2.1 L'historique 85
3.7.2.2 Identification du SARS-CoV 88
3.7.2.3 Mesures mises en œuvre pour endiguer cette épidémie 89
3.7.2.4 Recherche du réservoir du SARS-CoV 90

3.8 Potentialité de survie des coronavirus 91
3.8.1 Température et humidité relative 91
3.8.2 Suspension vs dessiccation 92
3.8.3 pH 94
3.8.4 Fluides biologiques 94
3.8.5 Transfert à partir de surfaces contaminées 95

3.9 Sensibilité des coronavirus aux ATS-D 96

PRINCIPES ET BUTS DE L'ETUDE 99

PARTIE EXPERIMENTALE : MATERIELS, METHODES ET RESULTATS 107

MATÉRIELS ET MÉTHODES 108

1 MATÉRIELS, ÉQUIPEMENTS ET RÉACTIFS 108

1.1 Matériels et équipements 108

1.2 Réactifs 110

2 MÉTHODES 111

2.1 Culture cellulaire et obtention d'un stock de cellules 111

2.2 Culture et obtention de stocks de virus de HCoV 229E 112

2.3 Evaluation du titre viral par la méthode des dilutions limites 114

2.4 Evaluation biologique de la rétention de molécules par le modèle de colonne : cytotoxicité et viabilité 116

2.4.1 Etapes préliminaires communes aux tests de viabilité au MTT et de cytotoxicité au RN 117

2.4.2 Tests de viabilité au MTT 118

2.4.3 Tests de cytotoxicité au RN 119

2.5 Evaluation physico-chimique de la rétention des molécules testées par spectrophotométrie UV-visible 120

2.6 Protocole d'évaluation de l'activité antivirale ATS-D 121

2.6.1 Préparation des gels de Séphadex™ G-10 et G-25 121

2.6.2 Préparation des colonnes de Séphadex™ 122

2.6.3 Test d'évaluation de l'activité ATS-D antivirale 123

2.6.4 Contrôles fondamentaux 127

2.6.4.1 Contrôles de non rétention du virus 127

2.6.4.2 Contrôle de neutralisation 127

2.6.4.3 Contrôle de cytotoxicité 128

2.7 Analyse statistique 128

2.7.1 Répétabilité de la fabrication des colonnes 128

2.7.2 Taux de rétention et analyse spectrophotométrique 129

RÉSULTATS 131

1 DÉVELOPPEMENT D'UN PROTOCOLE DE DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ ATS-D ANTIVIRALE 131

1.1 Tests de viabilité et de cytotoxicité 131

1.1.1 Principe et objectifs 131

1.1.2 Test de viabilité au MTT 132

1.1.3 Test de cytotoxicité au RN 132

1.1.4 Optimisation des protocoles MTT et RN 133

1.2 Obtention des colonnes de Séphadex™ G-10 et G-25 135

1.2.1 Optimisation des temps et vitesses de centrifugation 135

1.2.2 Homogénéité des volumes de gels et de filtrats 136

1.2.2.1 Colonnes de Séphadex™ G-25 136

1.2.2.2 Colonnes de Séphadex™ G-10 137

1.2.3 Contrôle de la fonctionnalité des colonnes : rétention de molécules colorées 137

1.2.3.1 Rétention du BT par les colonnes de Séphadex™ G-25 137
1.2.3.2 Rétention du RN par les colonnes de Séphadex™ G-10 141
1.2.4 Contrôle de la fonctionnalité des colonnes : Non rétention du HCoV 229E 145

2 ACTIVITÉ ATS-D DE MOLÉCULES DE RÉFÉRENCE (CHX ET HXM) SUR LE HCOV 229E 146

2.1 Choix des molécules de référence 146
2.1.1 La polyvinylpyrrolidone iodée ou PVP-I 146
2.1.2 L'hypochlorite de sodium 147
2.1.3 Le glutaraldéhdye 147
2.1.4 Le cétrimide 149
2.1.4.1 Toxicité du cétrimide sur les cellules L-132 150
2.1.4.2 Cytotoxicité du cétrimide après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-10 150

2.2 Evaluation de l'activité ATS-D anti-coronavirus de la CHX 152
2.2.1 Cytotoxicité de la CHX sur les cellules L-132 avec et sans filtration 152
2.2.2 Taux de rétention de la CHX par les colonnes de Séphadex™ G-25 156
2.2.2.1 Détermination des paramètres spectrophotométriques de la CHX 158
2.2.2.2 Taux de rétention par les colonnes de Séphadex™ G-25 158
2.2.3 Activité ATS-D de la CHX sur le HCoV 229E 163

2.3 Evaluation de l'activité ATS-D anti-coronavirus de l'HXM 166
2.3.1 Cytotoxicité de l'HXM sur les cellules L-132 avec et sans filtration 166
2.3.1.1 Cytotoxicité de l'HXM sur les cellules L-132 166
2.3.1.2 Cytotoxicité de l'HXM sur les cellules L-132 après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-10 167
2.3.2 Taux de rétention de l'HXM par les colonnes de Séphadex™ G-10 170
2.3.2.1 Détermination des paramètres spectrophotométriques de l'HXM 170
2.3.2.2 Taux de rétention par les colonnes de Séphadex™ G-10 172
2.3.3 Activité ATS-D de l'HXM sur le HCoV 229E 174

3 EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ATS-D ANTI-CORONAVIRUS DE DEUX CALIXARÈNES 176

3.1 Evaluation de l'activité ATS-D anti-coronavirus du C[4]S 176
3.1.1 Cytotoxicité du C[4] sur les cellules L-132 176
3.1.2 Taux de rétention du C[4]S 180
3.1.2.1 Détermination des paramètres spectrophotométriques du C[4]S 180
3.1.2.2 Taux de rétention par les colonnes de Séphadex™ G-25 182
3.1.2.3 Taux de rétention par les colonnes de Séphadex™ G-10 184
3.1.3 Activité ATS-D du C[4]S sur le HCoV 229E 187

3.2 Evaluation de l'activité ATS-D anti-coronavirus du C[4]S-BTZ 188
3.2.1 Cytotoxicité du C[4]S-BTZ sur les cellules L-132 188
3.2.2 Taux de rétention du C[4]S-BTZ par les colonnes de Séphadex™ G-25 191
3.2.2.1 Détermination des paramètres spectrophotométriques du C[4]S-BTZ 191
3.2.2.2 Taux de rétention par les colonnes de Séphadex™ G-25 191
3.2.3 Activité ATS-D du C[4]S-BTZ sur le HCoV 229E 195

DISCUSSION 197

1 L'ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ATS ANTIVIRALE : ENJEUX ET DIFFICULTÉS 199

1.1 Finalité du produit testé : *Comment choisir le type de test* ? 199

1.2 Problème de la représentativité : *Comment choisir le modèle viral* ? 200
1.2.1 Critères de choix et inoculum 200
1.2.2 Avantages et inconvénients des différents modèles viraux 202
1.2.2.1 Virus nus 203
1.2.2.2 Virus enveloppés 204
1.2.2.3 Virus modèles animaux et bactériophages 205
1.2.3 Pourquoi le HCoV 229E ? 206

1.3 Garantie d'un test fiable et opérationnel : *Comment choisir la méthode de neutralisation et les contrôles incontournables* ? 207
1.3.1 Temps de contact 207
1.3.2 Avantages et inconvénients des différentes méthodes 208
1.3.2.1 Neutralisation par dilution 208
1.3.2.2 Neutralisation chimique 209
1.3.2.3 Neutralisation par filtration 209
1.3.2.4 Et Outre Atlantique ? 212
1.3.3 Pourquoi développer une nouvelle méthode de filtration sur gel ? 212
1.3.4 De l'intérêt du couplage des méthodes 215
1.3.5 Garantie de résultats fiables : *Quels sont les contrôles incontournables?* 215

1.4 Standardisation et conditions réelles d'utilisation : *Choix des critères physico-chimiques* 217
1.4.1 Paramètres physico-chimiques 217
1.4.2 Substances interférentes 218

1.5 De la difficulté d'unifier les tests : l'exemple d'une controverse… 219

2 QUEL ARSENAL THÉRAPEUTIQUE PRÉVENTIF POUR DEMAIN? 221

2.1 Des ATS-D connus depuis la nuit des temps ou presque… 221
2.1.1 La CHX et l'HXM ... 221
2.1.1.1 HXM ... 221
2.1.1.2 CHX ... 222
2.1.2 Autres molécules à activité ATS antivirale ... 224

2.2 Vers de nouvelles molécules : les calixarènes, une nouvelle famille d'ATS-D à visée virucide ? ... 226
2.2.1 Les calixarènes : un potentiel microbicide attrayant ... 226
2.2.2 Le C[4]S-BTZ : Rapidité, Rémanence et Non toxicité ... 226
2.2.3 Quel avenir pour le C[4]S-BTZ ? ... 227

CONCLUSION ET PERSPECTIVES ... 229

REFERENCES ET ANNEXES ... 233

RÉFÉRENCES ... 235

ANNEXE 1 : LISTE DES FORMULES UTILISÉES ... XXXVI

ANNEXE 2 : ANALYSE STATISTIQUE ET SPECTROPHOTOMÉTRIQUE POUR L'OPTIMISATION DE LA CONCEPTION DES COLONNES DE SÉPHADEX™ ... XXXVIII

1 OPTIMISATION DES COLONNES DE SÉPHADEX™ G–25 ... XXXVIII

1.1 Homogénéité des volumes de gels obtenus après la première centrifugation ... xxxviii

1.2 Homogénéité des volumes de filtrats obtenus après la deuxième centrifugation ... xli

2 OPTIMISATION DES COLONNES DE SÉPHADEX™ G–10 ... XLIV

2.1 Homogénéité des volumes de gels obtenus après la première centrifugation ... xliv

2.2 Homogénéité des volumes de filtrats obtenus après la deuxième centrifugation ... xlvii

3 ANALYSE DES PARAMÈTRES SPECTROPHOTOMÉTRIQUES SPÉCIFIQUES DU BT ... L

3.1 Détermination des longueurs d'onde des maxima d'absorption du BT ... l

3.2 Détermination des coefficients d'absorption molaire du BT par analyse de régression ... lii
3.2.1 Détermination du coefficient d'absorption molaire du BT à 234 nm ... lii
3.2.2 Détermination du coefficient d'absorption molaire du BT à 317 nm ... liii
3.2.3 Détermination du coefficient d'absorption molaire du BT à 590 nm ... liv

4 ANALYSE DES PARAMÈTRES SPECTROPHOTOMÉTRIQUES SPÉCIFIQUES DU RN LV

4.1 Détermination des longueurs d'onde des maxima d'absorption du RN lv

4.2 Détermination des coefficients d'absorption molaire du RN par analyse de régression lviii

4.2.1 Détermination du coefficient d'absorption molaire du RN à 276 nm lviii

4.2.2 Détermination du coefficient d'absorption molaire du RN à 456 nm lix

ANNEXE 3 : RÉSULTATS OBTENUS EN SPECTROPHOTOMÉTRIE UV-VISIBLE LX

1 DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES SPECTROPHOTOMÉTRIQUES DE LA CHX LX

2 DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES SPECTROPHOTOMÉTRIQUES DE L'HXM LXIII

3 DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES SPECTROPHOTOMÉTRIQUES DU C[4]S LXVI

4 DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES SPECTROPHOTOMÉTRIQUES DU C[4]S-BTZ LXX

ANNEXE 4 : ANALYSES STATISTIQUES DES RÉSULTATS OBTENUS EN SPECTROPHOTOMÉTRIE UV-VISIBLE LXXII

1 ANALYSE DE RÉGRESSION DES PARAMÈTRES SPECTROPHOTOMÉTRIQUES DE LA CHX LXXII

1.1 A la longueur d'onde d'absorption maximale de 232 nm lxxii

1.2 A la longueur d'onde d'absorption maximale de 255 nm lxxiii

2 ANALYSE DE RÉGRESSION DES PARAMÈTRES SPECTROPHOTOMÉTRIQUES DE L'HXM À 262 NM LXXIV

3 ANALYSE DE RÉGRESSION DES PARAMÈTRES SPECTROPHOTOMÉTRIQUES DU C[4]S LXXV

3.1 C[4]S dialysé lxxv

3.2 C[4]S non dialysé lxxvi

4 ANALYSE DE RÉGRESSION DES PARAMÈTRES SPECTROPHOTOMÉTRIQUES DU C[4]S-BTZ LXXVII

Liste des figures

Figure 1 : Les différents secteurs d'utilisation de l'antisepsie-désinfection 3

Figure 2 : Page de garde de l'œuvre majeure de Semmelweis 9

Figure 3 : Louis Pasteur 11

Figure 4 : Principe de l'évaluation de l'activité ATS-D antivirale 17

Figure 5 : Principe de la filtration sur gel 19

Figure 6 : Digluconate de chlorhexidine (CHX) 27

Figure 7 : Diiséthionate d'hexamidine (HXM) 31

Figure 8 : Structure générale d'un calix[4]arène 47

Figure 9 : Structure du C[4]S et du C[4]S-BTZ 48

Figure 10 : Evolution de la taxonomie de la famille des *Coronaviridae* 57

Figure 11 : Répartition des virus humains et animaux dans les groupes composant le genre *Coronavirus* 59

Figure 12 : Classification phylogénétique des coronavirus 60

Figure 13 : Structure des coronavirus 61

Figure 14 : Représentation schématique du génome d'un coronavirus 62

Figure 15 : Protéine HE chez le MHV, souche A59, en microscopie électronique 65

Figure 16 : Cycle infectieux des coronavirus 67

Figure 17 : Transcription discontinue des ARNsbg 70

Figure 18 : Spectre d'hôtes des différentes espèces de coronavirus 73

Figure 19 : Cas probables de SRAS reportés à travers le monde entre le 1er Novembre 2002 et le 31 Juillet 2003 85

Figure 20 : Etude de la stabilité du SARS-CoV, du HCoV 229E, du HSV-1 et de l'adénovirus de type 3 93

Figure 21 : Evolution de l'infection par le HCoV 229E des cellules L-132 113

Figure 22 : Evaluation du titre viral par la méthode de Reed et Muench 115

Figure 23 : Schéma des plaques 96 puits dans les tests MTT et RN 117

Figure 24 : Les différentes étapes de la fabrication des colonnes de Séphadex™ 122

Figure 25 : Optimisation de l'ensemencement cellulaire pour les tests MTT et RN 134

Figure 26 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible du BT 138

Figure 27 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible de filtrats de solutions de BT après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-25 140

Figure 28 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible du RN 143

Figure 29 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible de filtrats de solutions de RN après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-25 144

Figure 30 : Monomère de la polyvinylpyrrolidone 146

Figure 31 : Glutaraldéhyde 147

Figure 32 : Evaluation de la toxicité du glutaraldéhyde sur les cellules L-132 sans filtration et après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-10 148

Figure 33 : Bromure de cétrimonium 149

Figure 34 : Evaluation de la toxicité du cétrimide sur cellules L-132 sans filtration et après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-10 151

Figure 35 : Evaluation de la viabilité cellulaire en présence de CHX non filtrée et après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-25 153

Figure 36 : Evaluation de la cytotoxicité induite sur les cellules L-132 par la CHX non filtrée et après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-25 154

Figure 37 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible de dilutions de CHX de 10^{-4} à 10^{-10} mol.L^{-1} 157

Figure 38 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible de dilutions de CHX de 5.10^{-5} à 5.10^{-6} mol.L^{-1} 157

Figure 39 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible de filtrats des solutions de CHX à 10^{-2}, 10^{-3} et 10^{-4} mol.L^{-1} 159

Figure 40 : Comparaison des spectres UV-visibles de l'eau, du PBS et de la CHX..... 160

Figure 41 : Evaluation de l'activité ATS-D de la CHX sur le HCoV 229E 165

Figure 42 : Evaluation de la viabilité cellulaire en présence d'HXM non filtrée et après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-10 168

Figure 43 : Evaluation de la cytotoxicité induite sur les cellules L-132 par l'HXM non filtrée et après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-10 169

Figure 44 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible de dilutions d'HXM de 10^{-3} à 10^{-10} mol.L^{-1}..... 171

Figure 45 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible de dilutions de l'HXM de 5.10^{-5} à 5.10^{-6} mol.L^{-1}. 171

Figure 46 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible de filtrats des solutions d'HXM à 10^{-2}, 10^{-3} et 10^{-4} mol.L^{-1} 173

Figure 47 : Evaluation de l'activité ATS-D de l'HXM sur le HCoV 229E..... 175

Figure 48 : Evaluation de la viabilité cellulaire en présence de C[4]S non filtré et après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-10 et G-25 177

Figure 49 : Evaluation de la cytotoxicité induite sur les cellules L-132 par le C[4]S non filtré et après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-10 et G-25 178

Figure 50 : Spectres d'absorption de dilutions du C[4]S, lot dialysé, de 10^{-2} à 10^{-9} mol.L^{-1} 180

Figure 51 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible de dilutions de C[4]S, lot dialysé, de 10^{-4} à 10^{-6} mol.L^{-1} 181

Figure 52 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible de dilutions de C[4]S, lot non dialysé, de 10^{-5} à 10^{-6} mol.L^{-1} 182

Figure 53 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible de filtrats (sur Séphadex™ G-25) de solutions de C[4]S, lot dialysé, à 10^{-2}, 10^{-3} et 10^{-4} mol.L^{-1} 183

Figure 54 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible de filtrats (sur Séphadex™ G-10) de solutions de C[4]S à 10^{-2}, 10^{-3} et 10^{-4} mol.L^{-1} 185

Figure 55 : Evaluation de l'activité ATS-D du C[4]S sur le HCoV 229E 187

Figure 56 : Evaluation de la viabilité cellulaire en présence de C[4]S-BTZ non filtré et après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-25 189

Figure 57 : Evaluation de la cytotoxicité induite sur les cellules L-132 par le C[4]S-BTZ non filtré et après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-25 190

Figure 58 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible de dilutions de C[4]S-BTZ de 10^{-3} à 10^{-6} mol.L^{-1} . 192

Figure 59 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible de filtrats (sur Séphadex™ G-25) de solutions de C[4]S-BTZ à 10^{-2}, 10^{-3} et 10^{-4} mol.L^{-1} 193

Figure 60 : Evaluation de l'activité ATS-D du C[4]S-BTZ sur le HCoV 229E 195

Figure 61 : Comparaison des différents domaines de fractionnement des gels utilisés dans la technique de neutralisation par tamisage moléculaire 210

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les différentes catégories d'essais permettant l'évaluation de l'activité d'un biocide..... 24

Tableau 2 : Méthodes d'essais normalisées pour les revendications des produits à visée désinfectante dans le domaine de la médecine Humaine 24

Tableau 3 : Conditions d'essai requises par la norme NF EN 14476+A1 25

Tableau 4 : Liste des normes ASTM pour l'évaluation de l'activité ATS antivirale..... 26

Tableau 5 : Correspondance entre les récepteurs spécifiques identifiés et les espèces de coronavirus 68

Tableau 6 : Symptômes induits par les HCoV chez des enfants sains de moins de 15 ans..... 82

Tableau 7 : Définition des cas présumés et des cas probables de SRAS publiée par l'OMS 86

Tableau 8 : Symptômes retrouvés chez les patients atteints de SRAS..... 87

Tableau 9 : Comparaison des taux de survie du HCoV 229E et du poliovirus dans différentes conditions d'humidité et de température..... 91

Tableau 10 : Sensibilité du HCoV 229E à différentes formulations d'ATS-D chimiques..... 97

Tableau 11 : Modalités de préparation des suspensions à tester lors de l'évaluation de l'activité ATS-D antivirale d'un produit..... 125

Tableau 12 : Taux de rétention de solutions de BT à $4{,}1.10^{-4}$ et $4{,}1.10^{-3}$ $mol.L^{-1}$ par les colonnes de Séphadex™ G-25..... 140

Tableau 13 : Taux de rétention de solutions de RN à 10^{-4} et 10^{-3} $mol.L^{-1}$ par les colonnes de Séphadex™ G-10..... 144

Tableau 14 : Contrôle de la non rétention du HCoV 229E par les colonnes de Séphadex™ G-25 et G-10 145

Tableau 15 : Moyennes des CI_{50} et des CC_{50} obtenues pour la CHX non filtrée et après filtration sur les cellules L-132 155

Tableau 16 : Analyse des spectres UV-visibles obtenus après filtration de solutions de CHX à 10^{-2}, 10^{-3} et 10^{-4} mol.L^{-1} sur colonnes de Séphadex™ G-25 161

Tableau 17 : Résultats des contrôles effectués lors des tests de l'évaluation de l'activité ATS anti-coronavirus de la CHX 164

Tableau 18 : Moyennes des CI_{50} et des CC_{50} obtenues pour l'HXM non filtrée et après filtration sur les cellules L-132 166

Tableau 19 : Analyse des spectres UV-visibles obtenus lors de la filtration de solutions d'HXM à 10^{-2}, 10^{-3} et 10^{-4} mol.L^{-1} sur les colonnes de Séphadex™ G-10 172

Tableau 20 : Résultats des contrôles effectués lors des tests de l'évaluation de l'activité ATS-D anti-coronavirus de l'HXM 175

Tableau 21 : Moyennes des CI_{50} et des CC_{50} obtenues pour le C[4]S non filtré et après filtration sur les cellules L-132 179

Tableau 22 : Analyse des spectres UV-visibles obtenus lors de la filtration sur colonnes Séphadex™ G-25, de solutions de C[4]S, lot dialysé, à 10^{-2}, 10^{-3} et 10^{-4} mol.L^{-1} 184

Tableau 23 : Analyse des spectres UV-visibles obtenus lors de la filtration sur colonnes de Séphadex™ G-10, de solutions de C[4]S à 10^{-2}, 10^{-3} et 10^{-4} mol.L^{-1} 186

Tableau 24 : Résultats des contrôles effectués lors des tests de l'évaluation de l'activité ATS-D anti-coronavirus du C[4]S 188

Tableau 25 : Moyennes des CI_{50} et des CC_{50} obtenues pour le C[4]S-BTZ non filtré et après filtration sur les cellules L-132 189

Tableau 26 : Analyse des spectres UV-visibles obtenus lors de la filtration sur les colonnes Séphadex™ G-25, de solutions de C[4]S-BTZ à 10^{-2}, 10^{-3} et 10^{-4} mol.L^{-1} 194

Tableau 27 : Résultats des contrôles effectués lors des tests de l'évaluation de l'activité ATS-D anti-coronavirus du C[4]S-BTZ 196

Tableau 28 : Comparaison des temps de neutralisation et du coût des différentes méthodes de neutralisation 214

Tableau 29 : Activité antivirale de la CHX dans différentes conditions 223

Abréviations

AFNOR	Agence française de normalisation
ARN(m) sbg	ARN (messagers) subgénomique
ASTM	"American Society for Testing and Materials" (Organisme Américain pour l'évaluation des méthodes d'analyse et du matériel)
ATS	Antiseptique, Antisepsie
ATS-D	Antiseptique-désinfectant, antisepsie-désinfection
BCoV	"Bovine coronavirus" (coronavirus bovin)
BEV	"Berne equine virus" (virus équin de Berne)
BSA	"Bovine serum albumin" (albumine sérique bovine)
BT	Bleu de Trypan
C[4]S	*tetra-para*-sulfonato-calix[4]arène
C[4]S-BTZ	1,3-bis(bithiazolyl)-*tetra-para*-sulfonato-calix[4]arène
CC_{50}	"Concentration cytotoxique 50%"
$CCID_{50}$	"Cell culture infective dose 50%" (Dose infectant 50% des cellules)
CCoV	"Canine coronavirus" (coronavirus canin)
CEN	Comité Européen de normalisation
CHX	Chlorhexidine (Digluconate de)
Ci	Concentration initiale avant filtration sur colonne de Séphadex™

CI_{50}	Concentration inhibitrice 50%
Cf	Concentration finale après filtration sur colonne de Séphadex™
CoV	Coronavirus
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ε	Coefficient d'absorption molaire
ECP	Effet cytopathogène
EDTA	"Ethylene diamine tetracetic acid" (acide éthylène diamine tétracétique)
FCoV	"Feline coronavirus" (coronavirus félin)
FECV	"Feline enteric coronavirus" (coronavirus entérique félin)
FIP	"Feline infectious peritonitis" (péritonite infectieuse feline)
FIPV	"Feline infectious peritonitis virus" (virus de la péritonite infectieuse féline)
HCoV	"Human Coronavirus" (coronavirus humain)
HIV	"Human immunodeficiency virus" (virus de l'immunodéficience Humaine)
HSV	Herpes Simplex Virus
HXM	Hexamidine (Diiséthionate d')
IBV	"Infectious bronchitis virus" (virus de la bronchite aviaire)
ICTV	"International committee on taxonomy of viruses" (comité international sur la taxonomie des virus)
ILS	Infection liée aux soins
Kb	Kilobase

λ_{max}	Longueur d'onde d'absorption maximum
LS	"Leader sequence" (séquence leader)
MGG	May-Grünwald et Giemsa
MEM	"Minimum essential medium" (Milieu de culture)
MHV	"Murine hepatitis virus" (virus de l'hépatite murine)
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide sous forme réduite
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite
nsp	"non structural proteins" (protéines non structurales)
OMS/WHO	Organisation mondiale de la santé / "World health organization"
ORF	"Open reading frame" (cadre de lecture ouvert)
PBS	"Phosphate buffered saline" (solution tamponnée au phosphate)
PEDV	"Porcine epidemic diarrhea virus" (virus de la diarrhée épidémique porcine)
PIV	Parainfluenzavirus
PRCV	"Porcine respiratory Coronavirus" (Coronavirus respiratoire porcin)
Protéine E	Protéine d'enveloppe
Protéine HE	Protéine d'Hémaglutinine estérase
Protéine M	Protéine de membrane
Protéine N	Protéine de nucléocapside
Protéine S	Protéine de spicule

PVP-I	Polyvinylpyrrolidone iodée
RdRp	"RNA dependante RNA polymerase" (ARN polymérase ARN dépendante)
Rep	Réplicase
RN	Rouge neutre
RNP	Ribonucléoprotéine
RSV	"Respiratory syncytial virus" (virus respiratoire syncytial)
RTC	"Replication-transcription complex" (complexe de réplication-transcription)
SARM	*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline
SARS-CoV	"Severe acute respiratory syndrome associated coronavirus" (coronavirus associé au syndrome respiratoire aigu sévère)
SDAV	"Sialodacryoadenite virus" (virus de la sialodacryoadénite)
SDS	"Sodium dodecyl sulfate" (dodécylsulfate de sodium)
SEP	Sclérose en plaque
SRAS (SARS)	Syndrome Respiratoire Aigu Sévère ("Severe acute respiratory syndrome")
SVF	Sérum de veau fœtal
TCoV	"Turkey coronavirus" (coronavirus de la dinde)
TGEV	"Transmissible gastroenteritis virus" (virus de la gastro-entérite porcine)
TR	Taux de rétention
TRS	"Transcription Regulatory Sequence" (Séquence régulatrice de la transcription)
UTR	"Untranslated region"

INTRODUCTION

L'antisepsie et la désinfection sont des moyens cruciaux pour prévenir la propagation des infections, et notamment des infections virales, que ce soit dans le secteur de la médecine Humaine ou Vétérinaire, domestique ou encore industriel (Figure 1). 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.

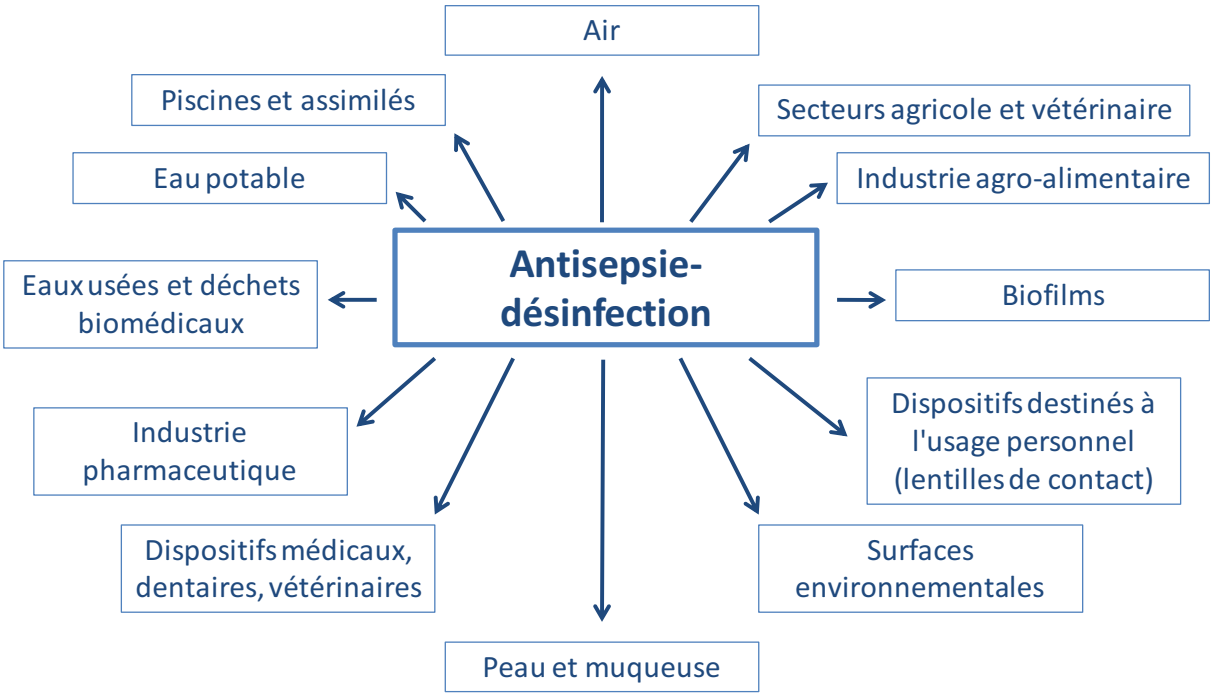


Figure 1 : Les différents secteurs d'utilisation de l'antisepsie-désinfection

La famille des *Coronaviridae* constitue un bel exemple de cette problématique. En effet, depuis les années 1960 et jusqu'en 2002, seuls deux membres de cette famille étaient connus pour infecter l'Homme : les coronavirus Humains, souche 229E (HCoV 229E ou "Human coronavirus 229E") et souche OC43 (HCoV OC43 ou "Human coronavirus OC43"). Réputés pour être responsables d'une large part des rhumes communs (Hamre D. et Procknow J.J., 1966, Holmes K.V., 2001, Larson H.E. *et al.*, 1980), ils ont depuis été impliqués, ainsi que deux autres coronavirus nouvellement identifiés, la souche NL63 et la souche HKU1 (Woo P.C. *et al.*, 2005a), dans des pathologies plus graves, affectant le tractus respiratoire inférieur (Vabret A. *et al.*, 2003, Van Elden L.J. *et al.*, 2004). Ils ont également été reconnus pour être à l'origine d'ILS virales, notamment chez les jeunes enfants et les nouveaux nés (Gagneur A. *et al.*, 2002a, Gagneur A. *et al.*, 2002b, Moes E. *et al.*, 2005, Vabret A. *et al.*, 2008), ainsi que chez les personnes âgées (Falsey A.R. *et al.*, 2002, Nicholson K.G. *et al.*, 1997) et les patients

immunodéprimés (Pene F. *et al.*, 2003). Ces découvertes, récentes, sont intimement liées à l'émergence du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère (SRAS) en 2002-2003, responsable de la première pandémie du 21ème siècle. Ce syndrome était dû à un coronavirus jusqu'alors inconnu et nommé coronavirus associé au SRAS (SARS-CoV ou "Severe Acute Respiratory Syndrome associated coronavirus") (Drosten C. *et al.*, 2003, Ksiazek T.G. *et al.*, 2003, Peiris J.S. *et al.*, 2003b). Cette soudaine émergence ainsi que la rapidité de la propagation de ce syndrome et sa virulence ont réactivé l'intérêt dans cette famille et dans son potentiel impact sur la santé Humaine.

Une autre caractéristique intéressante des *Coronaviridae* est leur résistance potentielle dans différentes conditions environnementales. La prise de conscience, assez récente, de cette potentialité ne concerne pas uniquement les coronavirus mais également d'autres familles de virus enveloppés, ou de virus nus. Des études, résultant de ces découvertes, ont montré le transfert possible de ces virus par l'intermédiaire de surfaces inertes et/ou des mains (Sattar S.A. *et al.*, 1993, Winther B. *et al.*, 2007). Considérant alors la survie des coronavirus dans l'environnement, leur pathogénicité et l'absence de traitement spécifique à leur encontre, une antisepsie-désinfection (ATS-D) efficace et appropriée peut alors permettre la réduction de la transmission des infections dues à ces virus.

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 antiseptique (ATS), 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 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 antivirale des antiseptiques-désinfectants (ATS-D), utilisés en médecine Humaine. Cependant, bien qu'elle ait le mérite d'exister, elle présente des points nécessitant d'être approfondis, ce que nous nous sommes proposés de faire au cours de ce travail.

Nous avons donc développé et validé une méthodologie permettant une amélioration nette des techniques existantes. Pour le développement de cette méthode, le HCoV 229E a été choisi comme virus modèle, et ce pour les raisons suivantes : (i) il est cité comme virus possible dans la norme NF EN 14476+A1, (ii) il est responsable d'infections respiratoires hautes et basses, surtout chez les personnes sensibles, notamment au sein du secteur hospitalier, (iii) les résultats pourraient, dans une certaine mesure, être extrapolés au SARS-CoV et (iv) il s'agit d'un virus qui, bien qu'enveloppé, montre des capacités de survie intéressantes dans différentes conditions (Bibliographie, 3.8, p.91 et 3.9, p.96), ce qui laisse supposer une possible transmission via les surfaces et les mains.

Pour mettre en place et éprouver notre protocole naissant, les activités ATS-D anti-coronavirus de deux molécules, désignées comme molécules de référence : la chlorhexidine et l'hexamidine, ont été évaluées. Ces molécules ont été sélectionnées, entre autres, pour leur large utilisation en médecine Humaine dans l'antisepsie de la peau saine et lésée (Bibliographie, 1.6.1, p.27 et 1.6.2, p.30). Ce choix a aussi résulté de différents essais, discutés plus tard au cours de cet exposé.

Enfin, notre équipe de recherche étant une équipe mixte biologie/chimie, elle a notamment pour objectif la synthèse, le développement et l'évaluation de nouvelles molécules à visée anti-infectieuse, dont les calixarènes font partie. Parmi ces derniers, certains avaient fait preuve, lors d'études préliminaires, d'une certaine activité antivirale (Bibliographie, 2.2.6, p.52). Il apparaissait alors potentiellement intéressant d'intégrer ces molécules dans notre projet afin d'apprécier leur éventuelle activité ATS-D antivirale sur le HCoV 229E. Nous avons ainsi testé deux nouvelles molécules de cette famille chimique, le *tetra-para*-sulfonato-calix[4]arène et le 1,3-bis(bithiazolyl)-*tetra-para*-sulfonato-calix[4]arène.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

Afin de mieux comprendre les enjeux de l'ATS-D, remontons quelque peu le temps pour connaître ses origines et les moyens existant pour son évaluation. Après un tour d'horizon des différentes familles d'ATS-D, de leurs avantages et de leurs inconvénients, nous nous arrêterons sur une famille particulière de molécules : les calixarènes dont nous décrirons l'essentiel des potentialités connues à ce jour. Enfin, nous retracerons l'historique de la famille des *Coronaviridae* avec notamment l'émergence, en 2002, du SARS-CoV. Nous dépeindrons les grandes caractéristiques de cette famille, i.e. particularités de leur mode de réplication, pouvoir pathogène et leur comportement face aux ATS-D et aux conditions environnementales.

1 L'antisepsie-désinfection : les agents et l'évaluation de leur activité antivirale

1.1 L'antisepsie au cours du temps

L'antisepsie a accompagné l'Homme, de façon empirique, très tôt au cours de son Histoire. Dès la haute Antiquité, les épices ou autres essences étaient utilisées par les Egyptiens pour lutter contre les phénomènes de putréfaction des plaies et des cadavres. En Perse, l'emploi de récipients en cuivre ou en argent pour conserver l'eau avait été préconisé pour les propriétés de certains métaux d'empêcher ce qui était appelée la "corruption" de l'eau.

Au 5ème siècle avant Jésus-Christ, Hippocrate, père de la médecine, recommandait pour traiter les infections cutanées et les blessures le recours au vinaigre et au vin, c'est-à-dire aux substances acides et aux alcools.

C'est au 18ème siècle que Sir John Pringle, médecin britannique, a introduit pour la première fois le terme antiseptique dans un article publié par la "Royal Society" : "*Experiments on Septic and Antiseptic Substances*", suite à ses études sur les épidémies au sein des armées et des garnisons.

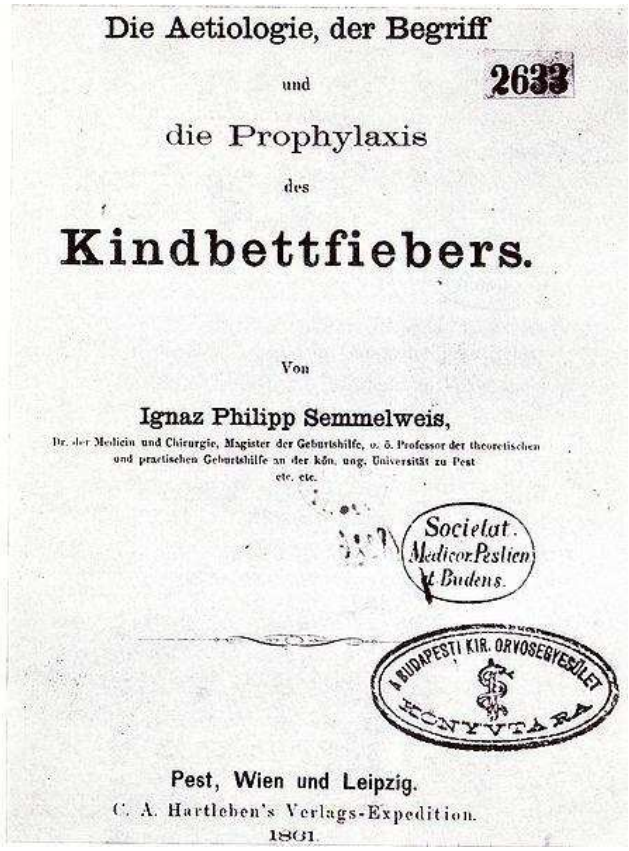

Die Aetiologie, der Begriff
und
2633
die Prophylaxis
des
Kindbettfiebers.
Von
Ignaz Philipp Semmelweis,
Societat. Medicor. Peslien. et Budens.
A BUDAPESTI KIR. ORVOSEGYESÜLET KÖNYVTÁRA
Pest, Wien und Leipzig.
C. A. Hartleben's Verlags-Expedition.
1861.

Figure 2 : Page de garde de l'œuvre majeure de Semmelweis

Etiologie, signification et prophylaxie de la fièvre puerpérale (1861).

Semmelweis et l'initiation au lavage des mains

Cependant, le véritable père de l'ATS fut Ignace-Philippe Semmelweis (1818-1865), médecin obstétricien à Vienne. Son action principale fut de faire régresser l'épidémie de fièvre puerpérale qui sévissait à la maternité universitaire, ce qu'il fit non sans mal puisque cela lui coûta par deux fois la révocation.

C'est à l'hôpital général de Vienne que Semmelweis commença à étudier les causes de la fièvre puerpérale, malgré la résistance de ses supérieurs qui croyaient impossible de la prévenir, l'attribuant au confinement, à la promiscuité et à une mauvaise aération. En Juillet 1846, Semmelweis fut nommé chef de clinique dans le service de la maternité où il eut à faire face à un taux de 13% de mortalité maternelle et néonatale, dû à la fièvre puerpérale. En Avril 1847, ce taux atteignit 18%. Curieusement, un deuxième service de maternité avait, pour la même maladie, un taux de mortalité de 2% seulement, alors que ces deux services étaient situés dans le même hôpital et employaient les mêmes techniques. La seule différence était le personnel qui y travaillait : le premier servait à l'instruction des étudiants en Médecine, tandis que le second avait été choisi pour la formation des sages-femmes.

En 1847, la mort d'un de ses amis, professeur d'anatomie, lui ouvrit les yeux : ce dernier décéda en effet d'une infection, après s'être blessé accidentellement au doigt avec un bistouri, au cours de la dissection d'un cadavre. Son autopsie révéla une pathologie identique à celle des femmes mortes de la fièvre puerpérale. Semmelweis vit très rapidement le rapport entre la contamination par les cadavres et la fièvre puerpérale. Il en conclut que les étudiants et les médecins apportaient sur leurs mains, depuis la salle d'autopsie, des particules contaminantes aux patientes qu'ils soignaient.

À l'époque, la théorie des maladies microbiennes n'avait pas encore été formulée, c'est pourquoi Semmelweis conclut que c'était une substance cadavérique inconnue qui provoquait la fièvre puerpérale. Il prescrivit alors, en mai 1847, l'emploi d'une solution d'hypochlorite de calcium pour le lavage des mains entre le travail d'autopsie et l'examen des patientes ; le taux de mortalité chuta alors de 12% à 2,4% (Figure 2).

Malgré un résultat aussi spectaculaire, la communauté médicale de l'époque ne lui apporta pas le soutien nécessaire. Ses observations allaient contre l'opinion qui prévalait alors chez les scientifiques, lesquels attribuaient encore les maladies à un déséquilibre dans le corps des "quatre humeurs fondamentales", une théorie connue sous le nom de dyscrasie et datant tout de même d'Hippocrate. En outre, la surcharge de travail imposée par le lavage des mains avant de s'occuper de chaque parturiente a été débattue. Les médecins n'avaient, de plus, aucune envie d'avouer qu'ils étaient responsables de tant de morts, même de façon involontaire… Enfin, un autre préjugé était que cette thèse semblait ne reposer sur aucune base scientifique, puisqu'aucune justification ne pouvait être donnée. Cette explication ne viendra que quelques décennies plus tard quand Pasteur, Lister et d'autres pionniers auront développé la théorie microbienne des maladies transmissibles.

Les époques Pasteurienne et Listerienne

Ainsi, Louis Pasteur (1822-1895), était un scientifique français, chimiste et physicien de formation et un pionnier de la microbiologie (Figure 3). Après avoir travaillé sur la cristallographie et la chiralité moléculaire, ses travaux ont dérivé vers l'étude de la fermentation où il mit en exergue l'intervention de microorganismes vivants. A partir de 1859, son combat contre la notion de "génération spontanée" l'amena, après quelques années de recherche, à prouver l'existence des "microbes". Puis, en 1863, suite à des maladies affectant les vignes et grevant lourdement le commerce du vin, Napoléon III demanda à Pasteur, reconnu comme spécialiste de la fermentation et de la putréfaction, de chercher un remède. Pasteur proposa alors de chauffer le vin à 57°C afin de tuer les "germes" et résolut ainsi le problème de la conservation et du transport du vin. La pasteurisation était née.

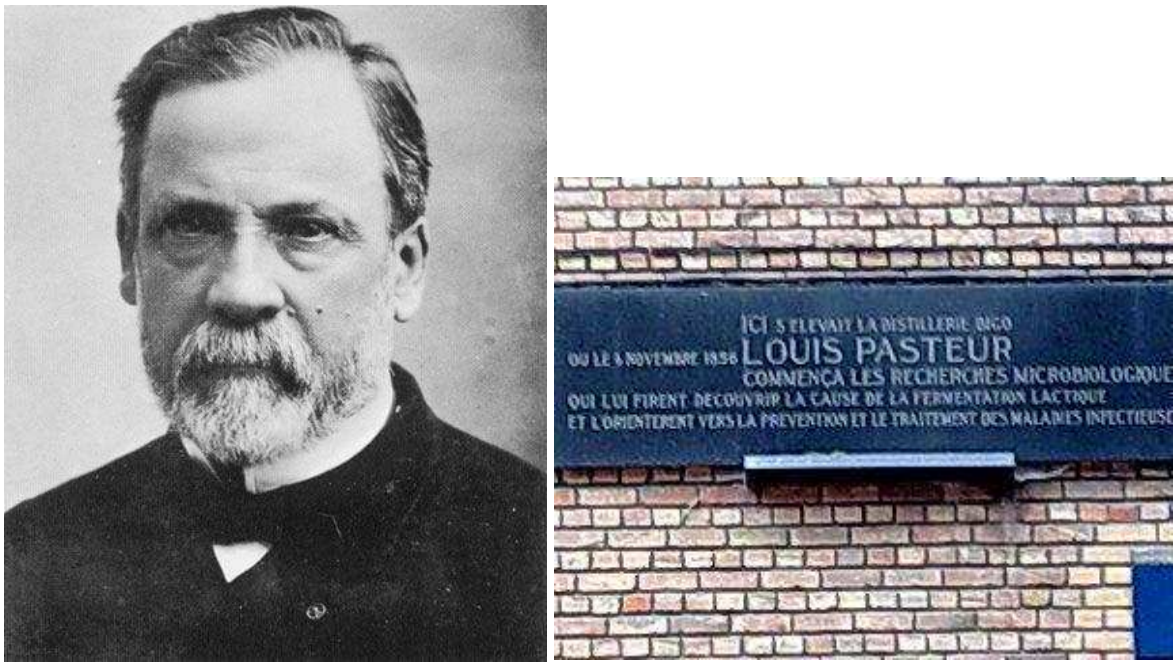


Figure 3 : Louis Pasteur

Photo de Louis Pasteur prise en 1878 et de la plaque commémorative prise sur l'ancienne distillerie de Lille où Louis Pasteur travaillait sur la fermentation lactique et commença ses recherches en microbiologie et sur la prévention des maladies infectieuses.

Le chirurgien Anglais Joseph Lister, après avoir lu les travaux de Pasteur, proposa, en 1867, que les infections post-opératoires étaient dues, elles aussi, à des organismes microscopiques. Utilisant alors le phénol sur les plaies de ses opérés, il induisit ainsi une réduction drastique des infections et de la mortalité. Il préconisait également une vaporisation de phénol pour tuer les microorganismes présents dans l'air. L'antisepsie "listérienne" était donc bien une manière de combattre les "germes". Cependant, cette méthode présentait des limites, notamment parce que Lister n'avait pas pensé à l'eau comme moyen de propagation.

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 revint alors sur le devant de la scène, en attirant l'attention 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

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 décrivirent les critères indispensables de leur évaluation *in vitro*, travaux qui préludaient à l'établissement de nos normes modernes d'efficacité. Ils insistaient 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, 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).

1.2 Les principes fondamentaux de l'évaluation de l'activité ATS-D antivirale

Le but de l'évaluation de l'activité ATS-D d'agents chimiques est de s'assurer que les ATS-D utilisés vont être 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 autres.

Bien que de nombreux ATS-D soient communs à différents pays, les méthodes normatives spécifiant leur activité microbicide diffèrent. Par ailleurs, même si le principe général de l'évaluation de cette activité pourrait paraître simple, il doit tenir compte d'un grand nombre de facteurs pour garantir la reproductibilité et la fiabilité des résultats obtenus. Cependant, il existe, depuis maintenant quelques décennies, des règles générales adoptées, quels que soient les normes ou les microorganismes testés.

Il existe trois principales étapes dans l'évaluation de l'activité ATS-D : (i) les tests préliminaires permettant le criblage de molécules potentiellement ATS-D et 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.

1.3 Les différents types des tests

1.3.1 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.

1.3.2 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, morceau de 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, par immersion ou par spray. 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 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, Lambert R.J.W., 2004, Sattar S.A. *et al.*, 2003).

1.3.3 Les tests évaluant la pratique réelle

Les tests réalisés "hors laboratoire" sont des tests destinés à évaluer l'efficacité d'un désinfectant au cours de procédures de désinfection (surface, sols, instruments médico-chirurgicaux, etc.) utilisées en pratique réelle. Cependant, les résultats apportés par de telles études sont peu fiables et ce pour des raisons pratiques. D'une part, il ne peut s'agir que de tests qualitatifs. En effet, l'ignorance de l'inoculum de départ implique que l'on ne pourra pas connaître le taux de réduction du titre des microorganismes. Par ailleurs, à moins que les microorganismes ne soient en quantité importante avant la désinfection, la détection et la quantification de microorganismes est assez incertaine. Cependant, de tels tests peuvent être utiles pour vérifier que les conditions optimales d'utilisation d'un agent ATS-D, établies préalablement lors des tests en suspension ou sur support, sont vérifiées en pratique (Crémieux A*., et al.*, 2001).

Par exemple, Deva et coll. ont mené une étude sur les risques de transmission du virus de l'hépatite B par les laparoscopes et l'efficacité de la désinfection par du glutaraldéhyde à 2%. Ils ont pour cela utilisé un modèle viral, l'hepadnavirus du canard. Ils ont réalisé de multiples biopsies laparoscopiques du foie chez des canards atteints par ce virus. Les laparoscopes ont ensuite été soumis à différents processus de désinfection, dont l'application de glutaraldéhyde à 2%. L'infectiosité résiduelle a été

ensuite vérifiée par introduction des pointes de laparoscopes dans la cavité péritonéale de jeunes cannetons de quatre jours, non infectés.
Ils ont alors constaté que sans aucun lavage, il s'était produit une transmission directe du virus chez tous les cannetons, soit un taux de transmission de 100%. Un simple rinçage à l'eau a permis la réduction du taux de transmission à 64%. Enfin, lorsque les laparoscopes étaient soumis à l'action du glutaraldéhyde à 2% pendant 5 min, le taux de transmission devenait nul.
Cependant, les études *in vitro* antérieures montraient que le glutaraldéhyde permettait une inactivation virale complète dans des délais plus brefs. Ils ont alors postulé que le temps d'inactivation plus long observé en pratique pourrait résulter d'une interaction entre le virus et la surface de l'instrument et/ou une limitation de l'accès du virus par le glutaraldéhyde (Deva A.K. *et al.*, 1996). Cette étude souligne l'intérêt de tels tests, qui peuvent par ailleurs permettre une meilleure compréhension de la transmission des ILS, mais elle insiste aussi sur les difficultés pratiques inhérentes à de telles études.

1.3.4 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 vice versa (Ansari S.A. *et al.*, 1988, Ansari S.A. *et al.*, 1991b, Mbithi J.N. *et al.*, 1992).

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). Ce protocole a été adopté par la société Américaine de normalisation en 2002 (ASTM, 2002b).

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, i.e. 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.

1.4 L'évaluation de l'activité ATS antivirale et ses particularités

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 antivirale repose donc sur les principes généraux de l'évaluation de l'activité ATS avec quelques modifications inhérentes à la présence de virus (Figure 4) : (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.

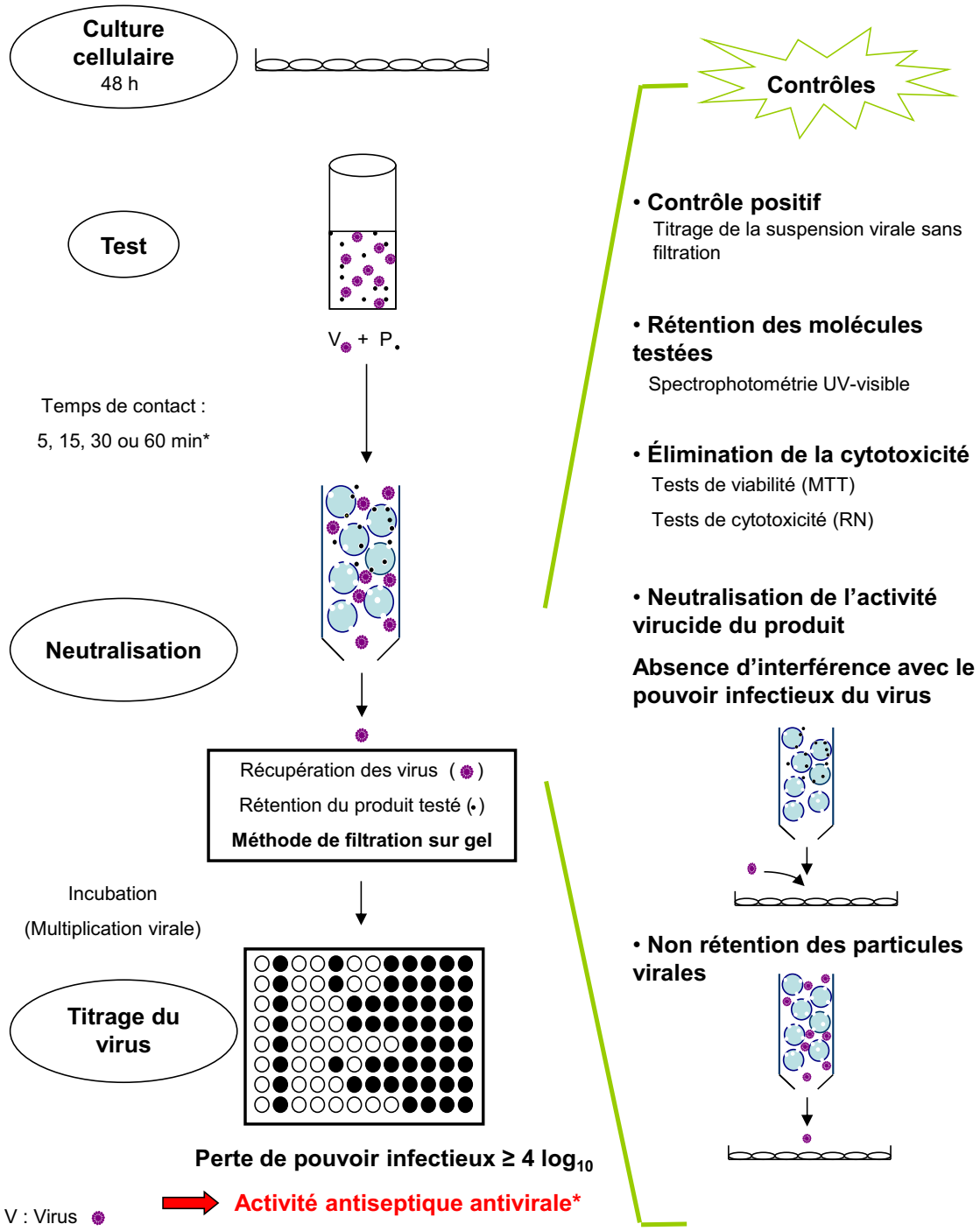


Figure 4 : Principe de l'évaluation de l'activité ATS-D antivirale

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

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.

1.4.1 Les étapes critiques : Neutralisation et cytotoxicité

1.4.1.1 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 dramatiquement 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 (Bibliographie, 1.6.7.2, p.43). Certains mélanges

neutralisants ont été développés comme le bouillon Dey-Engley ayant la capacité de neutraliser différents composés chimiques, un exemple est donné dans le Tableau 29, p.223 (Sutton S.V. *et al.*, 1991). 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.W., 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 5).

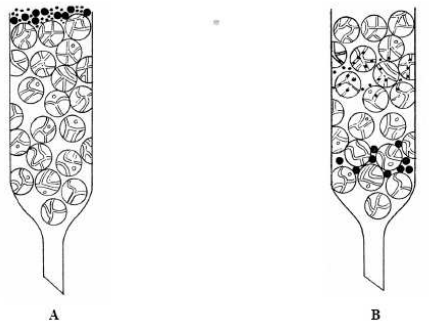


Figure 5 : Principe de la filtration sur gel

(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.

Contrôle de neutralisation et de l'interférence sur l'infectivité virale

Cette étape de neutralisation, quelle que soit la méthode choisie, 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.

1.4.1.2 La 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 réplication virale et de vérifier qu'il n'y a pas de cytotoxicité visible.

Ces contrôles, s'ils doivent toujours faire partie des tests d'ATS antivirale, peuvent différer dans leur méthodologie selon les souches virales ou encore les méthodes de neutralisation. De plus, les tests de cytotoxicité et d'interférence doivent être réalisés au préalable avec l'ATS-D seul et le neutralisant, que ce soit un neutralisant chimique ou alors le filtrat obtenu après filtration du solvant.

1.4.2 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 (l'expression "on ne désinfecte que ce qui est propre" trouve ici un sens plus concret). 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 (chlorhexidine, 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 ou de la mucine bovine. La mucine bovine a par exemple été utilisée à la concentration de 5 $mg.mL^{-1}$ 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 influer sur leur activité. De plus, il semble important de tester différents lots de produits pour s'assurer de la reproductibilité des résultats.

Dans le cadre des tests sur support et considérant les grandes variations existant entre les virus quant à leur résistance au séchage, il est important connaître le taux de survie des virus testés après séchage pour permettre de définir au mieux les conditions environnantes (temps, température, humidité relative).

1.5 Le contexte normatif

1.5.1 Généralités

Le Comité Européen de Normalisation (CEN), et plus précisément le comité technique 216 "Antiseptiques et désinfectants chimiques" (CEN/TC 216), définit le contexte de l'évaluation de l'activité antiseptique et désinfectante des agents chimiques sur les différents micro-organismes et vise à unifier les méthodes pratiquées au sein des différents pays. Comme cela est prévu dans le cadre Européen, l'agence française de normalisation (AFNOR) retranscrit ces normes Européennes en normes Françaises.

La norme NF EN 14885 (AFNOR, 2006a) permet de définir le cadre général d'application de ces normes. Trois domaines d'application sont concernés : (i) le domaine de la médecine Humaine, qui nous intéresse tout particulièrement, (ii) le domaine vétérinaire et (iii) un troisième domaine comprenant les secteurs alimentaire, industriel, domestique et professionnel. Les secteurs relevant

du domaine de la médecine Humaine sont les hôpitaux et autres établissements médicaux dont les centres de soins dentaires, les infirmeries d'écoles, de crèches mais aussi le lieu de travail ou de domicile ainsi que des entreprises de services comme les blanchisseries ou les cuisines fournissant directement des produits pour le patient.

Les normes élaborées par ce comité spécifient les méthodes de laboratoire à utiliser pour tester l'activité des produits (désinfectants chimiques, antiseptiques) en vue d'appuyer les revendications leur prêtant des propriétés spécifiques, adaptées à leur application prévue, dans le domaine d'application choisi.

Elles ont pour objet : (i) de permettre aux fabricants de produits de choisir les normes à utiliser pour évaluer l'activité spécifique d'un agent chimique dans un domaine d'application particulier, (ii) de permettre aux utilisateurs du produit d'évaluer l'information fournie par le fabricant en fonction de l'usage prévu du produit et (iii) d'aider les organismes compétents à évaluer les revendications du fabricant.

Les essais sont classés en différentes catégories, i.e. essais de phase 1, 2 et 3 selon le niveau de preuve apporté (Tableau 1). Ainsi, pour pouvoir revendiquer qu'un produit a des propriétés ATS-D et qu'il peut être utilisé dans le domaine de la médecine Humaine, il faut le soumettre à des essais dépendants de normes spécifiques en fonction du type de produit, de son spectre d'activité (bactéricide, virucide, etc.) en vue d'une utilisation précise (Tableau 2). Il est également précisé qu'il n'est pas nécessaire de soumettre les produits devant être utilisés dans le domaine médical à des essais de phase 1 ; les normes spécifiques pour ces produits ne comportant que des essais de phase 2, étapes 1 et/ou 2.

1.5.2 Normes Européennes pour l'évaluation de l'activité virucide des ATS-D

Dans le cadre plus particulier de notre étude, pour revendiquer une activité virucide en médecine Humaine, il n'existe à ce jour qu'une seule norme Européenne, la norme NF EN 14476+A1 (AFNOR, 2007) alors qu'il en existe tout un panel pour évaluer l'activité antibactérienne. Il existe cependant deux autres normes pour tester les ATS-D antiviraux, une applicable au domaine vétérinaire, la norme NF EN 14675 (AFNOR, 2006b) et une applicable au domaine agro-alimentaire et industriel, la norme NF EN 13610 (AFNOR, 2003) mais faisant appel à des bactériophages, utilisés alors comme virus modèles.

Catégorie de l'essai	Description et finalité	Commentaire
Phase 1	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
Phase 2		
Phase 2, Etape 1	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…)	
Phase 2, Etape 2	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	
Phase 3	Essais de terrain dans des conditions pratiques	On ne dispose pas actuellement d'une méthodologie validée pour ce type d'essai

Tableau 1 : Les différentes catégories d'essais permettant l'évaluation de l'activité d'un biocide

(AFNOR, 2006a)

Type et/ou destination du produit	Phase, Etape	Revendication d'activité				
		Bactéricide	Fongicide / Levuricide	Mycobactéricide / Tuberculocide	Virucide	Sporicide
Lavage hygiénique des mains	2,1	prEN12054	+++	+++	EN 14476	+++
	2,2	EN 1499	+++	+++	+++	+++
Traitement hygiénique des mains par friction	2,1	prEN 12054	+++	+++	EN 14476	+++
	2,2	EN1500	+++	+++	+++	+++
Désinfectants chirurgicaux pour les mains (lavage et friction)	2,1	prEN12054	+++	+++	+++	+++
	2,2	EN 12791	+++	+++	+++	+++
Désinfection des surfaces	2,1	++	++	EN 14348	EN 14476	++
	2,2*	++	++	++	++	++
Désinfection des instruments	2,1	EN 13727	EN 13624	EN 14348	EN 14476	+
	2,2*	EN 14561	EN 14562	EN 14563	+	+
Traitement de l'eau	2,1	+++	+++	+++	+++	+++

Tableau 2 : Méthodes d'essais normalisées pour les revendications des produits à visée désinfectante dans le domaine de la médecine Humaine

(AFNOR, 2006a)
+ Sujet d'étude approuvé, ++ Aucun sujet d'étude actuellement approuvé mais des normes seront peut-être élaborées à cet effet, +++ il n'est pas prévu de développer un essai
* Ajout des conditions de propreté/saleté

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, i.e. la désinfection de surfaces et d'instruments, le lavage hygiénique ou chirurgical des mains ou encore la 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 3). 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.

Conditions d'essai	Désinfectants de surfaces et d'instruments	Lavage et imprégnation hygiéniques des mains	Mode opératoire de désinfection chimiothermique
Virus d'essai	*Poliovirus* et *Adénovirus*	*Poliovirus* et *Adénovirus*	*Parvovirus*
Température d'essai	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
Temps de contact **a) Obligatoire** **b) Supplémentaire**	60 min 5 min, 15 min, 30 min	1 min ou 30 s, si le fabricant recommande < 1 min 3 min	Conformément au temps de contact recommandé par le fabricant, mais n'excédant pas 60 min _
Substances interférentes **a) Propreté** **et/ou** **b) Saleté**	0,3 $g.L^{-1}$ de BSA¤ et/ou 3,0 $g.L^{-1}$ de BSA¤ + 3 mL d'érythrocytes	PBS* _	0,3 $g.L^{-1}$ de BSA¤ et/ou 3,0 $g.L^{-1}$ de BSA¤ + 3 mL d'érythrocytes

Tableau 3 : Conditions d'essai requises par la norme NF EN 14476+A1

(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 $\log_{10}$ dans le titre viral 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).

1.5.3 Normes Américaines pour l'évaluation de l'activité virucide des ATS-D

De la même façon, l'organisme de normalisation Américain, l'ASTM ("American Society for Testing and Materials"), et plus précisément le comité E35, sous-comité E35.15, a élaboré pas moins de 45 normes pour évaluer l'activité ATS-D des agents chimiques, tous microorganismes confondus. Nous retrouvons parmi ces normes, les normes de base comme les tests en suspension mais également des normes proposant un cadre pour des évaluations pratiques comme différents tests sur support, des tests pour évaluer l'activité ATS-D des produits pour le lavage des mains, des produits nettoyants pour les toilettes ou encore des normes permettant l'évaluation de la formation de biofilms (liste non exhaustive). Concernant l'activité ATS antivirale, ce comité a établi six normes dont la liste est précisée dans le Tableau 4.

Code de la norme ASTM	Intitulé de la norme	Références
E1052-96 (révisée en 2002)	Méthode de test standard en suspension pour l'évaluation de l'efficacité des agents antimicrobiens contre les virus.	(ASTM, 2002b)
E1053-97 (révisée en 2002)	Méthode de test standard pour l'évaluation de l'efficacité des agents antimicrobiens destinée à la désinfection des surfaces environnementales inanimées.	(ASTM, 1997)
E1482-04	Méthode standard de neutralisation des agents virucides dans le cadre de l'évaluation de l'efficacité antivirale.	(ASTM, 2004)
E1838-02	Méthode de test standard pour la détermination de l'efficacité de l'élimination des virus par des agents de lavage et/ou de friction des mains faisant appel à la pulpe des doigts de volontaires adultes.	(ASTM, 2002b)
E2011-09	Méthode de test standard pour l'évaluation de l'activité antivirale de formulations destinées au lavage hygiénique et/ou à la friction des mains utilisant les mains entières.	(ASTM, 2009)
E2197-02	Méthode de test standard quantitative sur disque pour déterminer les activités bactéricide, virucide, fongicide, mycobactéricide et sporicide des agents chimiques liquides à visée germicide.	(ASTM, 2002a)

Tableau 4 : Liste des normes ASTM pour l'évaluation de l'activité ATS antivirale

Ces normes, comme les normes Européennes, posent les schémas de base des différents tests en indiquant notamment les souches virales recommandées ou encore la nature des matières organiques à ajouter pour mimer les conditions dites "sales". Cependant, bien qu'elles soient plus

nombreuses, elles sont moins précises, tout du moins sur certains points. Par exemple, dans la norme E1052-96 définissant la méthodologie pour les tests en suspension, les temps de contact ne sont pas précisés. Cette norme indique qu'il faut utiliser les temps de contact appropriés selon les conditions d'usage ou selon les recommandations du fabricant (ASTM, 2002b). Nous pouvons aussi noter que les premières normes Américaines concernant l'évaluation de l'activité ATS antivirale sont beaucoup plus anciennes que les normes Européennes, puisque la première d'entre elles date de 1996.

1.6 Les grandes familles chimiques d'antiseptiques-désinfectants

De nombreuses familles chimiques rassemblent des composés aux propriétés ATS-D. Parmi ces familles, nous verrons, entre autres, celles de la chlorhexidine et de l'hexamidine, les deux molécules de référence utilisées 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 et les origines des grandes familles d'ATS-D.

1.6.1 Les bisbiguanides et la chlorhexidine

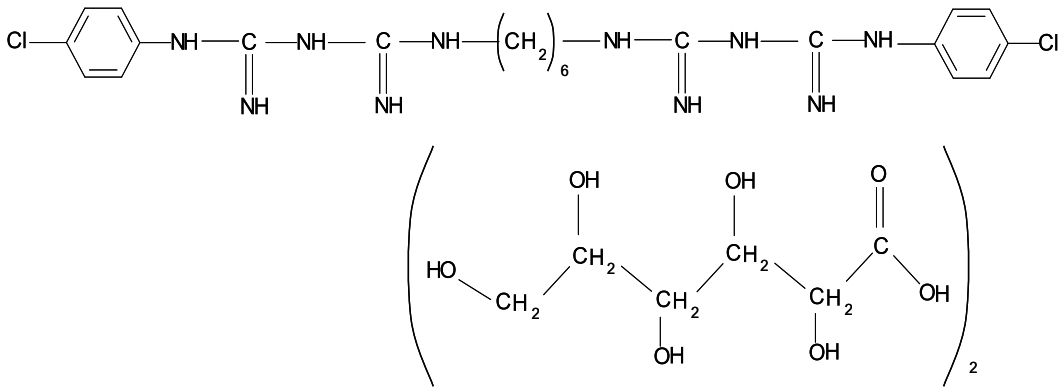


Figure 6 : Digluconate de chlorhexidine (CHX)

Origine et utilisation

La chlorhexidine 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 chlorhexidine 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 chlorhexidine 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, répondant à la formule $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$, dont la structure est représentée dans la Figure 6. 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, que ce soit dans notre étude ou dans ses formes commerciales, pour accroître sa solubilité dans l'eau. La masse moléculaire du digluconate de chlorhexidine (CAS RN : 18472-51-0, nommé CHX dans la suite de notre étude) est de 897,80 $g.mol^{-1}$. 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 chlorhexidine est compatible avec les ATS-D cationiques tensio-actifs que sont les ammoniums quaternaires, tels le bromure de cétrimonium ou cétrimide, qui augmente sa solubilité et son action antimicrobienne et aussi avec les alcools et quelques dérivés phénoliques. La CHX est d'ailleurs très souvent utilisée en association avec le cétrimide (ou d'autres ammoniums quaternaires) et/ou avec l'alcool.

Elle est cependant incompatible avec d'autres ATS-D majeurs comme les halogénés ou les aldéhydes et aussi avec les dérivés mercuriels, le nitrate d'argent, le sulfate de zinc et de cuivre. Elle est incompatible avec les dérivés anioniques, i.e. savons, alginates, lauryl sulfate de sodium (ou sodium dodécyl sulfate ou SDS), les anions minéraux comme les sels de sulfate et certains colorants de nature anionique (éosine, fluorescéine). Les substances non ioniques comme les polysorbates ne sont pas incompatibles avec la CHX mais ils peuvent l'inactiver. Il faut alors jouer sur les concentrations relatives lorsque l'on veut les associer, ce qui peut avoir un intérêt notamment pour augmenter la solubilisation.

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. La perte d'activité est d'environ 10% par an.

Mécanismes d'action

Son activité antibactérienne est due à l'interaction avec les charges électronégatives de la surface bactérienne. L'adsorption de la CHX sur la cellule est très rapide, proportionnelle à la concentration de l'antiseptique et à l'inoculum bactérien. Elle altère la membrane cytoplasmique aboutissant à sa destruction et entraîne aussi des changements d'hydrophobicité de la bactérie. Les altérations membranaires expliquent aussi en partie l'activité antifongique et certainement celle 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.

Propriétés antibactériennes

La CHX est active sur de nombreux microorganismes. Son activité ATS est maximale à des pH compris entre 5,5 et 7,0 et peut être diminuée par la présence de substances organiques. La CHX en solution aqueuse est active sur la majorité des formes végétatives des bactéries à Gram positif et négatif. Selon les concentrations et les souches de bactéries, elle peut avoir une action bactériostatique ou bactéricide (Fleurette J.*, et al.*, 1995).

Propriétés antivirales

Son activité virucide varie selon les classes de virus, i.e. nus ou enveloppés. La CHX n'a, en général, pas d'activité ATS-D sur les virus nus, comme le poliovirus, les échovirus, les coxsackievirus ou encore le rotavirus Humain (Bernstein D. *et al.*, 1990, Kurtz J.B., 1979, Narang H.K. et Codd A.A., 1983, Papageorgiou G.T. *et al.*, 2001, Springthorpe V.S. *et al.*, 1986) mais son activité se révèle en général bonne sur les virus enveloppés, tels que le virus Herpes simplex ou HSV ("Herpes simplex virus") de type 1, le cytomégalovirus, le virus influenza de type A, le virus parainfluenza ou PIV ("Parainfluenzavirus") de type 3 et le virus de l'immunodéficience Humaine ou HIV ("Human immunodeficiency virus") de type 1 (Baqui A.A. *et al.*, 2001, Bernstein D.*, et al.*, 1990).

Les propriétés ATS de la CHX, comme des autres molécules, 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 de type 1 et 2 mais elle s'est révélée inactive dans les mêmes conditions sur un poliovirus de type 2 et sur un adénovirus de type 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 HIV-1 qu'après un temps de contact de 10 min. De plus, cette association était inactive sur les virus nus tels que le poliovirus de type 1, l'adénovirus de type 25 et un coxsackievirus Humain, ce qui renforce les résultats précédents, mais également 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 RSV ("respiratory syncytial virus" ou virus respiratoire syncytial) 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 RSV alors que si le détergent (poloxamère 237, contenu dans l'Hibiscrub®) était associé, l'activité devenait nettement appréciable. L'activité anti-RSV 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).

1.6.2 Les diamidines aromatiques et l'hexamidine

Origines

L'hexamidine (CAS : 3811-75-4) ou (hexaméthylènedioxy)4,4'dibenzamidine bis-(hydroxy-2 éthanesulfonate), dont la structure est représentée dans la Figure 7, appartient au groupe des diamidines aromatiques. Ces molécules furent mises en évidence dans les années 1920 pour leurs propriétés antidiabétiques. Les propriétés antimicrobiennes des diamidines ont d'abord été décrites vis-à-vis des protozoaires comme les leishmanies, les trypanosomes ou encore le pneumocystis. La

pentamidine, une diamidine aromatique, est commercialisée sous le nom de Pentacarinat® et utilisée dans le traitement préventif et curatif des infections à *Pneumocystis jirovecii* chez le patient immunodéprimé, dans le traitement des leishmanioses viscérales et cutanées ainsi que dans le traitement de la maladie du sommeil due à *Trypanosoma brucei*.

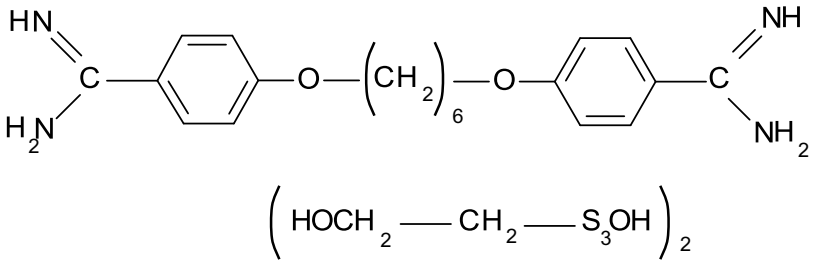


Figure 7 : Diiséthionate d'hexamidine (HXM)

Propriétés physico-chimiques

Les amidines sont des bases renfermant une fonction imine et une fonction amine sur le même atome de carbone. Les diverses diamidines varient en fonction de la longueur de la chaîne carbonée centrale et montrent une activité maximale lorsque cette chaîne possède entre six et neuf atomes de carbone.

L'hexamidine est insoluble dans l'eau et se présente sous forme d'une poudre blanche. Pour cette raison, elle est utilisée sous forme de sels tels que le diiséthionate d'hexamidine (nommé HXM dans cet exposé, CAS RN : 659-40-5) dont la solubilité est de 55 $g.L^{-1}$ dans l'eau et que l'on retrouve aussi bien dans les formulations pharmaceutiques que dans notre étude. La solution aqueuse est incolore. L'HXM est également soluble dans l'alcool à 30%, les solutions hydroalcooliques étant plus stables que les solutions aqueuses. La masse moléculaire de l'HXM est de 606,72 $g.mol^{-1}$.

Mécanisme d'action et propriétés microbicides

Le mode d'action de l'hexamidine 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. L'activité est favorisée par un pH alcalin et faiblement réduite par les substances protéiques (Fleurette J., 1995).

L'HXM montre une activité bactériostatique voire lentement bactéricide, surtout sur les cocci à Gram positif, les bactéries à Gram négatif étant naturellement résistantes. L'HXM est également active sur

Candida albicans. A notre connaissance, aucune étude n'a examiné le pouvoir virucide de l'HXM, si ce n'est dans la publication émanant de ce travail (Geller C. *et al.*, 2009).

Utilisation

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.

1.6.3 Les alcools

Origines et propriétés générales

Les alcools semblent être utilisés depuis des temps très reculés pour leurs propriétés ATS en médication interne, sous forme de vin ou autres boissons fermentées. Cependant, la première synthèse d'éthanol n'a été réalisée qu'en 1855 par Hermet et Berthelot. Il n'était obtenu jusque-là que par la fermentation de certains sucres puis par des procédés de distillation qui ont permis d'augmenter les concentrations en alcool. Ce n'est qu'à la fin du 19ème 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 pouvoir faible 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, que ce soit sur les bactéries ou les virus. Ainsi une solution d'éthanol à 70% induit une réduction supérieure à 4 $\log_{10}$ du titre viral de l'HSV-1 en 1 min alors qu'une solution à 95% n'induit une réduction que de 0,3 $\log_{10}$ en 1 min et de 1,2 $\log_{10}$ en 10 min (Tyler R. et Ayliffe G.A., 1987). Par ailleurs, une certaine hydratation facilite l'entrée de l'éthanol dans les cellules bactériennes. Les alcools pourraient également agir au niveau du métabolisme de la bactérie par inhibition de la production de métabolites. De plus, à faibles concentrations, de l'ordre de 20%, l'éthanol peut présenter des propriétés bactériostatiques réversibles qui seraient causées par l'inhibition de la production de certains métabolites indispensables à la division cellulaire (Fleurette J*., et al.*, 1995).

Les mécanismes d'action virucides 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. Il a en effet été montré qu'une solution d'éthanol à 20% était capable de réduire efficacement l'activité de la transcriptase inverse du HIV (Spire B. *et al.*, 1984).

Propriétés virucides

Les alcools, et plus particulièrement les solutions à base d'éthanol ou d'isopropanol semblent efficaces contre les virus, même nus et donc, dans la prévention de la transmission des ILS virales, notamment par les mains (Steinmann J., 2005). Ainsi, des solutions d'alcool (éthanol, isopropanol) ont permis une réduction efficace des titres viraux de virus nus comme les rhinovirus, le rotavirus Humain, le virus de l'hépatite A, le poliovirus ou encore l'adénovirus de type 5 (Ansari S.A*., et al.*, 1989, Mbithi J.N. *et al.*, 1993, Sattar S.A*., et al.*, 1993, Sattar S.A*., et al.*, 1989), réduisant par là même, la possibilité de transfert de virus à partir de surfaces contaminées (Mbithi J.N*., et al.*, 1993). Cependant, l'éthanol à 70% est incapable de réduire de façon efficace le titre viral d'un coxsackievirus (Sattar S.A*., et al.*, 1989). Ceci souligne l'importance du choix des ATS-D, dont nous reparlerons au cours de cet exposé, selon les conditions et les virus potentiellement contaminants de la surface à désinfecter.

Par ailleurs, et de façon non surprenante, les alcools manifestent une très bonne activité sur les virus enveloppés tels que le RSV ou le HSV-1 (Platt J. et Bucknall R.A., 1985, Tyler R. et Ayliffe G.A., 1987).

Des études menées sur les coronavirus ont confirmé cette activité. Le HCoV 229E est en effet inactivé par l'éthanol à 70% en 1 min. De même, des solutions alcooliques, notamment celles utilisées pour la désinfection des mains, y compris une solution d'éthanol à 95%, ont permis la réduction du titre viral du SARS-CoV de 4 $\log_{10}$ en 1 à 2 min (Kariwa H. *et al.*, 2006, Rabenau H.F. *et al.*, 2005a, Sattar S.A.*, et al.*, 1989).

1.6.4 Les dérivés halogénés

1.6.4.1 Les dérivés iodés

Origines

L'iode a été découvert en 1811 par Bernard Courtois mais son utilisation empirique dans le traitement du goître remonte au moins au Moyen-âge. Au 19ème siècle, il 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. Dans la nature, l'iode n'existe qu'à l'état d'iodure et/ou d'iodate et est présent majoritairement dans l'eau de mer et certaines eaux minérales. 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. Son action bactéricide est très rapide et est due à la réaction avec les enzymes de la chaîne respiratoire et avec les acides aminés des protéines. L'iode agit comme un accepteur d'électrons et bloque le transport de ces derniers au niveau des enzymes de la chaîne respiratoire, entraînant des dommages irréversibles chez la bactérie. 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 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. La PVP-I est active sur les bactéries à Gram positif et négatif, notamment sur des souches résistantes comme les SARM (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline), les champignons et les protozoaires (Fleurette J.*, et al.*, 1995).

Activité virucide

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 nus tels que le rotavirus, le rhinovirus, l'adénovirus, les poliovirus de type 1 et 3, les coxsackievirus (Ansari S.A.*, et al.*, 1989, Gwaltney J.M., Jr. *et al.*, 1980, Kawana R. *et al.*, 1997, Papageorgiou G.T.*, et al.*, 2001, Turner R.B. et Hendley J.O., 2005) et également sur les virus enveloppés comme les *Paramyxoviridae*, le HIV ou encore le SARS-CoV (Kariwa H.*, et al.*, 2006, Kawana R.*, et al.*, 1997, Tyler R. et Ayliffe G.A., 1987). De plus, certaines études ont montré que l'application de formulations à base d'iode permettait l'interruption du

transfert de virus notamment par la désinfection des mains (Gwaltney J.M., Jr*., et al.*, 1980, Turner R.B. et Hendley J.O., 2005).

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 pré-opératoire, 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®.

1.6.4.2 Les dérivés chlorés

Origines

L'utilisation du chlore et de ses dérivés remonte au 18ème siècle avec la découverte par Claude Berthollet des propriétés décolorantes de l'hypochlorite de potassium et dont les travaux de recherche se sont déroulés dans le village de Javel. 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 19ème 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 20ème 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. Il existe des tables de correspondance entre les différentes unités.

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 (ClO^-), le chlore diatomique (Cl_2) et l'acide hypochloreux (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, qui inactivent le chlore et ses dérivés. L'activité antibactérienne est ainsi maximale à pH 5, valeur à laquelle la dissociation de l'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'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. Par exemple, si la température augmente, l'activité est meilleure mais la stabilité moins bonne.

Activité microbicide et utilisations

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 (Lai M.Y. *et al.*, 2005, Narang H.K. et Codd A.A., 1983, Sattar S.A*., et al.*, 1993, Sattar S.A*., et al.*, 1989).

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. D'autres composés comme la chloramine T (poudre blanche soluble dans l'eau et contenant 25% de chlore actif) sont utilisés dans la désinfection des eaux (Fleurette J*., et al.*, 1995).

1.6.5 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 20ème 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, mixtures de chlorure de *n*-alkyl-diméthyl-benzyl-ammoniums. Le bromure de cétrimonium ou bromure de cétyl-triméthyl-ammonium forme, avec le dodécyl-triméthyl-ammonium, le cétrimide, composé 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. La surface bactérienne porte en effet une charge négative nette liée à la présence de l'acide téichoïque et des éléments polysaccharidiques chez les bactéries à Gram positif et à la présence des lipopolysaccharides chez les bactéries à Gram négatif. 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. La forte fixation aux membranes cellulaires isole les microorganismes du milieu environnant.

L'activité biologique des ammoniums quaternaires dépend de la longueur de la chaîne carbonée des substituants de l'azote. Pour les bactéries à Gram positif, l'activité est maximale lorsque les chaînes présentent entre 12 et 14 atomes de carbone, alors que pour les bactéries à Gram négatif, cette activité est meilleure pour des chaînes de 14 à 16 atomes de carbone. Les ammoniums dont les chaînes de carbone comportent moins de 4 ou plus de 18 atomes de carbone n'ont en général pas d'activité microbicide.

Leur activité varie en fonction du pH. Ils sont plus actifs à pH neutre ou légèrement alcalin, i.e. 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 microbicides

Les ammoniums quaternaires sont plus actifs sur les bactéries à Gram positif, même sur les souches résistantes telles que les SARM, que sur les bactéries à Gram négatif, sur lesquelles ils sont surtout bactériostatiques avec résistance de certaines d'entre elles comme *Pseudomonas aeruginosa*. De plus, ils sont inactifs sur les mycobactéries et ne sont pas sporicides (Fleurette J*., et al.*, 1995, Gilbert P. et Moore L.E., 2005).

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 adénovirus de type 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 l'adénovirus de type 5 mais toujours pas du coxsakievirus (Sattar S.A*., et al.*, 1989).

D'autres études confirment ces résultats et montrent que les ammoniums quaternaires seuls n'ont qu'une faible activité voire pas d'activité virucide du tout et que seule l'association à d'autres produits, souvent synergique, entraîne l'inactivation des virus (Dellanno C. *et al.*, 2009, Mbithi J.N. *et al.*, 1990, Sattar S.A*., et al.*, 1993, Springthorpe V.S*., et al.*, 1986).

1.6.6 Les composés phénoliques

Origines

Le phénol a été introduit au 19ème siècle comme agent ATS notamment en chirurgie par Joseph Lister. Le phénol purifié est obtenu par distillation du goudron de houille obtenu à partir du charbon. Du fait de sa toxicité aiguë et/ou chronique, il a progressivement été remplacé par des dérivés phénoliques, agissant à des concentrations plus basses. Historiquement, le phénol a servi "d'étalon" pour mesurer l'activité ATS-D de différents composés. Cela consistait à déterminer le "coefficient phénol" par comparaison de l'activité du produit testé avec celle du phénol. Cependant, cette méthode présentait de nombreux inconvénients, les plus importants étant la variabilité des résultats et la difficulté de comparaison de l'activité de molécules de familles chimiques très différentes.

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. Quatre facteurs principaux influencent cette activité : la longueur de la chaîne de ramification, la position de cette chaîne, la nature de l'halogène dans le cas des halogénophénols et l'encombrement du noyau. Les molécules présentant le plus d'intérêt sont les halogénophénols comme le chlorophénol, les acides-phénols et les polyphénols.

Mécanismes d'action et propriétés antibactériennes

Leur activité microbicide est variable selon les microorganismes considérés. Les composés phénoliques sont rapidement bactéricides mais n'ont pas d'activité sur les spores. Néanmoins, la nature de leur activité, bactéricide ou bactériostatique, dépend de leur concentration et du temps de contact. Leur activité 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. Les dérivés les plus actifs appartiennent au groupe des alkylphénols halogénés. Ces derniers ont des propriétés bactéricides sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, ainsi que sur les mycobactéries.

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 (Mbithi J.N.*, et al.*, 1990, Sattar S.A.*, et al.*, 1993, Springthorpe V.S.*, et al.*, 1986). 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. Une étude de Sattar et coll. a montré que l'association de trois composés phénoliques (*o*-phénylphénol 0,02%, *o*-benzylchlrophénol 0,03% et *p*-tertiary-amylphénol 0,01%) est inactive sur un adénovirus de type 5, un coxsackievirus de type 3, le PIV-3 et le HCoV 229E. Cependant, l'ajout d'un détergent de type SDS (0,6%) rendait cette formulation active sur les deux virus enveloppés (PIV-3 et HCoV 229E) et si de l'éthanol à 70% remplaçait le SDS, la formulation devenait efficace sur les deux virus enveloppés et sur l'un des virus nus, l'adénovirus de type 5. Par ailleurs, une solution d'*o*-benzyl-*p*-chlorophénate (0,5%) associée à du SDS (0,6%) s'était montrée active sur tous les virus (Sattar S.A.*, et al.*, 1989).

Toxicité

Les principaux inconvénients des phénols sont représentés par leur effet caustique sur la peau et les tissus et leur toxicité systémique. En application cutanée, ils peuvent engendrer des dommages de la peau et présenter un caractère irritant. 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 du fait de leur toxicité cutanée, du risque de passage dans la circulation générale et de leur faible solubilité. Les composés phénoliques sont néanmoins utilisés comme agents conservateurs dans certains produits pharmaceutiques et/ou industriels et également dans les produits de désinfection, notamment du sol (Fleurette J.*, et al.*, 1995). Le phénol est encore largement employé comme intermédiaire de synthèse chimique mais il ne l'est plus en tant que biocide du fait de sa toxicité.

1.6.7 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.

1.6.7.1 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. Il est disponible sous deux formes à partir desquelles la forme gazeuse est obtenue : (i) une forme liquide, le formol, solution aqueuse contenant 34 à 37% de formaldéhyde et stabilisé par 8 à 15% de méthanol ; (ii) une forme solide constituée de polymères de formaldéhyde.

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. La grande réactivité du formaldéhyde explique la rapidité avec laquelle il se fixe sur les protéines et la baisse rapide de son activité en présence de sang, de sérum ou autres matières organiques. Il est plus actif sur les bactéries à Gram négatif que sur les bactéries à Gram positif et agit lentement sur les spores (Fleurette J*., et al.*, 1995).

Son activité virucide est également tardive. 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 même s'il reste quelques particules infectieuses à trois jours. 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).

Utilisations

Le formaldéhyde a de multiples applications en raison de ses propriétés physico-chimiques en tant que biocide, conservateur ou fixateur. Il est largement utilisé, sous forme solide ou liquide, dans de nombreux secteurs industriels notamment comme intermédiaire chimique de réaction et pour la fabrication de résines destinées à des produits de construction et de consommation d'usage courant (produits de bricolage, meubles, produits d'entretien, cosmétiques, etc.). 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, en association avec soit d'autres aldéhydes pour diminuer leur toxicité respective, soit avec des ammoniums quaternaires pour leur pouvoir détergent. 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 dans le groupe 1, c'est-à-dire 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).

1.6.7.2 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.). Son activité antimicrobienne est étroitement dépendante du pH. Sous sa forme commerciale, le produit est stable mais son activité réduite ; en effet, son activité est maximale à pH alcalin. 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 que ce soit sur les bactéries à Gram négatif ou à Gram positif. 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).

1.6.8 Les autres familles

D'autres familles chimiques, comme les anilides, les métaux, les oxydants, etc., sont utilisées dans le cadre de la désinfection et de l'antisepsie.

Anilides

Le groupe des anilides (carbanilide) contient des composés bactériostatiques et fongistatiques. Leur principal intérêt réside dans leur très bonne activité sur les trichophytons (champignons dermatophytes). Le triclocarban, par exemple, est commercialisé dans la spécialité Cutisan® utilisé dans le traitement de l'intertrigo des orteils à dermatophytes.

Métaux

Un certain nombre de métaux tels que le cuivre, le zinc, l'argent, le mercure, possède une activité antimicrobienne connue de façon empirique depuis l'Antiquité. Leur toxicité et le risque de pollution environnementale, surtout pour les dérivés mercuriels, ont peu à peu entraîné l'abandon de ces composés. Le nitrate d'argent quant à lui entre dans la composition de nombreux pansements de par son large spectre d'action. Il est utilisé dans le traitement des plaies surinfectées ou non, et des brûlures. Le cuivre, associé au zinc, entre dans la composition de crèmes et de pommades (pommade Dermocuivre®, crème de Dalibour®) visant le traitement des dermites irritatives pour leurs propriétés ATS.

Colorants

Les colorants, tels que l'éosine, le violet de gentiane, le bleu de méthylène ou le vert malachite, ont été très utilisés notamment pendant la première guerre mondiale comme ATS dans le traitement des blessures et des plaies cutanées. Cependant, ils ont été peu à peu abandonnés à cause de leur faible pouvoir antimicrobien (bactériostatique), des risques de sensibilisation pour certains d'entre eux et de leurs propriétés colorantes. L'éosine est toujours utilisée mais plutôt pour ses propriétés asséchantes (Fleurette J*., et al.*, 1995).

Oxydants

Les oxydants sont des composés qui agissent sur les micro-organismes par libération d'oxygène qui entraîne la production d'hypochlorite ou de radicaux hydroxyles. On retrouve, entre autres, le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) et l'acide peracétique. L'eau oxygénée est toujours utilisée dans l'ATS des petites plaies et également pour son pouvoir hémostatique. L'acide peracétique, ayant un large spectre microbicide, trouve quant à lui un usage élargi puisqu'il est recommandé dans la désinfection des endoscopes, en remplacement du glutaraldéhyde.

Le choix parmi les différents ATS-D disponibles, comme nous pouvons le constater, est très large. Ils diffèrent, voire se complètent, notamment par leur mécanisme et/ou leur rapidité d'action ainsi que par leur spectre microbicide. Il est reconnu de nos jours qu'un ATS-D doit induire une action létale irréversible sur les microorganismes ciblés pour être considérés comme efficace. De plus, il est nécessaire de connaître les possibles synergies ou antagonismes existant entre les différentes familles pour une utilisation rationnelle de ces ATS-D. Il ressort ainsi de cet inventaire, que leurs conditions d'utilisation sont primordiales pour une bonne activité microbicide. Par conséquent, il est essentiel de pouvoir évaluer leur activité dans des conditions représentatives des conditions d'usage afin de pouvoir cibler ce choix et d'utiliser au mieux leurs propriétés selon les risques et les microorganismes susceptibles d'être présents.

Par ailleurs, malgré une diversité chimique remarquable, les ATS-D décrits ci-dessus présentent un nombre manifeste d'inconvénients, toxicité pour certains ou spectre d'action étroit pour d'autres. Il devient donc de plus en plus nécessaire et urgent de développer de nouvelles familles pour répondre à la demande croissante d'ATS-D efficaces et non toxiques. Nous nous sommes ainsi penchés sur la famille des calixarènes qui, comme nous allons le développer, présente un intérêt potentiel non négligeable.

2 Les calixarènes

2.1 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 macrocycles ou macromolécules cycliques dans laquelle sont retrouvées par exemple les cyclodextrines. La littérature sur les calixarènes indique qu'ils sont le produit d'une longue histoire remontant à 1872 lorsqu'Adolf Von Bayer décrivit les premières réactions entre phénols et aldéhydes, dont la condensation, dans certaines conditions, résultat 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" (Figure 8), le suffixe "–arène" provient quant à lui de la présence des unités phénoliques (Gutsche C.D. et Muthukrishnan R., 1978).

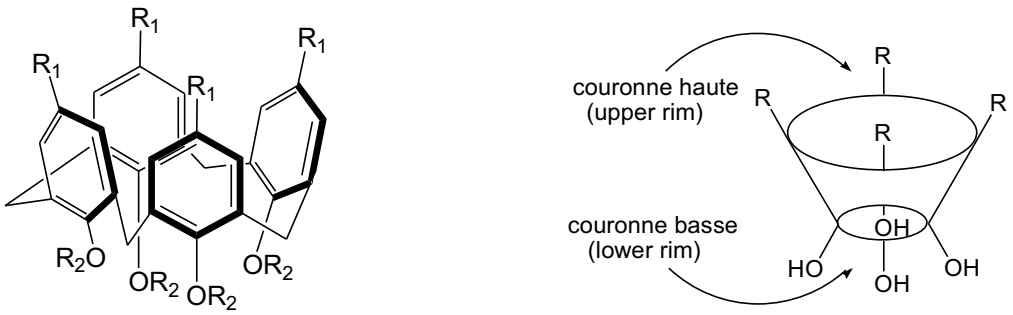
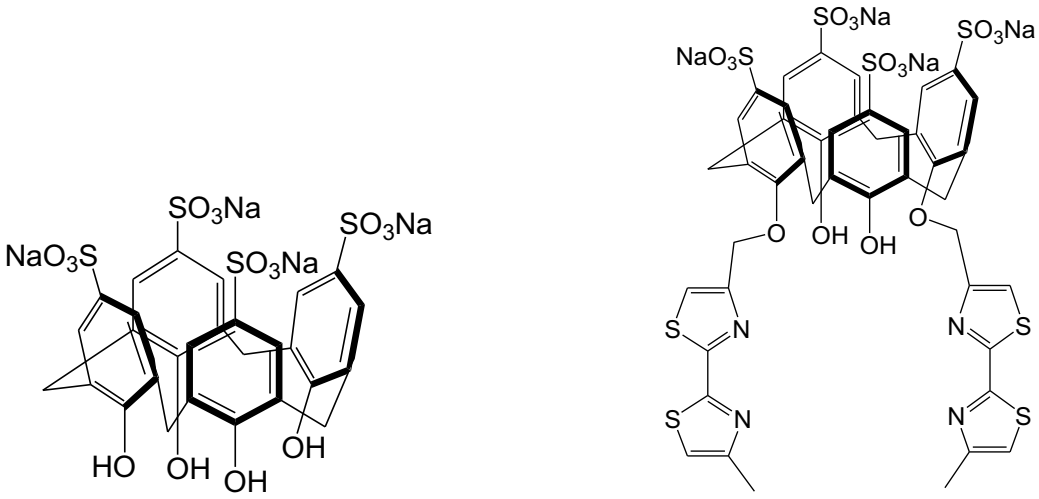


Figure 8 : Structure générale d'un calix[4]arène

Structure

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 (Figure 8), et qui peuvent être discriminées grâce aux techniques de résonnance magnétique nucléaire.



A. C[4]S B. C[4]S-BTZ

Figure 9 : Structure du C[4]S et du C[4]S-BTZ

Vers la synthèse de molécules chélatantes

La chimie de ces molécules s'est rapidement développée à la fin des années 70 et leur synthèse a fait l'objet de nombreuses études et adaptations méthodologiques. 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 métalliques en vue notamment de les séparer. 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, l'un des deux calixarènes testés lors de cette étude, le 1,3-bis(bithiazolyl)-*tetra*-*para*-sulfonato-calix[4]arène (C[4]S-BTZ; Figure 9B), 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 de 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 *tetra-para*-sulfonato-calix[4]arène (Shinkai S. *et al.*, 1984). Ce *tetra-para*-sulfonato-calix[4]arène (C[4]S ; Figure 9A) correspond à l'autre calixarène étudié au cours de ce projet. 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, i.e. 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 (Grare M. *et al.*, 2010b, Mourer M., 2006, Psychogios N., 2003).

2.2 Activités biologiques des calixarènes

2.2.1 Potentiels pharmacologiques

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, ont été étudiés pour leur capacité à s'insérer dans des membranes phospholipidiques et d'y discriminer le passage d'ions alcalins en fonction de leur taille. Les ester-calix[4]arènes facilitaient le passage des ions sodium, les ester-calix[5]arènes, celui des ions potassium et enfin les ester-calix[6]arènes et les ester-calix[7]arènes, celui des ions césium. La sélectivité semblait donc liée au rapport de taille existant entre l'ion et le passage crée dans la membrane lipidique (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).

Certains calixarènes présentant des propriétés anticoagulantes ou antifibrotiques intéressantes ont fait l'objet de dépôt de brevets (Hulmes D. *et al.*, 2000, Hwang K. *et al.*, 1992). Des études de toxicité de calixarènes sulfonés sur les érythrocytes ont également été menées en vue d'une utilisation parentérale des calixarènes pour leurs propriétés complexantes et donc de possibles véhicules de principes actifs et ont montré une très faible activité hémolytique, en particulier des calix[4]arènes et calix[6]arènes (Da Silva E. *et al.*, 2004). Dans le même but, il semblait important de connaître la

réactivité des calixarènes avec les molécules véhiculées dans le sang, notamment avec l'albumine, elle-même molécule de transport au sein de l'organisme. Il a ainsi été montré des interactions avec la BSA ("bovine serum albumin" ou albumine sérique bovine) formant une couche protectrice autour des complexes calixaréniques (Gualbert J. *et al.*, 2003).

2.2.2 Outils de reconnaissance moléculaire

La reconnaissance et la complexation de molécules biologiques par des entités calixaréniques ont beaucoup été étudiées via la synthèse de dérivés porteurs d'acides aminés et de groupements osidiques. Dans le domaine de la reconnaissance moléculaire, la création de bibliothèques de molécules a été un outil puissant pour l'étude des interactions moléculaires. 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 (Hioki H. *et al.*, 1999). La capacité de reconnaissance moléculaire des calixarènes porteurs de peptides a été également mise à profit dans des essais d'inhibition enzymatique, notamment avec la chymotrypsine (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. Comme avec les peptides, la sélectivité n'était pas très bonne et ces composés discriminaient assez difficilement les différents nucléotides présentés (affinités plus ou moins équivalentes) (Shi Y. et Schneider H.J., 1999).

2.2.3 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. Ces molécules favorisaient cette réaction par la présence de groupements à protons labiles à proximité de la cavité calixarénique, susceptible d'accueillir le substrat. Il en a résulté une multiplication de la vitesse d'hydratation de 2,9 fois (Shinkai S. *et al.*, 1986). Une autre étude a montré qu'un calix[6]arène pouvait reproduire une activité de type choline estérase (Cuevas F. *et al.*, 2000). Il a également été produit une

phosphodiestérase synthétique par complexation de calixarènes, substitués avec des groupements aminométhylpyridiniques, avec des métaux de transition de type zinc ou cuivre. En effet, les phosphodiestérases naturelles possèdent en général deux ions métalliques au sein de leur site actif, ayant une action synergique pour le clivage hydrolytique des liaisons phosphodiesters. Il a ainsi été montré que ces complexes avec les métaux de transition présentent la propriété d'accélérer la vitesse d'hydrolyse et de transestérification des esters phosphoriques. Cette activité augmentait par ailleurs avec le nombre d'atomes de métal complexés. Ainsi, le calixarène seul ne présentait pas cette activité catalytique mais cette dernière augmentait significativement avec le nombre d'atomes de métal complexé (de 1 à 3). Ces résultats étaient très encourageants par la possibilité de synthétiser des catalyseurs capables de couper sélectivement l'ARN (Molenveld P. *et al.*, 1999a, Molenveld P. *et al.*, 1997, Molenveld P. *et al.*, 1999b).

2.2.4 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 en notant une augmentation de cette solubilité parallèlement avec l'augmentation de la taille du calixarène (Millership J.S., 2001, Yang W. et de Villiers M.M., 2004).

2.2.5 Autres potentiels thérapeutiques : prodrogues et complexes radioactifs

Regnouf de Vains et coll. ont réalisé des études mettant en œuvre des calixarènes porteurs de groupements β-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, Ben Salem A. et Regnouf-de-Vains J.-B., 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).

2.2.6 Calixarènes et pouvoir microbicide

Le macrocyclon

L'exemple le plus ancien résulte d'une étude datant de 1955 sur un composé, issu 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 se sont montrées inactives sur *Mycobacterium tuberculosis* lors d'étude *in vitro* dans un milieu de culture ne comportant pas de cellules. Cependant, les résultats étaient complètement différents lors d'études *in vivo* par infection expérimentale de souris. Ainsi, selon les longueurs des chaînes polyoxyéthyléniques, 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).

Activité antibactérienne

D'autres essais avec des calixarènes porteurs sur la couronne haute d'acides aminés ont été menés dans le but de mimer la vancomycine, antibiotique de la classe des glycopeptides. Le mécanisme d'action des glycopeptides s'explique par la reconnaissance d'un motif D-Alanyl-D-Alanine dans la structure peptidique d'un précurseur de la paroi bactérienne, le peptidoglycane. Ils empêchent ainsi la synthèse de la paroi des bactéries à Gram positif, majoritairement constituée de peptidoglycane. La vancomycine est particulièrement utilisée dans le traitement des infections à SARM. Cependant,

des souches résistantes à la vancomycine sont apparues depuis la fin des années 1980, notamment chez les entérocoques. Cette résistance est maintenant connue pour être inductible, transférable et portée par un plasmide. L'utilisation extensive de la vancomycine a donc créé une pression de sélection sur les souches résistantes. Un effort de recherche a alors été mené dans la synthèse de nouvelles molécules. Ces calixarènes porteurs d'acides aminés mimant l'action de la vancomycine présentaient ainsi des propriétés intéressantes puisque certains d'entre eux ont fait preuve d'une activité comparable à celle de la vancomycine, y compris sur les SARM (Casnati A. *et al.*, 1996).

Des études plus récentes 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 (Grare M. *et al.*, 2010a, Mourer M. *et al.*, 2009).

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 très modestement examiné. Hwang et coll. ont mis en évidence une activité anti-HIV 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 démontré au sein de notre unité de recherche (Psychogios N., 2003). Un autre brevet déposé par Harris et coll. a aussi rapporté une activité anti-HIV 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, Harris S.J., 2002). Plus récemment, Motornaya et coll. ont rapporté des activités antiherpétiques de certains calixarènes, les amino-amantadane-calixarènes (Motornaya A.E. *et al.*, 2006). Finalement, Mourer et coll. ont évalué l'activité anti-HIV 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. Cependant, des études menées en parallèle montraient toutefois que la zidovudine restait plus efficace (Mourer M. *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. Cependant, ces composés sont encore relativement peu étudiés dans le domaine pharmacologique

comparativement à d'autres structures macrocycliques comme les cyclodextrines commercialisées dans pas moins de douze spécialités pharmaceutiques comme adjuvant de solubilisation et/ou vecteur de principes actifs.

3 Le modèle viral : Les Coronavirus

Les coronavirus sont des virus enveloppés, à ARN de polarité positive, non segmenté, dont le nom provient de leur aspect en forme de couronne (du latin "corona") en microscopie électronique. Ils sont largement représentés chez les mammifères et les oiseaux, provoquant maladies respiratoires et entériques, voire dans certains cas, neurologiques ou hépatiques. Considérés comme les agents du rhume banal avec les rhinovirus, les coronavirus sont longtemps restés un sujet marginal en médecine Humaine, malgré l'existence de travaux, peu nombreux à l'époque, les impliquant dans des pathologies plus sérieuses. La plupart des données sur les coronavirus acquises au cours du 20ème siècle étaient issues du domaine Vétérinaire, dans lequel les coronavirus sont à l'origine d'infections graves, surtout chez les volailles et les porcs, et donc à l'origine de lourdes conséquences économiques. Plus récemment et avec la découverte de nouveaux coronavirus infectant l'Homme, dont celui responsable de l'épidémie de SRAS en 2002-2003, les données ont été largement accrues. Ils ont depuis été impliqués dans des pathologies Humaines graves, notamment chez les personnes immunodéprimées ainsi que dans des ILS.

Ainsi, après un rappel historique sur la famille des *Coronaviridae*, nous aborderons leur classification et les remaniements récents. En effet, cette famille comprenant jusqu'en 2009 les genres *Coronavirus* et *Torovirus* et appartenant à l'ordre des *Nidovirales*, a largement été remaniée au cours de ces dernières années avec la découverte de nombreux nouveaux coronavirus et les avancées technologiques. Nous exposerons ensuite une de leurs caractéristiques principales : leur mode de réplication, qualifiée de "nichée" ainsi que leurs capacités évolutives et adaptatives. Enfin, après avoir détaillé leur potentiel pathogène, nous nous intéresserons à leurs capacités de survie dans différentes conditions environnementales et sous l'action des ATS-D. Des informations complémentaires sur la famille des *Coronaviridae* et leurs particularités seront apportées lors de mon DES de Pharmacie Spécialisée, portant sur l'apport de la bioinformatique dans le domaine de la Virologie et plus particulièrement dans l'avancement des connaissances sur cette famille de virus.

3.1 Historique

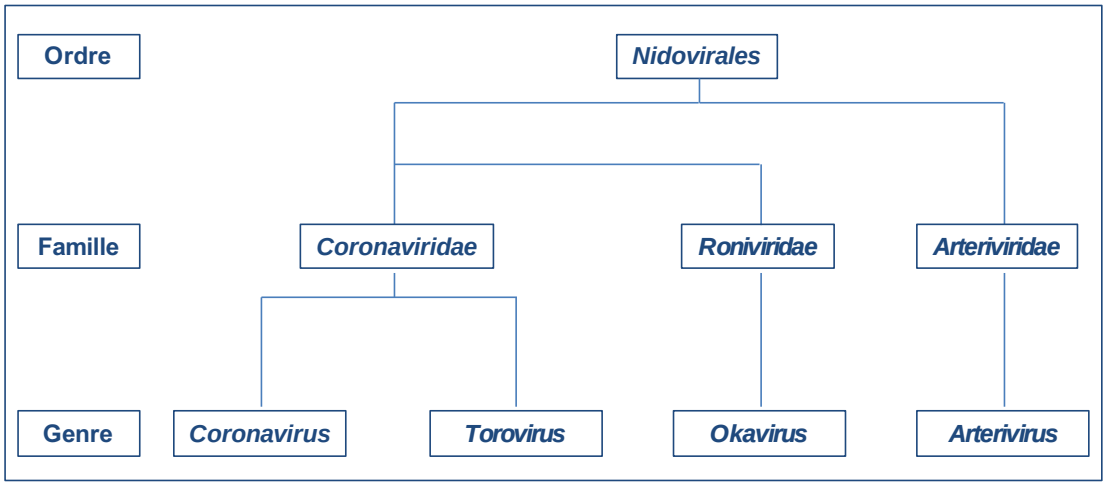
Comme cela a déjà été évoqué, les coronavirus sont longtemps restés un genre délaissé du monde médical et scientifique du fait de leur faible implication en pathologie Humaine. En médecine Vétérinaire, cependant, leur impact économique important a favorisé l'étude des coronavirus animaux. Le premier virus du genre a avoir été isolé, en 1937, est l'IBV ou "Infectious Bronchitis Virus", infectant les volailles, suivi de près par la découverte en 1949 du MHV ou "Murine hepatitis virus", infectant quant à lui les souris (Cheever F.S. *et al.*, 1949). Ce n'est qu'à la fin des années 1960 que deux nouveaux virus respiratoires infectant l'Homme – les souches 229E (Hamre D. et Procknow J.J., 1966) et OC43 (McIntosh K. *et al.*, 1967) – ont été mis en évidence. Ils ont rapidement été rapprochés de l'IBV et du MHV.

Ces virus présentaient en effet des caractéristiques morphologiques communes lors de l'observation en microscopie électronique (Almeida J.D. et Tyrrell D.A., 1967). Ces similarités correspondaient à la présence d'éléments à la surface du virion alors qualifiés de "projections en forme de massue" ("club-like") ou de "spicules". La nature de ces spicules ainsi que la structure générale des virions ont alors été comparées à celles connues chez les myxovirus, présentant une morphologie proche, mais en différaient finalement significativement (Becker W.B. *et al.*, 1967). Les spicules formant autour du virion une sorte de couronne, ces virus ont été regroupés sous un nouveau genre, le genre *Coronavirus*. Quarante ans plus tard, c'est cette même morphologie qui alerte le monde médical et scientifique lors de l'isolement d'un nouveau virus respiratoire, à l'origine d'un syndrome grave potentiellement mortel, le SRAS (Ksiazek T.G.*, et al.*, 2003, Peiris J.S.*, et al.*, 2003b).

L'émergence du SARS-CoV ainsi que la forte proportion d'infections respiratoires sans cause identifiée chez l'Homme ont motivé la recherche et l'identification de nouveaux virus respiratoires et restimulé l'intérêt pour le genre *Coronavirus.* De nouvelles études ont alors été entreprises et ont donné lieu, notamment, à la mise en évidence de deux autres coronavirus jusqu'alors non identifiés chez l'Homme : le HCoV NL63 (Van der Hoek L. *et al.*, 2004) et le HCoV HKU1 (Woo P.C.*, et al.*, 2005a). De nouveaux coronavirus ont également été identifiés chez les animaux, notamment chez les chauves-souris, dont certains semblent être les précurseurs du SARS-CoV (Lau S.K. *et al.*, 2005, Li W. *et al.*, 2005, Poon L.L. *et al.*, 2005) mais aussi chez les oies, les pigeons et les canards sauvages (Jonassen C.M. *et al.*, 2005). Au final, depuis 2002, ce sont 24 nouveaux coronavirus qui ont ainsi été identifiés : trois chez l'Homme, dix chez les autres mammifères et onze chez les oiseaux (Huang Y. *et al.*, 2008).

3.2 Classification

A) Classification avant 2009



B) Classification après 2009

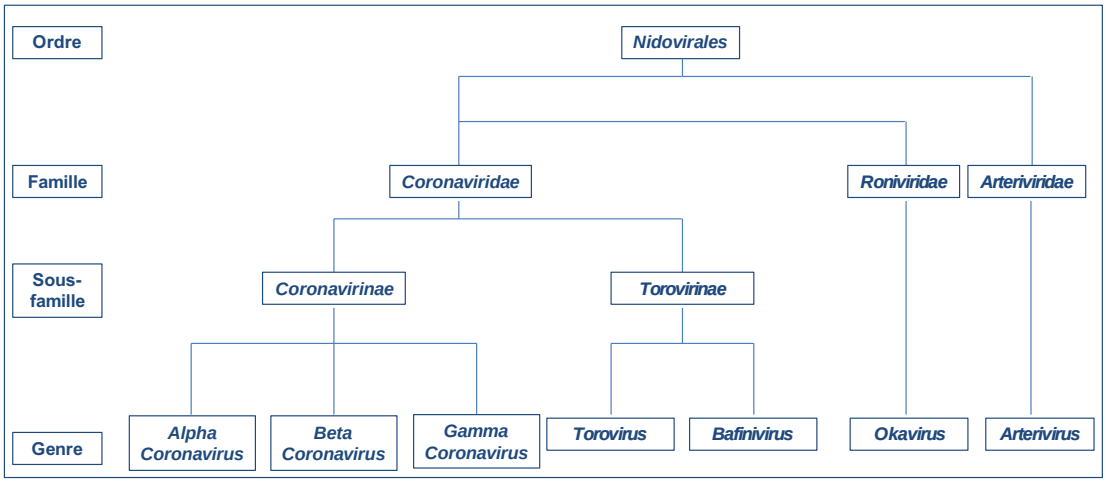


Figure 10 : Evolution de la taxonomie de la famille des *Coronaviridae*

(ICTV, 2009b)

Les *Coronavirus* étaient classés, jusqu'en 2008, comme l'un des deux genres, avec celui des *Torovirus* composant la famille des *Coronaviridae*.

Le genre *Torovirus* a été créé en 1992 ; le virus équin de Berne ("Berne equine virus" ou BEV) étant le virus prototype de ce genre (Snijder E.J. et Horzinek M.C., 1993).

Ces deux genres appartenaient à la famille des *Coronaviridae*, elle-même appartenant à l'ordre des *Nidovirales*.

L'ordre des *Nidovirales* et la famille des *Coronaviridae*

L'ordre des *Nidovirales* réunit depuis 1996, les familles des *Coronaviridae* (genres *Coronavirus* et *Torovirus*) et des *Arteriviridae* (Snijder E.J. et Meulenberg J.J., 1998). En 2002, l'ordre s'est agrandi avec la famille des *Roniviridae* (Cowley J.A. *et al.*, 2000, Dhar A.K. *et al.*, 2004, Mayo M.A., 2002), en élargissant la nature des hôtes aux invertébrés (Figure 10A). Les caractéristiques les plus remarquables que partagent les *Nidovirus* sont, d'une part, leur stratégie de réplication qualifiée de "nichée", d'où leur nom provenant du latin "*nidus"*, le nid ; et d'autre part, l'expression de la polyprotéine portant l'activité de polymérase et de réplicase, grâce à un saut ribosomal. Cependant, les familles appartenant à l'ordre des *Nidovirales* diffèrent ostensiblement dans le nombre, la nature et la taille de leurs protéines structurales ainsi que dans la morphologie de leur nucléocapside. Au sein de l'ordre des *Nidovirales*, seule la famille des *Coronaviridae* comporte des virus infectant l'Homme.

Le genre *Coronavirus*

Les membres du genre *Coronavirus* étaient divisés en trois groupes (Figure 11). Cette classification en groupes était originellement basée sur les relations antigéniques. Cependant, ce critère ne tenait compte que d'une partie limitée des protéines virales. L'analyse systématique des génomes viraux a, par la suite, changé la face de la taxonomie virale. Avec les progrès accomplis dans la virologie moléculaire, il est devenu évident que l'analyse comparative de séquences serait un outil plus solide et complémentaire aux les méthodes utilisées auparavant (Gorbalenya A.E. *et al.*, 2004).

Le groupe 1, dont le chef de file est le HCoV 229E, comprend entre autres la souche Humaine NL63, identifiée en 2004 (Van der Hoek L*., et al.*, 2004) ainsi que des virus infectant d'autres mammifères comme le porc avec notamment le TGEV ("Transmissible gastro-enteritis virus" ou virus responsable de la gastro-entérite transmissible) et le PEDV ("Porcine epidemic diarrhea virus" ou virus de la diarrhée épidémique porcine). Le groupe 2, dont le chef de file est le HCoV OC43, rassemble notamment le coronavirus bovin ("bovine coronavirus" ou BCoV), le MHV, et la souche Humaine HKU1, identifiée en 2005. Enfin, le groupe 3, dont le chef de file est l'IBV, ne contient que des virus aviaires. Les derniers coronavirus aviaires décrits (Jonassen C.M*., et al.*, 2005) appartiennent également à ce groupe 3.

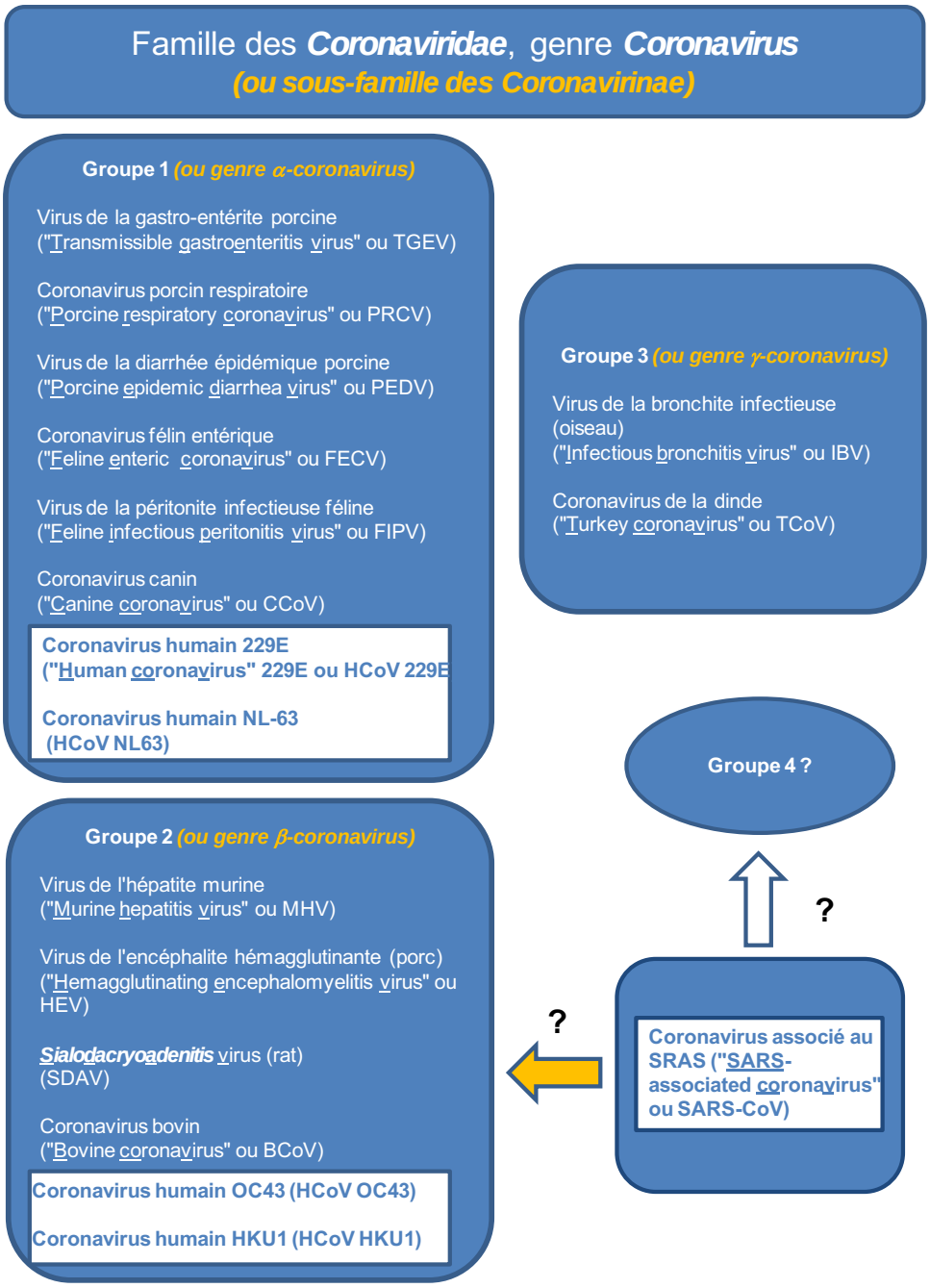


Figure 11 : Répartition des virus humains et animaux dans les groupes composant le genre *Coronavirus*

En orange, sont indiquées les nouvelles dénominations selon la classification de l'ICTV post-2009.

Des études plus récentes ont permis, grâce à des analyses phylogénétiques (Figure 12), d'identifier des sous-groupes notamment dans le groupe 1, qui nous intéresse plus particulièrement car il comprend le HCoV 229E, modèle de notre étude ; mais aussi dans le groupe 2.

Dans la plupart des cas, l'assignation d'un nouveau coronavirus à un groupe a été réalisée sans équivoque, sauf dans le cas du SARS-CoV, pour lequel il y a eu (et il en subsiste) de nombreuses controverses.

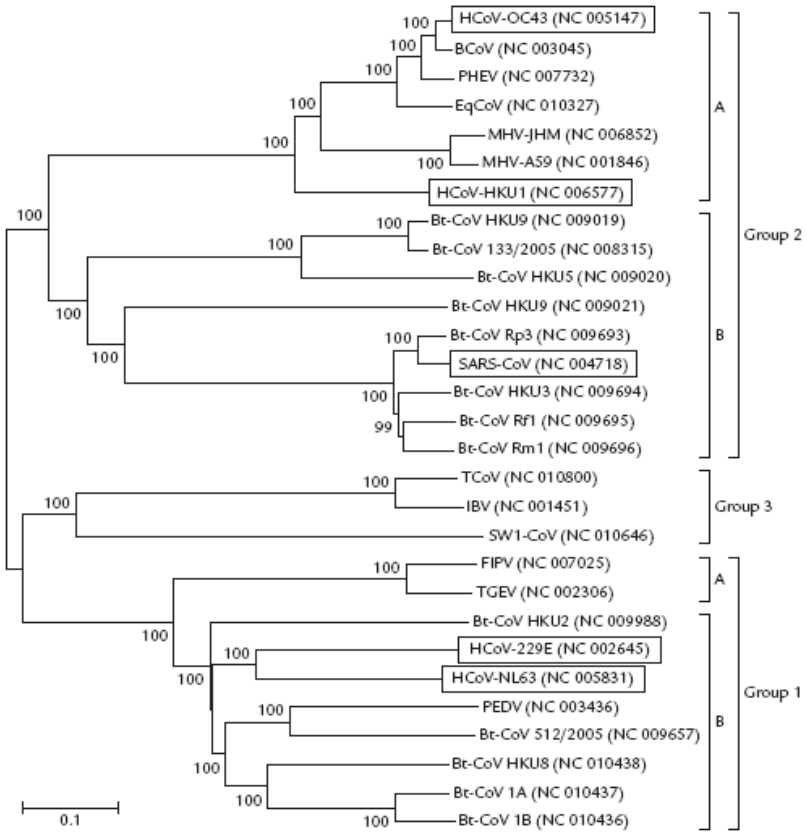


Figure 12 : Classification phylogénétique des coronavirus

Cet arbre phylogénétique réalisé par l'équipe de Dijkman (Dijkman R. et van der Hoek L., 2009) rassemble les 29 séquences génomiques complètes entièrement séquencées des coronavirus connus (souches de référence) Ces séquences ont été alignées en utilisant le programme ClustalX v2.09.17. L'analyse phylogénétique a été conduite en utilisant la méthode "neighbor joining". Les cinq espèces de coronavirus Humains sont identifiées par des rectangles.

L'analyse phylogénétique de son génome l'a, en effet, placé à une distance approximativement égale des trois groupes précédemment établis. Il a donc été proposé la création d'un quatrième groupe de coronavirus (Marra M.A. *et al.*, 2003, Rota P.A. *et al.*, 2003). Cependant, des analyses ultérieures du gène de la réplicase, la partie la plus conservée au sein du génome des coronavirus, ainsi que de certaines séquences codant des protéines de structure (Bibliographie, 3.3, p.61), ont montré une relation plus étroite avec les membres du groupe 2 (Eickmann M. *et al.*, 2003, Gorbalenya A.E.*, et al.*, 2004, Snijder E.J. *et al.*, 2003). Le SARS-CoV a finalement été classifié dans le groupe 2b (Figure 12).

Remaniements récents (2009) de cette classification

Depuis 2003, la classification des *Coronavirus* et plus largement celle de la famille des *Coronaviridae,* a été largement remaniée suite à la découverte de ces nouveaux coronavirus et aux progrès effectués grâce à l'analyse des données génomiques (Figure 10B). En 2009, l'ICTV ("International committee on taxonomy of viruses" ou comité international sur la taxonomie des virus) a donc proposé une révision de la taxonomie de cette famille *(ICTV, 2009a, ICTV, 2009b)*.

Tout d'abord, les deux genres *Coronavirus* et *Torovirus* ont été élevés au rang taxonomique de sous-familles, comme cela avait été proposé par Gonzalez et coll. (Gonzalez J.M. *et al.*, 2003) donnant ainsi naissance aux *Coronavirinae* et aux *Torovirinae*.

Les groupes 1, 2 et 3 existant au sein du genre *Coronavirus*, divergeaient suffisamment pour mériter le statut taxonomique de genre (Gonzalez J.M.*, et al.*, 2003, Gorbalenya A.E. *et al.*, 2006). L'ICTV les a alors élevés au rang de genre depuis 2009 et nommés *alpha-*, *beta-* et *gamma-coronavirus* (Figure 10B). Cependant, pour plus de clarté dans la suite de notre exposé et en rapport aux différentes études citées, nous continuerons de parler des groupes 1, 2 et 3.

3.3 Structure des coronavirus

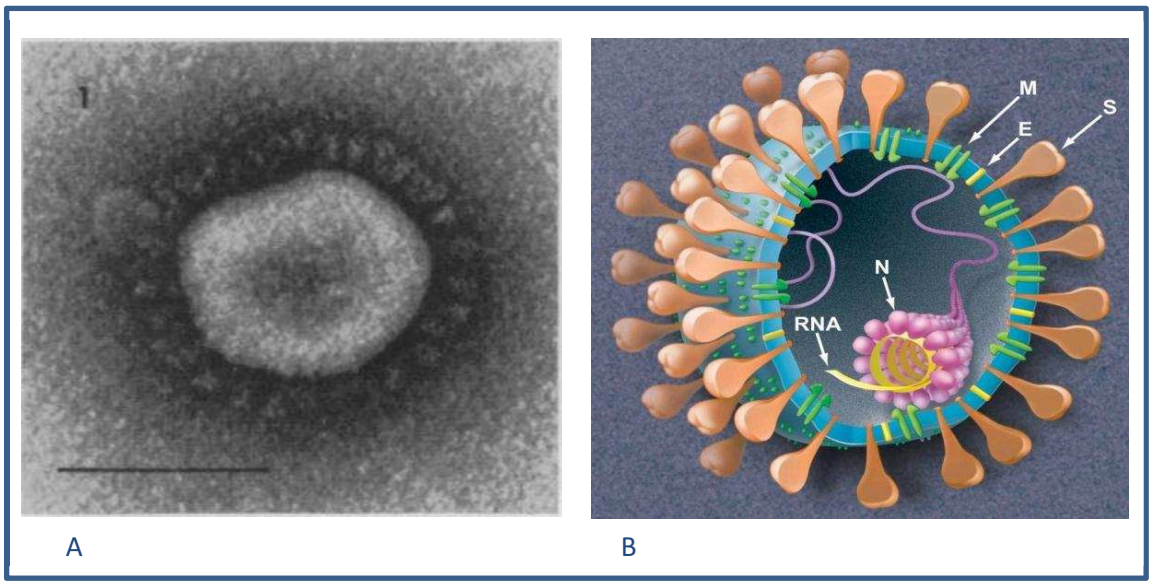


Figure 13 : Structure des coronavirus

A : Photo en microscopie électronique de la souche OC43 (McIntosh K.*, et al.*, 1967)
B : Structure schématique d'un coronavirus (Holmes K.V. et Enjuanes L., 2003)

Les coronavirus sont représentés comme des particules pleiomorphiques, grossièrement sphériques, présentant des variations de taille (80 à 120 nm de diamètre) et de forme. Le virion possède une ribonucléoprotéine (RNP), formée de l'ARN génomique - un des plus grands ARN génomiques viraux de 28 à 32 Kb (Kilobases) – complexé avec la protéine N ou protéine de nucléocapside. Cette RNP est entourée d'une enveloppe lipidique. Trois protéines virales sont ancrées dans cette enveloppe et retrouvées chez tous les coronavirus : (i) la protéine de membrane M, très abondante ; (ii) la protéine

d'enveloppe E, présente en moindre quantité ; et (iii) la protéine de spicule S, formant des spicules trimériques de 20 nm de long (Figure 13).

3.3.1 Le génome des coronavirus

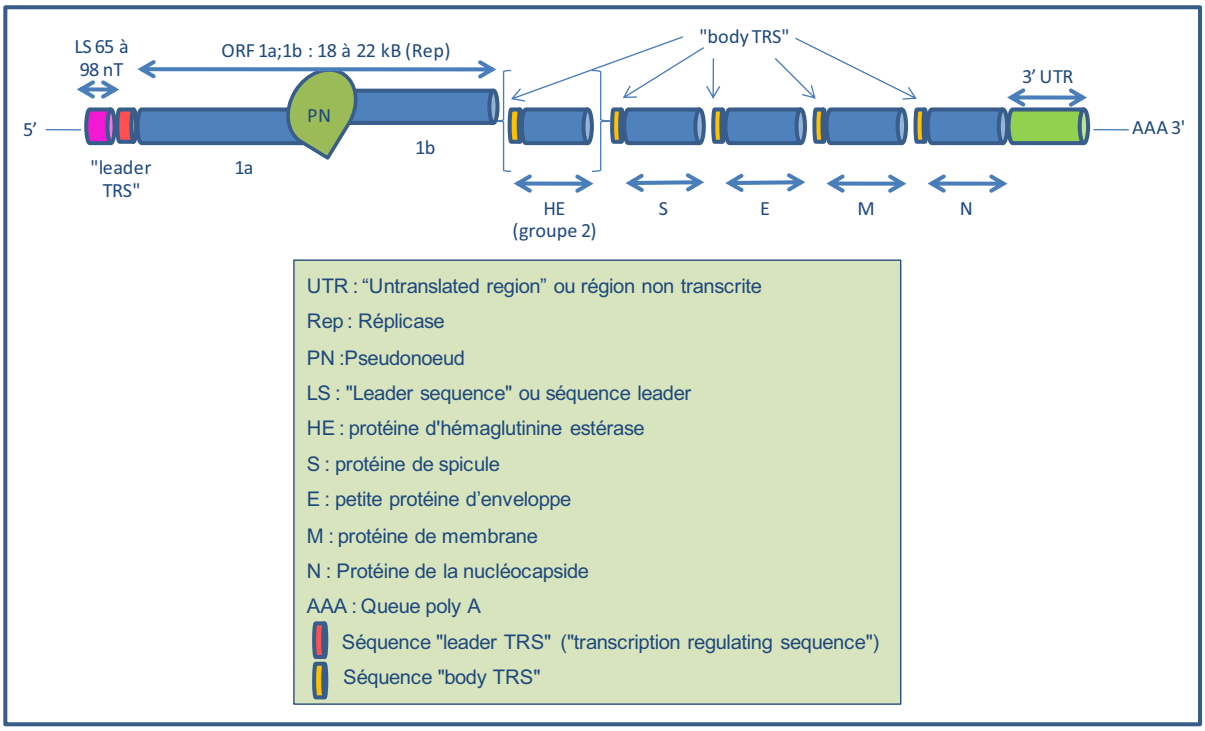


Figure 14 : Représentation schématique du génome d'un coronavirus

Les protéines "accessoires", non structurales et variables selon les souches ne sont pas représentées dans ce schéma à l'exception de la protéine HE.

Le génome des coronavirus possède des caractéristiques communes à tous les coronavirus, dont des éléments fondamentaux pour leur réplication, ainsi que certains éléments qui différent selon les souches de coronavirus.

D'une façon schématique, sont présentés ci-dessous les éléments caractéristiques de ce génome de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' (Figure 14) :

- A l'extrémité 5', il existe une séquence appelée séquence leader ou LS ("Leader sequence"), une des structures génomiques indispensables à la transcription virale.
- Juste à sa suite, une séquence, appelée séquence "leader TRS" ("Transcription regulating sequence" ou séquence de régulation de la transcription), également fondamentale pour la transcription. Cette séquence hexamérique est retrouvée de façon périodique le long du génome, en amont de chaque gène. Elle est alors nommée "body TRS".

- La première séquence codante occupe les deux tiers du génome et est constituée de deux ORFs ("Open reading frames" ou cadre de lecture ouverts) nommés 1a et 1b, liés par une structure en pseudo-nœud, caractéristique non seulement des coronavirus mais aussi de l'ordre des *Nidovirales*. Ces ORFs correspondent au gène de la réplicase ou gène *Rep* et supportent entre autre l'activité de RdRp ("RNA-dependant RNA-polymerase" ou ARN polymérase ARN dépendante).
- Suivent alors une série d'ORFS codant les protéines structurales, i.e. protéine S, protéine E, protéine M et protéine N. Ces ORFs sont toujours agencés dans cet ordre quelle que soit la souche de coronavirus.
- Entre ces gènes codant les protéines structurales, sont intercalés des gènes codant des protéines dites "accessoires" n'ayant pas de rôle structural, à l'exception de la protéine HE (protéine d'hémaglutinine estérase). Ces protéines, de par leur nature et leur position, diffèrent selon les souches virales.
- Enfin, à l'extrémité 3', une séquence 3' UTR ("untranslated region"), joue également un rôle primordial dans les évènements de la transcription.

3.3.2 Les protéines structurales

Les protéines structurales ainsi que la protéine HE, présentent des points communs mais aussi des différences entre les souches de coronavirus.

La protéine S

La protéine S, constitutive des spicules, est une glycoprotéine membranaire, responsable de l'attachement aux cellules hôtes et de la fusion membranaire. Il s'agit du déterminant majeur pour la spécificité d'hôte, le tropisme cellulaire et tissulaire, la pathogénicité et la virulence.

De ce fait, lorsque les séquences protéiques primaires sont comparées, deux régions sont observables : la région amino-terminale souche-spécifique (région S1) et la région carboxy-terminale (région S2), plus conservée entre les souches. La région S1 correspond à la partie globulaire du spicule et la région S2 forme la tige. Ces deux régions peuvent, ou non, être clivées par une protéase cellulaire selon les groupes de coronavirus, i.e. la protéine S est clivée chez les coronavirus des groupes 2 et 3 mais pas chez ceux du groupe 1. Dans le cas d'un clivage de la protéine S, les deux sous-unités S1 et S2 restent liées de façon non covalente. La région S1 est responsable de

l'attachement du virion à la cellule cible et la région S2 est, quant à elle, responsable de la fusion membranaire (Cavanagh D., 1995, Vabret A. *et al.*, 2005a).

Cette protéine est de plus la cible principale du système immunitaire de l'hôte et induit la formation d'anticorps neutralisants. Il a été montré, par exemple pour le SARS-CoV que des anticorps neutralisants se fixaient au domaine de liaison au récepteur de cette protéine empêchant ainsi l'interaction avec ledit récepteur (Sui J. *et al.*, 2004).

La protéine M

La protéine M est la protéine majeure constituant l'enveloppe virale. Elle présente une homologie de séquence de 85% entre coronavirus d'un même groupe et seulement de 30% entre coronavirus de groupes différents. Cependant, son profil d'hydrophobicité est très conservé entre toutes les souches, ce qui en fait d'ailleurs une de ses caractéristiques principales. En effet, cette protéine est caractérisée par trois domaines hydrophobes alternés avec trois courts domaines hydrophiles, ce qui lui confère son rôle structural majeur au niveau de la membrane virale. Elle constitue ainsi, avec la protéine E, l'une des deux protéines virales requises pour la phase d'assemblage (Rottier P.J.M., 1995).

La protéine E

La protéine E est une protéine, également constitutive de l'enveloppe, et auparavant nommée "petite protéine d'enveloppe". Bien que la séquence primaire des protéines E soit assez conservée au sein d'un même groupe de coronavirus, elle ne présente que peu d'homologie entre les différents groupes. Elle semble être un constituant physique mineur de la particule virale. Cependant, elle joue un rôle primordial dans les phases d'assemblage du virion au cours desquelles elle interagit avec la protéine M. Ceci a pu être observé dans le cas de mutations de la protéine E où l'assemblage des particules virales était fortement altéré. De plus, la seule présence des protéines E et M suffit à la production de l'enveloppe virale (Fischer F. *et al.*, 1998, Vennema H. *et al.*, 1996).

La protéine N

La protéine N forme, en s'associant avec l'ARN, une RNP de symétrie hélicoïdale. Il s'agit de la protéine exprimée le plus abondamment. Cette protéine bien que considérée comme conservée entre les différents groupes de coronavirus, ne présente une homologie de séquence en acides

aminés que de 70% entre les coronavirus d'un même groupe et de 30 à 35% entre coronavirus de groupes différents (Laude H. et Masters P.S., 1995).

Un caractère intéressant est que c'est l'une des protéines les plus précocement détectée dans les cellules infectées (trois à cinq heures après l'infection) et que sa synthèse est maintenue tout au long du cycle viral. La protéine N joue probablement un rôle dans le complexe de réplication-transcription. Elle ne paraît cependant pas indispensable à ce processus mais permet d'en améliorer l'efficacité. La synthèse d'ARN génomique est couplée à l'encapsidation de la protéine N, ce qui lui confère aussi un rôle structural (Shi S.T. et Lai M.M., 2005). De plus, elle constitue un déterminant immunogène important et stable.

La protéine HE

La protéine HE a une structure dimérique et forme une double rangée de petits spicules à la surface du virion (Figure 15). Elle n'est retrouvée que les chez les coronavirus du groupe 2.

Elle possède une activité hémagglutinante et acétyl-estérase et induit la formation d'anticorps neutralisants. Cependant, son expression est très variable et même au sein des coronavirus du groupe 2, elle n'est pas retrouvée de façon systématique, ce qui en fait une des protéines dites "accessoires" malgré sa fonction structurale. Son rôle exact reste encore assez obscur. Parmi les HCoV, seules les souches OC43 et HKU1 en sont dotées (Vabret A. *et al.*, 2009).

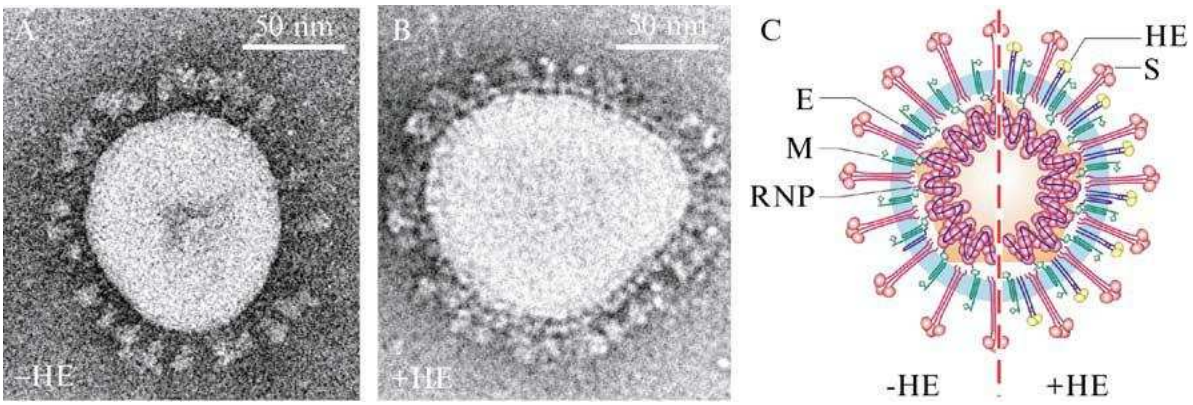


Figure 15 : Protéine HE chez le MHV, souche A59, en microscopie électronique

La présence des protéines HE forme une seconde couronne, plus petite que celle formée par les spicules.
En A : MHV-A59 sans protéine HE
En B: MHV-A59 avec protéine HE
En C : Représentation schématique du virion avec et sans la protéine HE
(de Haan C.A. et Rottier P.J., 2005a).

3.3.3 Les protéines non structurales ou "accessoires"

Les gènes dits "accessoires" ou "non-essentiels", codant des protéines non structurales, sont spécifiques d'une espèce virale ou d'un petit nombre d'espèces appartenant à un même groupe phylogénétique. Historiquement, certains de ces gènes étaient considérés comme des marqueurs groupe-spécifiques des coronavirus. Cependant avec l'avancée des connaissances sur les coronavirus, il est apparu que ces gènes n'étaient pas obligatoirement présents chez les virus rattachés à un même groupe.

Ces gènes, en nombre variable (de 2 à 8), sont situés en aval du gène *Rep*. Ils sont intercalés entre les gènes S, E, M, N ou encore situés à l'extrémité 3' du génome (Gorbalenya A.E.*, et al.*, 2006).

Les coronavirus du groupe 1 peuvent avoir de deux à trois gènes "accessoires" entre les gènes S et E et jusqu'à deux gènes supplémentaires en aval du gène N. Les virus du groupe 2 constituent le groupe le plus hétérogène et peuvent avoir entre 2 et 8 gènes "accessoires". Par exemple, le MHV, le HCoV OC43 ou le HCoV HKU1 possèdent, notamment, le gène HE, situé entre le gène *Rep* et le gène S alors que le SARS-CoV, classé dans le groupe 2, ne le possède pas. De plus, le SARS-CoV possède entre sept et huit gènes "accessoires" qui lui sont uniques. Les coronavirus du groupe 3, aviaires exclusivement, ne possèdent que deux gènes "accessoires", l'un entre les gènes S et E et l'autre entre les gènes M et N.

Ces gènes sont désormais connus pour ne pas être essentiels à la réplication virale en culture cellulaire, d'où leur nom, mais ils jouent très probablement un rôle important lors de l'infection *in vivo* et notamment au niveau de la virulence. Pour illustration, dans le cas du TGEV, la délétion du gène 7, situé à l'extrémité 3' du génome, n'a que peu de conséquences sur sa réplication en culture cellulaire. Cependant, *in vivo*, cette délétion réduit les titres viraux dans les organes cibles (poumons et intestin) d'environ cent fois, réduisant dans le même temps considérablement la virulence (Ortego J. *et al.*, 2003).

3.4 Une structure génomique caractéristique et une réplication "nichée" originale

Les *Coronaviridae,* et plus largement les *Nidovirales,* ont développé une stratégie originale de réplication qualifiée de "nichée". Cette dernière résulte notamment de la structure du génome dont le schéma de base est conservé au sein de la famille des *Coronaviridae* et décrit ci-dessus (Bibliographie, 3.3.1, p.62).

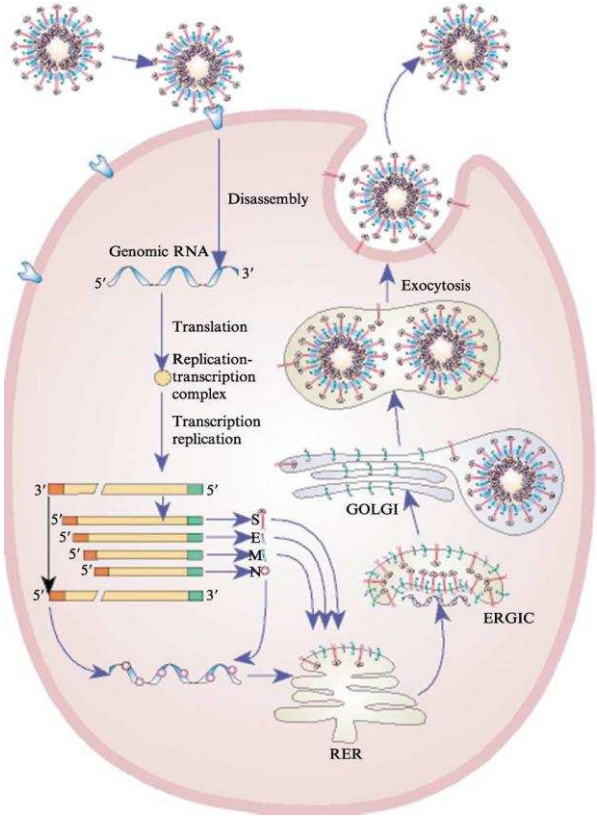


Figure 16 : Cycle infectieux des coronavirus (de Haan C.A. et Rottier P.J., 2005b)

Entrée du virus et libération du génome

Le cycle infectieux des *Coronavirus* (Figure 16) est au premier abord similaire à celui d'autres virus à ARN. La première étape consiste en l'attachement du virus sur son récepteur cellulaire par l'intermédiaire de la région S1 de la protéine S. Les coronavirus présentent une spécificité d'hôte et un tropisme cellulaire déterminé par la nature de ces récepteurs, caractéristique de l'espèce et dont un certain nombre sont identifiés (Tableau 5).

La deuxième étape consiste en la fusion des membranes virales et cellulaires via la région S2 de la protéine S. La libération de l'ARN génomique dans le cytoplasme se fait soit par fusion directe soit par voie endosomale selon le type cellulaire et le virus étudié.

Coronavirus	Récepteurs	Références
HCoV 229E, TGEV, FIPV, FECV (groupe 1)	**Aminopeptidase N (CD13)** Métalloprotéase présente à la surface de nombreuses cellules (intestinales, pulmonaires, rénales, macrophages, jonction synaptique), spécifique d'espèce	(Delmas B. *et al.*, 1992) (Yeager C.L. *et al.*, 1992) (Tresnan D.B. *et al.*, 1996) : FIPV, FEPV
HCoV OC43, BCoV (groupe 2)	**Acide N-acétyl-9-O-acétylneuraminique**	(Schultze B. et Herrler G., 1992)
MHV (groupe 2)	**Glycoprotéine de la famille des CEA** ("Carcinoembryonic antigen" ou antigène carcinoembryonnaire)	(Williams R.K. *et al.*, 1991)
SARS-CoV (groupe 2) HCoV NL63 (groupe 1)	**Métalloprotéase de type ACE2** ("Angiotensin-converting enzyme 2" ou enzyme de conversion de l'angiotensine de type 2) présente dans de très nombreux tissus (bronches, parenchyme pulmonaire, cœur, rein, tractus gastro-intestinal)	(Li W. *et al.*, 2003) (Hofmann H. *et al.*, 2005)

Tableau 5 : Correspondance entre les récepteurs spécifiques identifiés et les espèces de coronavirus

Synthèse de la polyprotéine porteuse de l'activité RdRp

Le génome étant libéré dans le cytoplasme de la cellule, la phase de réplication virale est initiée par la traduction du gène *Rep*, dont la structure est également caractéristique des *Nidovirales*. Il comporte deux ORFs chevauvants (ORFs 1a et 1b) liés par un pseudo-nœud. Ce dernier permet le glissement des unités ribosomiques effectuant la traduction de l'ORF 1a vers l'ORF 1b (Brierley I. *et al.*, 1987). Ainsi, deux polyprotéines peuvent être produites, la pp1a et la pp1ab, résultant du glissement ribosomal.

Pendant ou après cette synthèse, ces polyprotéines sont clivées par des protéases virales codée par l'ORF 1a, avec des activités de "papaine-like" ou de "chymotrypsine-like", en seize protéines nsp ('non structural proteins" ou protéines non structurales). Les protéines nsp 1 à 11 sont codées par

l'ORF1a et les protéines nsp 12 à 16 sont codées par l'ORF 1b. L'analyse des séquences des protéines nsp a révélé au moins huit activités enzymatiques différentes.

Sont retrouvées parmi ces activités, des activités enzymatiques communes avec d'autres virus à ARN, telles que l'activité de protéinase, de RdRp ou encore d'hélicase, mais d'autres activités semblent propres aux coronavirus (Sawicki S.G. et Sawicki D.L., 2005, Snijder E.J*., et al.*, 2003). Ces protéines nsp s'assemblent avec d'autres protéines virales, voire probablement des protéines cellulaires, pour former les complexes de réplication-transcription (RTC ou "replication-transcription complexes") (Sawicki S.G. *et al.*, 2007). Ces complexes s'accumulent dans la région périnucléaire et sont associés avec des vésicules à double membrane (Snijder E.J. *et al.*, 2006). En plus des protéines nsp, les RTC contiennent la protéine N, ce qui semble cohérent vu son rôle probable dans la synthèse d'ARN.

Synthèse des ARN subgénomiques par une transcription discontinue et "nichée"

Suite à la synthèse de ces protéines et aux RTC, le reste du génome peut être transcrit et le génome répliqué, pour former de nouveaux virions.

Les ORFs suivants (S, E, M et N ainsi que ceux codant les protéines "accessoires") vont être transcrits de 5’ vers 3’ et former un set d’ARN messagers subgénomiques (ARNm sbg), qualifiés de "nichés" du fait de leur extrémité 5’ commune (Figure 16) et résultant d'un processus de transcription discontinue.

La transcription est alors définie comme le processus permettant la production des ARNm sbg et la réplication comme celui produisant les ARN génomiques (Sawicki S.G*., et al.*, 2007). Différents modèles de transcription ont été proposés et l'un d'entre eux s'est imposé au cours des investigations sur les mécanismes de réplication des coronavirus et avec l'amélioration de la sensibilité des techniques de détection.

Une des composantes essentielles de cette transcription discontinue est la séquence TRS, existant en amont de chaque gène, et nommée "body TRS". Cette séquence joue un rôle fondamental dans le déroulement de la transcription en induisant une pause de la RdRp et en participant ainsi à la production des ARN sbg. Cette séquence existe également en 5' du génome, entre la séquence "leader" et le gène *Rep,* alors nommée "leader TRS". Elle est également essentielle à la transcription (Bibliographie, 3.3.1, p.62).

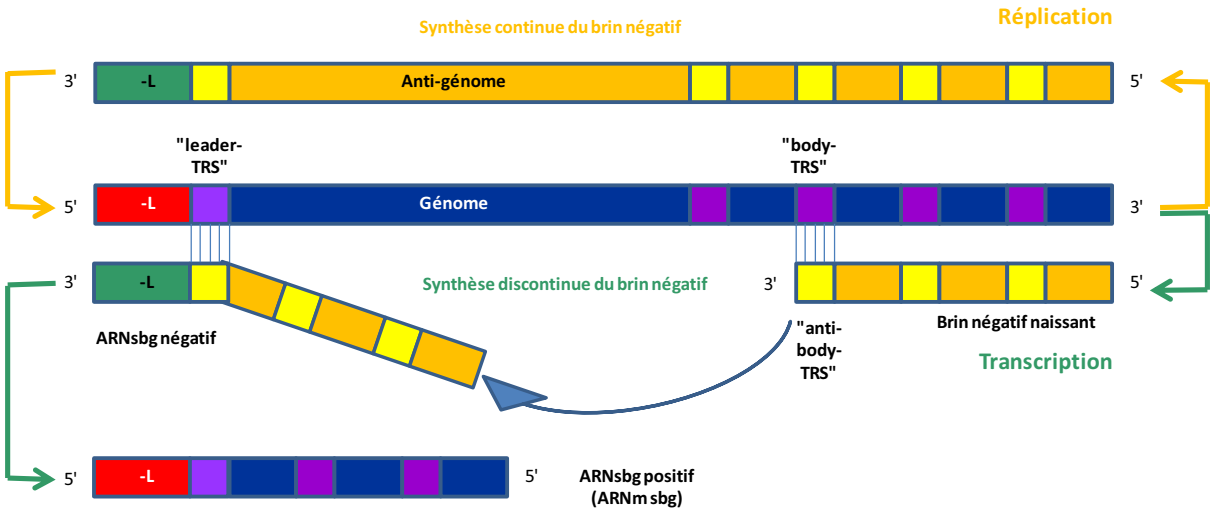


Figure 17 : Transcription discontinue des ARNsbg

Cette figure représente le modèle de transcription discontinue des brins d'ARN sbg négatifs à partir de la matrice génomique proposé par Sawicki et coll. (Sawicki S.G. et Sawicki D.L., 1995). Ce modèle propose que la synthèse des brins d'ARN négatifs soit continue pour la synthèse des antigénomes (réplication) ou alors discontinue, pour la synthèse des ARN sbg négatifs (transcription). Les séquences "body TRS" agissent alors comme des signaux d'arrêt de la transcription. Ainsi le brin négatif naissant possède en son extrémité 3' une séquence "anti-body-TRS" et va être alors guidé jusqu'à la séquence "leader TRS" en 5' du génome servant de matrice, grâce à un mécanisme d'appariement de bases. La synthèse s'achève alors par l'élongation avec une séquence anti-leader (-L) et les ARN sbg négatifs sont alors prêts à servir de matrice pour la synthèse des ARNm sbg (Pasternak A.O. *et al.*, 2006).

Ce modèle, proposé par l'équipe de Sawicki et coll. (Sawicki S.G. et Sawicki D.L., 1995), suggère que l'étape de transcription discontinue ait lieu lors de la synthèse des brins sbg négatifs. Ce processus de transcription peut se décomposer en plusieurs évènements (Figure 17) :

- Les composants d'un RTC fonctionnel sont recrutés et la synthèse d'un brin négatif est initiée à l'extrémité 3' du génome.
- L'élongation du brin d'ARN négatif naissant se poursuit jusqu'à rencontrer le premier "body TRS". Les RTC vont alors :
    - Soit ne pas tenir compte du motif TRS et continuer l'élongation du brin naissant,
    - Soit arrêter l'élongation du brin négatif naissant et se relocaliser pour achever sa synthèse.
- Cette "relocalisation" va être guidée par une complémentarité entre l'extrémité 3' du brin négatif naissant et la séquence "leader TRS" du génome. L'extension du brin naissant va se poursuivre et s'achever par la copie de l'extrémité 5' du génome (séquence "leader"). Ainsi, le brin d'ARN sbg négatif sera complet et pourra servir de matrice pour la synthèse d'ARNm sbg.

D'autres études ont largement conforté ce modèle (Baric R.S. et Yount B., 2000, Sawicki D. *et al.*, 2001, Zuniga S. *et al.*, 2004). De plus, la synthèse des nouveaux brins d'ARN génomiques sert non

seulement à la formation de nouvelles particules virales mais il servirait probablement aussi : (i) à la production de nouveaux RTC par production de la pp1ab et (ii) de matrice pour la synthèse de nouveaux brins d'ARN sbg et ainsi amplifierait ces différents processus (Pasternak A.O*., et al.*, 2006).

Synthèse protéique et assemblage des virions

Les ARNm sbg ainsi produits permettent finalement la traduction des gènes situés en aval du gène *Rep*, non accessible aux ribosomes à cause du saut ribosomal, induisant un changement dans le cadre de lecture. De plus, lors de leur traduction, seul l'ORF en aval de la séquence leader en 5' est traduit, ce qui implique que les ARNm sbg sont fonctionnellement monocistroniques.

De multiples copies de la protéine N sont produites et se complexent avec l'ARN génomique pour former la RNP. Les protéines structurales S, M et E (voire la protéine HE si cette dernière est présente) sont, quant à elles, transportées jusqu'à un compartiment intermédiaire entre le REG (réticulum endoplasmique granuleux) et l'appareil de Golgi que l'on nomme ERGIC. Elles s'associent alors avec la RNP et forment des particules virales par bourgeonnement (Krijnse-Locker J. *et al.*, 1994). Les protéines E et M sont indispensables à cette étape. Elles peuvent en effet former à elles seules des pseudo-particules virales, vides de nucléocapside et non infectieuses (Vennema H*., et al.*, 1996). La protéine M, particulièrement, joue un rôle central en donnant naissant à la matrice primaire de l'enveloppe virale, générée par les interactions entre la protéine M et les protéines E et S, et la protéine HE si cette dernière est présente, ainsi qu'avec la RNP. Les virions alors assemblés sont transportés à l'extérieur de la cellule en suivant la voie sécrétoire (de Haan C.A. et Rottier P.J., 2005b).

3.5 Pouvoir évolutif des coronavirus

Une résultante de cette réplication particulière et de la taille remarquable du génome des coronavirus, est la grande flexibilité dont ce dernier fait preuve ; ce qui confère à cette famille un haut potentiel évolutif. L'existence des protéines "accessoires", dont le rôle est peu ou pas connu et dont le nombre et la nature varient selon les souches de coronavirus, et au sein d'un même groupe phylogénétique, atteste également de cette flexibilité. Les deux modes d'évolution majeurs des coronavirus sont les mutations et les recombinaisons. En effet, la RdRp étant dépourvue de système de correction d'erreur, de nombreux mutants sont générés au fil des générations.

Ainsi, les coronavirus semblent supporter de larges délétions permettant l'émergence de nouvelles espèces comme le suggère l'émergence, dans les années 1980, du virus respiratoire porcin ou PRCV

("porcine respiratory coronavirus"). Ce virus est, en effet, apparu suite à des délétions survenues dans le génome du TGEV. Ces délétions survenues dans la région S1 des spicules ont en effet modifié le tropisme cellulaire, passant d'un tropisme intestinal à un tropisme respiratoire, sans changer la spécificité d'hôte, ces deux virus infectant le porc (Laude H. *et al.*, 1998, Rasschaert D. *et al.*, 1990).

Ces phénomènes évolutifs sont très certainement à l'origine de recombinaisons entre coronavirus infectant des espèces différentes et la possibilité de franchissement de la barrière d'espèce (Figure 18). Certaines études ont en effet mis en évidence, par des analyses phylogénétiques, l'existence d'ancêtres communs au sein du groupe des coronavirus qui auraient, au cours de leur évolution, changé de tropisme ou d'hôte.

L'équipe de Vijgen et coll. a montré, par exemple, que le HCoV OC43 semble provenir de l'évolution du BCoV. Le séquençage du génome du HCoV OC43 a permis la comparaison avec les séquences des autres coronavirus du groupe 2. Il a résulté de ces différentes analyses, que le HCoV OC43 est extrêmement proche du BCoV avec une similarité nucléotidique supérieure à 93,5% selon les ORFs. La combinaison de différents outils de bioinformatique a alors permis de dater le plus récent ancêtre commun aux environs des années 1890. Des données épidémiologiques datant de cette période ont alors éveillé la curiosité de cette équipe. En effet, à la fin du 19ème siècle, ont été décrites des épidémies mondiales attribuées *a priori* à la grippe. La pandémie de 1889-1890, probablement originaire d'Asie, était caractérisée par : malaise, fièvre et symptômes neurologiques prononcés (symptômes pouvant être provoqués par certains coronavirus chez les animaux). Une augmentation du taux de mortalité a été observée lors de cette épidémie. L'absence d'échantillons de tissus provenant de patients atteints lors de cette pandémie a empêché d'identifier l'agent causal, virus de la grippe ou autre. L'hypothèse suivante a alors été soulevée sans qu'une réponse puisse y être apportée. Cette épidémie résulterait-elle du passage du BCoV chez l'Homme et donc de l'émergence du HCoV OC43? Mais cela ne reste qu'une hypothèse…(Vijgen L. *et al.*, 2005).

Le SRAS-CoV comme nous le verrons plus tard (Bibliographie, 3.7.2, p.85), résulte également de ce type d'évolution et des capacités de franchissement de la barrière d'espèce dont les coronavirus font preuve.

3.6 Epidémiologie et pouvoir pathogène chez les animaux

Les coronavirus présentent une large variété d'hôtes, des mammifères aux oiseaux, et des tropismes variés selon les souches (Figure 18). Ils sont responsables d'infections gastro-intestinales, respiratoires voire neurologiques. Ce paragraphe a pour but de décrire les principales pathologies rencontrées chez les animaux, sans avoir, toutefois, la vocation d'être exhaustif.

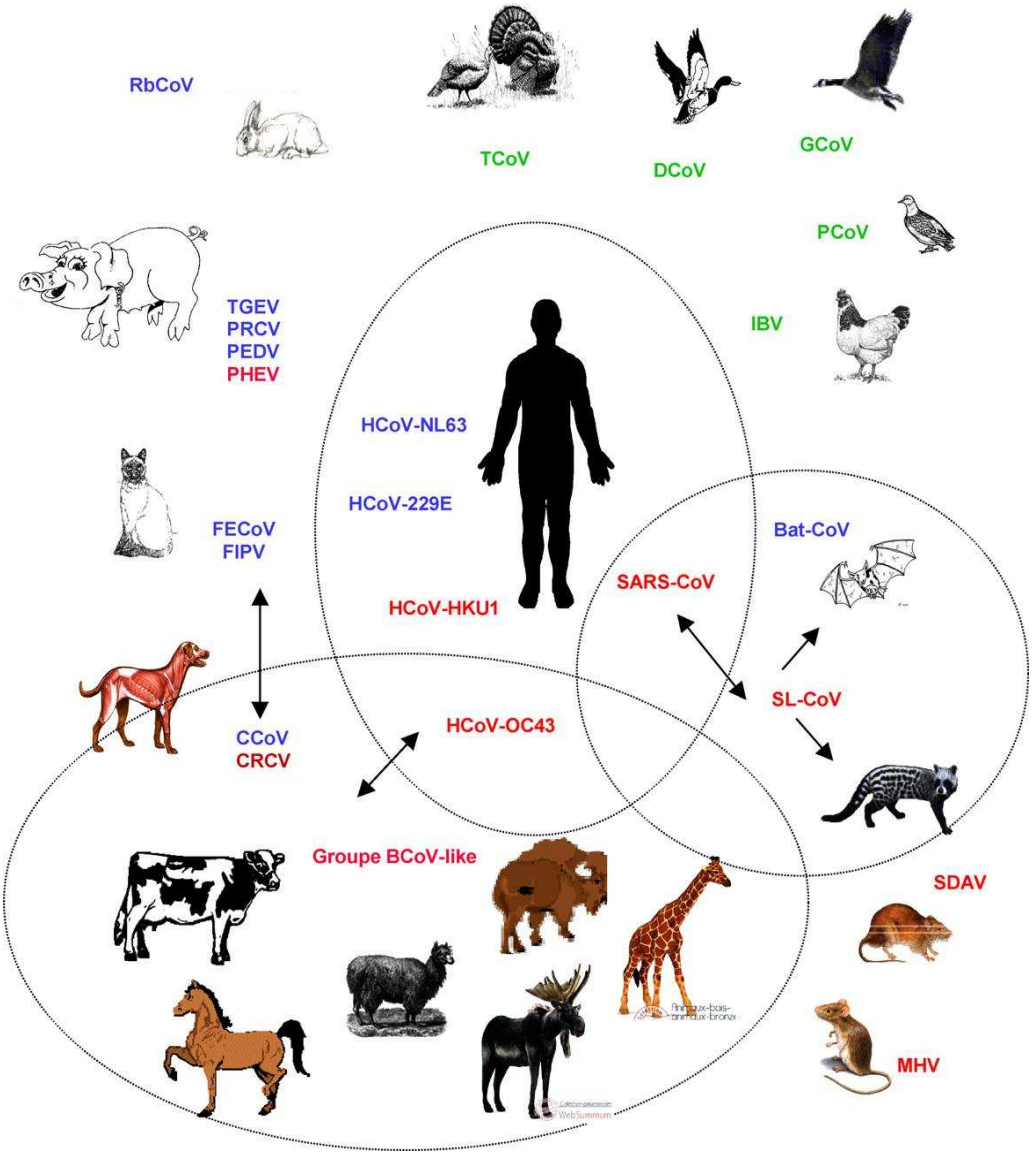


Figure 18 : Spectre d'hôtes des différentes espèces de coronavirus

Les coronavirus du groupe 1 sont écrits en bleu, ceux du groupe 2, en rouge, et ceux du groupe 3 en vert. Les flèches indiquent les hypothétiques franchissements de barrières d'espèces avec réussite émergentielle (Vabret A., *et al.*, 2009).

Coronavirus porcins

Les coronavirus infectant les porcs appartiennent tous au groupe 1. Ils sont à l'origine de grandes épidémies, survenues dans les élevages porcins du monde entier et à l'origine de lourdes pertes économiques.

Le PEDV est responsable de diarrhées sévères chez les porcelets. Le TGEV provoque, quant à lui, une virose bien connue depuis les années 1940 chez les éleveurs porcins, caractérisée par un syndrome diarrhéique sévère chez les animaux de tous âges mais avec une gravité particulière chez les animaux nouveau-nés. Le taux de mortalité atteint ainsi quasiment 100% chez les animaux de moins de deux semaines. Les symptômes étant comparables à ceux induits par le PEDV, ces deux virus sont assez difficiles à différencier sur de simples critères cliniques (Laude H*., et al.*, 1998, Li B.X. *et al.*, 2007).

Le PRCV provient quant à lui de délétions survenues chez le TGEV et ayant ainsi changé de tropisme (Bibliographie, 3.5, p.71). Le tractus respiratoire devient alors le site de réplication majeur de ce virus. Cependant, bien que se multipliant intensément dans la sphère respiratoire, le PRCV y exerce un pouvoir pathogène discret (absence de symptôme ou atteinte respiratoire plus ou moins bénigne avec dyspnée, éternuement et fièvre modérée). Sur le terrain, l'infection à PRCV est très généralement décrite comme étant inapparente. Ce virus a en effet été mis en évidence suite à des surveillances épidémiologiques et non à cause de symptômes respiratoires qui seraient apparus dans les élevages (Laude H*., et al.*, 1998).

Coronavirus bovins

Le BCoV, coronavirus du groupe 2, est connu pour provoquer des diarrhées sévères chez le veau mais aussi chez les bovins adultes (*Bos taurus*), particulièrement en hiver, causant ce qui est appelé la"dysenterie hivernale". Le BCoV présente aussi un tropisme respiratoire et a été associé à des syndromes respiratoires, i.e. dyspnée sévère, fièvre, rhinotrachéite mais sans lésions pulmonaires remarquables, aussi bien chez les bovins nouveaux nés que chez les adultes (Cho K.O. *et al.*, 2001, Decaro N. *et al.*, 2008).

Coronavirus félins

Chez les félins, et plus particulièrement chez le chat domestique (*Felis silvestris catus*) chez lequel ils ont été identifiés, les coronavirus sont responsables de la péritonite infectieuse féline (FIP ou "Feline infectious peritonitis"). Cette infection décrite pour la première fois dans les années 1960 est due à

un coronavirus, nommé FCoV ("feline coronavirus" ou coronavirus félin) et appartenant aux coronavirus du groupe 1.
Il existe au sein de la littérature des confusions au niveau de la dénomination des coronavirus félins. Il apparaît donc judicieux de définir ici ces différentes dénominations pour plus de lisibilité. On retrouve en effet trois noms associés aux coronavirus félins du groupe 1 : le FECV ("Feline enteric coronavirus" ou coronavirus entérique félin), le FIPV ("feline infectious peritonitis virus" ou virus de la péritonite infectieuse féline) et le FCoV.

Le FECV et le FIPV sont en fait des biotypes particuliers du FCoV. Le FECV est un biotype ubiquitaire, plutôt modéré. Il est ainsi responsable d'infections gastro-intestinales souvent asymptomatiques, ou alors modérées, chez les chatons. Le FIPV est lui un biotype virulent, qui, lorsqu'il apparaît, est responsable d'infections chroniques, systémiques, souvent fatales.

Le FIPV semble survenir par un processus de mutation rapide (par délétion) lors d'une infection chronique avec le FECV (Poland A.M. *et al.*, 1996, Vennema H. *et al.*, 1998). D'ailleurs, dans la nouvelle classification de l'ICTV de 2009, ces virus sont regroupés sous le même nom d'espèce, i.e. les *alphacoronavirus 1 (ICTV, 2009a, ICTV, 2009b)* ; ces *alphacoronavirus 1* regroupant en plus des FCoV, le TGEV et le CCoV dont les identités de séquence sont trop élevées pour être considérées comme des espèces différentes.

La FIP, provoquée par le biotype FIPV, est retrouvée chez les chats domestiques de tous les continents et sa transmission est féco-orale. L'immunité contre ces virus est faible et non persistante, les réinfections sont donc possibles. La mortalité est élevée chez les chatons de trois à seize mois mais faible après cinq ans (Pedersen N.C., 2009). Ces infections sont alors caractérisées par une péritonite fibronécrotique et pyogranulomateuse associée parfois à une pleurite. Chez les chatons, un retard de croissance est également à noter. Le FIPV peut également se propager au système nerveux central où il peut provoquer une méningoencéphalite granulomateuse ou encore une atteinte oculaire de type uvéite (Tresnan D.B.*, et al.*, 1996). Le FIPV a également été identifié chez des félidés de nature plus exotique comme le guépard (*Acinonyx jubatus*), causant des épidémies meurtrières au sein de réserves naturelles (Pfeifer M.L. *et al.*, 1983).

Coronavirus canins

Les canidés, notamment le chien domestique (*Canis lupus familiaris*) ont eux-aussi leur coronavirus, le CCoV, coronavirus du groupe 1. Il s'agit d'un virus à tropisme entérique, provoquant des syndromes diarrhéiques associés à une déshydratation. Sa transmission est féco-orale. La mortalité

induite par ce virus chez les chiens est faible (Tennant B.J. *et al.*, 1991). Le CCoV infecte aussi des animaux sauvages et a été identifié dans le sérum de loups (*Canis lupus lupus*) en Alaska au cours d'études épidémiologiques (Zarnke R.L. *et al.*, 2001) et également chez des hyènes (*Crocuta crocuta*) de Tanzanie (East M.L. *et al.*, 2004).

Coronavirus infectant les rongeurs

Le MHV, coronavirus du groupe 2 et l'un des premiers coronavirus identifiés, infecte les souris et plus généralement les rongeurs. Il en existe différentes souches ayant des pathogénicités diverses et des tropismes variés. Elles peuvent être responsables d'entérites, d'hépatites, fulminantes ou non, ou encore d'encéphalites.

Par exemple, la souche MHV-A59 peut être responsable d'hépatites sévères ou de méningo-encéphalites avec démyélinisation chronique (Leparc-Goffart I. *et al.*, 1998).
La souche MHV-JHM présente quant à elle un tropisme neurologique et est à l'origine d'encéphalomyélites disséminées avec destruction extensive de la myéline, induisant une paralysie progressive des membres postérieurs associée à des signes d'incoordination motrice. Son évolution est le plus souvent fatale (Cheever F.S*., et al.*, 1949).

Les différentes souches de MHV présentent de plus un intérêt scientifique non négligeable. Elles ont en effet largement permis l'avancée des connaissances sur les coronavirus, que ce soit au niveau de leur réplication, de leur tropisme, etc., car il s'agit certainement du coronavirus le plus étudié en tant que modèle.

Un autre coronavirus du groupe 2, le SDAV ("Syalodacryoadenitis virus" ou virus de la syalodacryoadénite), infecte les rongeurs et plus précisément le rat (*Ratus norvegicus*), notamment ceux de laboratoire. Il possède un tropisme respiratoire et est responsable d'infections, très contagieuses, des glandes lacrymales et salivaires ainsi que de rhinites, trachéites, bronchites ou encore bronchiolites (Bihun C.G. et Percy D.H., 1994, Liang S.C. *et al.*, 1995).

Coronavirus infectant les oiseaux

Les oiseaux sont infectés exclusivement par les coronavirus du groupe 3.
L'IBV, tête de file de ce groupe et connu depuis les années 1940, était connu pour présenter un tropisme respiratoire chez les poulets (*Gallus gallus domesticus*). Il touche préférentiellement les jeunes individus de moins de six semaines. Les symptômes les plus fréquents sont un syndrome

bronchitique avec râles trachéaux, toux et éternuements. La mortalité peut atteindre 10%, notamment à cause d'association avec des microorganismes opportunistes. Ce virus a été à l'origine de lourdes pertes économiques. Cependant, les souches d'IBV peuvent différer dans leur virulence et dans leur tropisme. Il existe ainsi des souches d'IBV néphrogéniques, très répandues en Australie dans les années 1960-1970, mais restées sporadiques dans le reste du monde. L'infection par les souches d'IBV néphrogéniques est caractérisée par de gros reins, de couleur claire. Des dépôts de cristaux d'urate sont fréquents au niveau des tubules rénaux. Les volailles sont atteintes d'un syndrome de déshydratation sévère associé à une perte de poids. La mortalité est beaucoup plus élevée qu'avec les souches à tropisme respiratoire, et peut monter jusqu'à 30 à 40%. Il peut exister des souches avec un double tropisme, respiratoire et rénal (Ignjatovic J. *et al.*, 2002).

Un autre virus aviaire, le TCoV ("Turkey coronavirus" ou coronavirus de la dinde) provoque des infections intestinales chez la dinde (*Melleagris gallopavo*).

Enfin, d'autres virus aviaires, rapprochés de l'IBV, ont été identifiés plus récemment provoquant des infections respiratoires chez les faisans (*Phasianus colchicus*), les oies cendrées (*Anser anser*), les pigeons (*Columbia livia*) ou encore les canards colverts (*Anas platyrhynchos*) (Cavanagh D., 1995, Jonassen C.M.*, et al.*, 2005).

Coronavirus infectant les chauves-souris

D'autres virus, rattachés soit au groupe 1 soit au groupe 2, infectent les chauves-souris. Ces virus ont été découverts suite à l'épidémie de SRAS en 2002-2003, où l'origine zoonotique de ce virus a déclenché la mise en œuvre d'études systématiques sur les coronavirus infectant les animaux sauvages. Une étonnante diversité de coronavirus infectant les chauves-souris a alors été mise à jour.

Deux premiers coronavirus ont été identifiés, le bat-SARS-CoV, i.e. coronavirus de la chauve-souris apparenté au SARS-CoV (Lau S.K.*, et al.*, 2005), *a priori* à l'origine de l'épidémie de SRAS, dont nous reparlerons plus tard (Bibliographie, 3.7.2.4, p.90), et un autre coronavirus rattaché au groupe 1 (Poon L.L.*, et al.*, 2005). Par la suite, au cours de l'étude de treize espèces de chauves-souris différentes par Woo et coll., non moins de six nouveaux coronavirus infectant six espèces différentes de chauves-souris ont été identifiés ; quatre d'entre eux ayant été rattachés au groupe 1 et les deux autres au groupe 2.

Cette diversité remarquable des coronavirus chez les chauves-souris relèvent de différents facteurs : (i) le nombre d'espèces très élevé de chauves-souris; (ii) leur capacité à voler et leur caractère ubiquitaire et (iii) l'habitude des chauves-souris de se rassembler, créant ainsi un fort potentiel

d'échange entre individus (Woo P.C. *et al.*, 2006). Bien que la pathogénicité de ces virus chez les chauves-souris ne soit pas encore connue, leur identification dans les échantillons fécaux de chauves-souris laisse penser à un tropisme entérique (Lau S.K.*, et al.*, 2005, Poon L.L.*, et al.*, 2005, Woo P.C.*, et al.*, 2006).

Les coronavirus sont ainsi amplement retrouvés au sein du règne animal, que les animaux soient domestiques ou sauvages, à poils ou à plumes. Un coronavirus a d'ailleurs été récemment reconnu pour infecter un mammifère marin, la baleine Beluga (*Delphinapterus leucas*) (Mihindukulasuriya K.A. *et al.*, 2008). Considérant le fort potentiel évolutif de ces virus et les possibilités de franchissement de barrière d'espèce, il est important de connaître le potentiel pathogène des coronavirus chez les animaux d'un point de vue vétérinaire bien sûr, mais aussi, afin de mieux comprendre ce qu'ils peuvent provoquer chez l'Homme.

3.7 Epidémiologie et pouvoir pathogène chez l'Homme

3.7.1 Les HCoV “classiques” et les HCoV nouvellement identifiés

La chronologie des évènements concernant la famille des *Coronaviridae* et plus particulièrement celle des coronavirus Humains font que les HCoV 229E et OC43 sont souvent désignés comme les coronavirus "classiques" alors que les HCoV NL63 et HKU1, identifiés en 2004 et en 2005 respectivement, sont désignés comme les "nouveaux" coronavirus. Ces derniers ont été mis en évidence suite au regain d'intérêt qu'a suscité la famille des *Coronaviridae* après l'épidémie de SRAS (Bibliographie, 3.7.2, p.85). Ces virus sont responsables d'infections respiratoires mais ont été aussi associés à des pathologies digestives et neurologiques.

3.7.1.1 Les HCoV “classiques”: les souches 229E et OC43

Les HCoV 229E et OC43 ont été identifiés dans les années 1960 après inoculation de virus jusqu'alors inconnus à des volontaires sains. Ces virus provoquaient des pathologies respiratoires hautes et différaient des myxovirus connus à l'époque pour provoquer de telles maladies (Tyrrell D.A. et Bynoe M.L., 1965). Les HCoV 229E et OC43, coronavirus des groupes 1 et 2, respectivement, ont alors été mis en évidence et caractérisés par propagation sur culture d'organes (épithélium de trachée) puis de

cellules et par microscopie électronique (Almeida J.D. et Tyrrell D.A., 1967, Bradburne A.F. *et al.*, 1967, Hamre D. et Procknow J.J., 1966, McIntosh K.*, et al.*, 1967).

Ils sont ainsi connus depuis longtemps pour être responsables d'environ 20% des rhumes communs mais aussi d'autres infections touchant la sphère respiratoire haute de type laryngite ou pharyngite (Hamre D. et Procknow J.J., 1966, Larson H.E.*, et al.*, 1980, Vabret A. *et al.*, 2005b).

Ils ont aussi été impliqués dans des pathologies respiratoires plus graves et affectant la partie basse du tractus respiratoire, i.e. bronchite, bronchiolite, pneumonie ou exacerbation d'asthme (Talbot H.K. *et al.*, 2009, Vabret A.*, et al.*, 2003, Vabret A. *et al.*, 2001, Van Elden L.J.*, et al.*, 2004). Cependant, ces infections sont retrouvées de façon majoritaire chez des patients ayant un terrain fragilisé comme les prématurés, les nourrissons et les jeunes enfants (Gagneur A.*, et al.*, 2002b, McIntosh K. *et al.*, 1974), les patients immunodéprimés ou porteurs d'une maladie sous-jacente (Gerna G. *et al.*, 2006, Pene F.*, et al.*, 2003), les personnes âgées (Falsey A.R.*, et al.*, 2002, Nicholson K.G.*, et al.*, 1997). Ils ont de plus été retrouvés lors d'une épidémie de pneumonie chez des adultes sains mais dans un contexte militaire (Wenzel R.P. *et al.*, 1974).

3.7.1.2 La souche NL63

La souche NL63 a été identifiée en 2004 par trois équipes différentes et indépendamment, mais sa "paternité" revient cependant à l'équipe Hollandaise de Van der Hoek. Ils ont isolé ce virus dans les prélèvements respiratoires d'un enfant de sept mois présentant un rhume, une conjonctivite et de la fièvre. La radiographie pulmonaire montrait une image typique de bronchiolite. Après élimination des autres causes virales, incluant les HCoV 229E et OC43, et propagation d'un virus sur culture cellulaire avec production d'un ECP (effet cytopathogène), ils ont identifié un nouveau virus grâce à une nouvelle méthode de biologie moléculaire utilisant l'amplification de l'ADN complémentaire de fragments de restriction. L'analyse du génome de ce virus a permis de le rapprocher du HCoV 229E et de l'affilier au groupe 1 des coronavirus. Suite à cette découverte, cette équipe a recherché ce nouveau coronavirus chez d'autres patients hospitalisés atteints de pathologies respiratoires et ils ont pu l'isoler chez sept patients, quatre enfants de moins d'un an et trois adultes dont deux immunodéprimés. Ces patients n'étant porteurs d'aucun autre agent pathogène connu, l'imputabilité du HCoV NL63 dans ces infections respiratoires a alors été reconnue (Van der Hoek L.*, et al.*, 2004).

La deuxième équipe ayant identifié ce "nouveau" virus, à la même période, est une équipe Américaine du Connecticut. La détection de ce nouveau virus a été faite par une RT-PCR ciblant une partie conservée du gène *Rep*. Il s'est en fait avéré, après comparaison des séquences, que ce

nouveau virus et le virus identifié aux Pays-Bas appartenaient à la même espèce et ont donc été réunis sous le nom de HCoV NL63. Des prélèvements ont alors été réalisés chez des enfants atteints d'infections respiratoires, en ambulatoire et/ou hospitalisés. Le HCoV NL63 a été retrouvé dans 8,8% des cas et plus de 60% d'entre eux avaient moins d'un an. Ces patients étaient atteints d'infections respiratoires, hautes ou basses, avec comme symptômes les plus fréquents, toux, rhinorrhée, tachypnée et fièvre. Parmi eux, plus de la moitié avait une comorbidité associée (enfant prématuré, immunodépression, affection cardiaque congénitale) (Esper F. *et al.*, 2005).

Enfin, toujours la même année, Fouchier et coll. ont identifié un coronavirus inconnu dans des prélèvements respiratoires, datant de 1988, provenant d'un enfant de huit mois et souffrant de pneumonie. Après culture cellulaire, observation en microscopie électronique et analyse du génome, il s'est avéré qu'il s'agissait là aussi de la même souche NL63. Une étude menée par la même équipe sur 139 patients hospitalisés et atteints d'une infection respiratoire, avec fièvre, toux et rhinorrhée, a montré la présence du HCoV NL63 dans 3% des cas où aucun autre pathogène n'avait pu être identifié (Fouchier R.A. *et al.*, 2004).

La découverte de ce virus la même année avec une large distribution géographique, ainsi que sa présence dans un prélèvement datant de 1988, montre qu'il ne s'agit pas d'un virus émergent, mais bien d'un virus nouvellement identifié qui circulait déjà dans la population générale. Il a d'ailleurs été identifié dans de nombreux autres pays tels que la France, le Canada, l'Allemagne, l'Australie etc. (Arden K.E. *et al.*, 2005, Bastien N. *et al.*, 2005, Vabret A.*, et al.*, 2005b, Van der Hoek L. *et al.*, 2005). Son identification tardive provient en partie du fait que les coronavirus ne sont que rarement recherchés en routine et que les techniques classiques de détection sérologique induisaient des réactions croisées qui pouvaient peut-être détecter ce virus mais pas le différencier.

3.7.1.3 La souche HKU1

Le premier cas de HKU1-CoV a été identifié chez un patient chinois de 71 ans porteur d'une bronchopneumopathie obstructive. Ce patient avait été hospitalisé en Janvier 2004 suite à un épisode fiévreux associé à une toux productive avec des crachats purulents qui duraient depuis deux jours. Les différentes analyses n'ont pas pu identifier d'agent pathogène. Une RT-PCR, ciblant une partie du gène *Rep*, a été mise en œuvre et un coronavirus a pu être détecté. Une analyse complète du génome de ce coronavirus a été menée et il a été comparé à celui des autres coronavirus. Il présentait 84% d'identité de séquence avec le MHV et 82% avec le HCoV OC43. Suite à ces analyses, il a été montré qu'il s'agissait d'un coronavirus encore non identifié et a été affilié au groupe 2. Il a été nommé le HCoV HKU1. Des cultures cellulaires ont été mises en œuvre mais aucun ECP n'a été

détecté et des RT-PCR réalisées sur les surnageants de culture n'ont pas révélé de réplication virale. Ceci souligne la difficulté de cultiver les isolats cliniques de coronavirus.

Cependant, l'imputabilité du HKU1 dans cette pneumonie a été démontrée par le titre viral élevé dans les sécrétions respiratoires lors de la phase aiguë de la maladie, suivie d'une diminution de ce titre lors de la convalescence du patient et de l'apparition des anticorps. Le patient s'est amélioré cliniquement et a pu sortir de l'hôpital après cinq jours d'hospitalisation. La même équipe, Woo et coll., a par la suite mené une étude rétrospective sur 400 échantillons respiratoires prélevés lors de l'épidémie de SRAS en 2002-2003 et négatif pour le SARS-CoV. Un de ces échantillons s'est révélé positif pour le HKU1-CoV. Il s'agissait d'une femme de 35 ans, sans antécédent, hospitalisée pour une pneumonie dont la cause n'avait pas pu être déterminée. Il y a donc eu deux prélèvements, réalisés à un an d'intervalle, chez deux personnes n'ayant pas eu de contact. Ainsi, il s'agit, là aussi, très probablement d'un virus circulant déjà dans la population Humaine, donc non émergeant, mais qui n'avait pas encore été identifié (Woo P.C*., et al.*, 2005a). Des études ultérieures ont confirmé ces premières analyses. Une autre étude rétrospective menée à Hong-Kong a montré la présence du HCoV HKU1 dans 2,4% des échantillons prélevés, lors de l'épidémie de SRAS, chez des patients hospitalisés pour pneumonie communautaire et pour laquelle aucun agent pathogène n'avait été identifié. Presque 50% de ces patients présentaient des comorbidités (Woo P.C. *et al.*, 2005b). Des études Australiennes et Italiennes ont également retrouvé ce virus dans 3,1% et 2,3%, respectivement, des prélèvements de patients avec des infections respiratoires hautes et basses sans cause identifiée. La majorité de ces patients étaient des enfants et des patients immunodéprimés (Gerna G. *et al.*, 2007, Sloots T.P. *et al.*, 2006).

3.7.1.4 Pathologies respiratoires et diagnostic

Ainsi, Les coronavirus Humains sont responsables majoritairement d'infections respiratoires. Ces infections présentent certaines constantes quelles que soient les souches (Tableau 6).

La durée d'incubation est en général courte, de deux à trois jours. Les épidémies sont majoritairement hivernales avec des pics de Janvier à Mars (Esposito S. *et al.*, 2006, Gerna G*., et al.*, 2006, Gerna G*., et al.*, 2007, Van der Hoek L*., et al.*, 2004) avec une exception, observée à Hong-Kong, où la prévalence du HCoV NL63 était beaucoup plus forte au printemps et en été. Cela peut être dû à la situation subtropicale de Hong-Kong (Chiu S.S. *et al.*, 2005, Lau S.K. *et al.*, 2006).

Selon les études, les HCoV sont retrouvés dans 3 à 11% des prélèvements respiratoires des patients présentant des infections respiratoires, les proportions des différentes espèces variant de façon

cyclique selon les années et les régions (Chiu S.S., *et al.*, 2005, Esposito S., *et al.*, 2006, Gerna G., *et al.*, 2006, Gerna G., *et al.*, 2007). Les variations dans ces pourcentages sont aussi dues aux choix des populations cibles.

Characteristics	HCoV-229E (n = 33)	HCoV-NL63 (n = 13)	HCoV-OC43 (n = 11)	HCoV + other respiratory viruses (n = 22)
Demographic data				
Gender, males (%)	21 (63.6)	6 (54.6)	6 (46.2)	10 (45.4)
Mean age ± SD (years)	3.43 ± 3.02*	2.02 ± 1.45	1.42 ± 1.12	3.85 ± 3.42*
Clinical presentation				
Presence of fever (%)	20 (60.6)	7 (53.8)	6 (54.6)	11 (50.0)
Respiratory tract infection (%)	25 (75.8)**	10 (76.9)**	9 (81.8)**	18 (81.8)**
Common cold (%)	9 (27.3)	3 (23.1)	3 (27.3)	6 (27.2)
Pharyngitis (%)	12 (36.4)	3 (23.1)	4 (36.4)	7 (31.8)
Acute otitis media (%)	1 (3.0)	1 (7.7)	2 (18.2)	3 (13.6)
Croup (%)	1 (3.0)	1 (7.7)	0 (0)	0 (0)
Wheezing (%)	1 (3.0)	1 (7.7)	0 (0)	1 (4.5)
Pneumonia (%)	1 (3.0)	1 (7.7)	0 (0)	1 (4.5)
Gastrointestinal tract infection (%)	5 (15.2)	3 (23.1)	2 (18.2)	3 (13.6)
Conjunctivitis (%)	1 (3.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Fever without source (%)	2 (6.0)	0 (0)	0 (0)	1 (4.6)

HCoV, coronavirus;
*$P < 0.05$ versus HCoV-NL63 and versus HCoV-OC43.
**$P < 0.05$ versus gastrointestinal tract infection, versus conjunctivitis, and versus fever without source; no other significant differences between the groups.

Tableau 6 : Symptômes induits par les HCoV chez des enfants sains de moins de 15 ans

Etude réalisée chez des enfants de moins de 15 ans admis dans un service d'Urgence à Milan (Italie) pour une pathologie aigue (respiratoire, gastro-intestinale, rénale etc.) hors traumatisme et n'ayant par ailleurs aucun antécédent. La proportion des HCoV sur le total des échantillons est de 3,8% (79/2060 échantillons). Sont représentés dans ce tableau, les différents symptômes présentés par les enfants HCoV positifs. Aucun HCoV HKU1 n'avait été détecté (Esposito S., *et al.*, 2006).

Il faut noter, que selon les études, 30 à 60% des infections respiratoires restent orphelines et aucun agent pathogène n'est identifié, sachant que les coronavirus sont encore très rarement recherchés en routine (Boivin G. *et al.*, 2003, Davies H.D. *et al.*, 1996, Vabret A., *et al.*, 2005b).

Ils sont responsables d'infections respiratoires hautes, en général bénignes, dans la population générale dont la prévalence n'est de ce fait que mal connue. Ils sont, par ailleurs, responsables d'atteintes de la partie basse du tractus respiratoire parfois sévères chez les patients ayant un terrain fragile (Vabret A., *et al.*, 2008). A l'hôpital, on retrouve les HCoV généralement en quatrième ou cinquième position derrière les influenzavirus, le RSV, les adénovirus voire les rhinovirus, quand ceux-ci sont recherchés. Leur proportion est à peu près équivalente, selon les études, à celles du métapneumovirus Humain et des PIV (Esposito S., *et al.*, 2006, Gerna G., *et al.*, 2006).

Diagnostic

Le diagnostic était historiquement basé sur la microscopie électronique. Cependant, cette technique, nécessitant du matériel extrêmement coûteux et du personnel expérimenté, n'est pas utilisée en routine. Par ailleurs, la culture cellulaire, encore très pratiquée pour le diagnostic de nombreuses infections virales, n'est que très peu appliquée à celui des infections à coronavirus. En effet, la culture d'isolats cliniques reste très difficile. Finalement, la biologie moléculaire et les techniques de RT-PCR prennent alors toute leur importance lorsque la recherche de coronavirus doit être effectuée.

3.7.1.5 Pathologies digestives

Les HCoV ont également été associés à des pathologies digestives chez l'Homme, mais leur implication précise est encore très controversée. En effet, un certain nombre de coronavirus animaux sont responsables d'authentiques pathologies entériques graves, avec une mortalité importante, notamment chez les nouveau-nés (Bibliographie, 3.6, p.73).

Les HCoV ont été mis en cause dans des entérocolites nécrosantes du nourrisson dans les années 1980 (Chany C. *et al.*, 1982) puis plus récemment, dans le cas d'un enfant prématuré, avec une infection respiratoire provoquée par le HCoV NL63, et des antécédents d'entérocolite nécrosante. Cet enfant est décédé quelques jours après sa naissance et aucun lien n'a pu être établi entre la présence de la souche NL63 et l'entérocolite nécrosante.

Une étude menée au Gabon a montré la présence de particules semblables à des coronavirus ("coronavirus-like particules") dans les selles d'enfants, non hospitalisés, atteints de diarrhée ou non, dans 38,5% et 65,2% des cas, respectivement (Sitbon M., 1985). Le diagnostic morphologique en microscopie électronique reste difficile du fait qu'il s'agisse de particules pleiomorphiques.

Par ailleurs, un coronavirus a été isolé dans les selles d'un enfant de six ans présentant une diarrhée. Cet isolat clinique était proche du BCoV et du HCoV OC43 (Zhang X.M. *et al.*, 1994). Ceci pourrait s'expliquer par le franchissement de la barrière d'espèce du BCoV vers l'Homme (Vijgen L.*, et al.*, 2005).

L'ARN des HCoV peut être détectable dans les selles de patients présentant des infections respiratoires à HCoV accompagnées de signes digestifs (Vabret A. *et al.*, 2006). Dans l'étude de Woo et coll., un patient atteint par le HCoV HKU1 a présenté des symptômes diarrhéiques mais le virus n'a, à l'inverse, pas été retrouvé dans les selles. Enfin, certaines études ont mis en évidence l'existence de symptômes gastro-intestinaux, dans des proportions significatives chez des patients atteints d'infections respiratoires à HCoV (Esposito S.*, et al.*, 2006, Vabret A.*, et al.*, 2005b).

Au vu de ces différents éléments, aucune imputabilité directe des HCoV dans les pathologies digestives n'a pu être clairement établie. S'agit-il seulement d'une excrétion digestive ou de la détection d'un agent responsable des symptômes entériques? Existe-t-il des souches de HCoV à tropisme digestif isolé ? Cependant, à ce jour, ni diffusion systémique ni virémie n'ont été démontrées lors de l'infection par les HCoV hors SARS-CoV.

3.7.1.6 Pathologies neurologiques

Une autre hypothèse est que les coronavirus pourraient jouer un rôle dans des maladies démyélinisantes comme la sclérose en plaques (SEP). La SEP est une maladie nerveuse centrale caractérisée par des phénomènes de démyélinisation et par des infiltrats de cellules inflammatoires. Son étiologie exacte est inconnue et reste de toute façon multifactorielle. La survenue d'une SEP pourrait dépendre de facteurs génétiques ou environnementaux avec la participation possible de certains virus. De plus, d'autres maladies démyélinisantes ont une origine virale connue comme la panencéphalite subaigue sclérosante causée par le virus de la rougeole.

Un certain nombre d'études ont amené des arguments pour étayer cette théorie.
Le MHV, proche du HCoV OC43, est responsable d'une maladie démyélinisante, ressemblant à la SEP, chez les rongeurs, dans laquelle le système immunitaire joue un rôle important (effet protecteur des anticorps anti-MHV) (Flory E. *et al.*, 1995).
Une étude a montré la synthèse intrathécale d'anticorps anti-coronavirus (anti-HCoV 229E et anti-HCoV OC43) chez les patients atteints de SEP, alors que cette dernière n'existait pas chez les patients témoins, sans désordre neurologique (Salmi A. *et al.*, 1982).
Il a également été démontré, *in vitro*, que les HCoV OC43 et 229E sont capables d'infecter des cellules neurales de façon aiguë ou persistante, i.e. sans induire d'effet lytique sur les cellules (Arbour N. *et al.*, 1999a, Arbour N. *et al.*, 1999b, Bonavia A. *et al.*, 1997).
En outre, certaines études ont montré la présence d'ARN des coronavirus 229E et OC43, dans le cerveau de patients atteints de SEP ainsi que la présence d'antigènes de coronavirus au sein même des plaques démyélinisées. Les études menées avec des patients indemnes de SEP ont montré des résultats divergents sur la présence ou non d'ARN de coronavirus dans le cerveau de ces patients (Arbour N. *et al.*, 2000, Murray R.S. *et al.*, 1992, Stewart J.N. *et al.*, 1992).
Enfin, des recherches plus récentes ont montré qu'après inoculation intranasale de deux souches différentes de HCoV OC43, elles sont capables d'atteindre le système nerveux central et démontrent ainsi des propriétés neuroinvasives (St-Jean J.R. *et al.*, 2004).

Ce faisceau d'arguments suggère un pouvoir neurotropique, neuroinvasif voire neurovirulent des HCoV. Ainsi, si l'imputabilité des HCoV dans la SEP n'est pas encore formellement établie, la piste reste sérieuse. Cependant, d'autres hypothèses sont tout de même à garder en considération, comme une plus grande susceptibilité des patients atteints de SEP aux infections de part les dommages subis par la barrière hémato-encéphalique.

3.7.2 Le coronavirus Humain associé au syndrome respiratoire aigu sévère

L'épidémie de SRAS a marqué les esprits de par sa rapidité de propagation au niveau mondial, sa virulence et surtout l'émergence d'un nouveau virus d'origine zoonotique n'ayant encore jamais circulé chez l'Homme. Il s'agissait en effet de la première pandémie, sévère et émergente, du 21ème siècle.

3.7.2.1 L'historique…

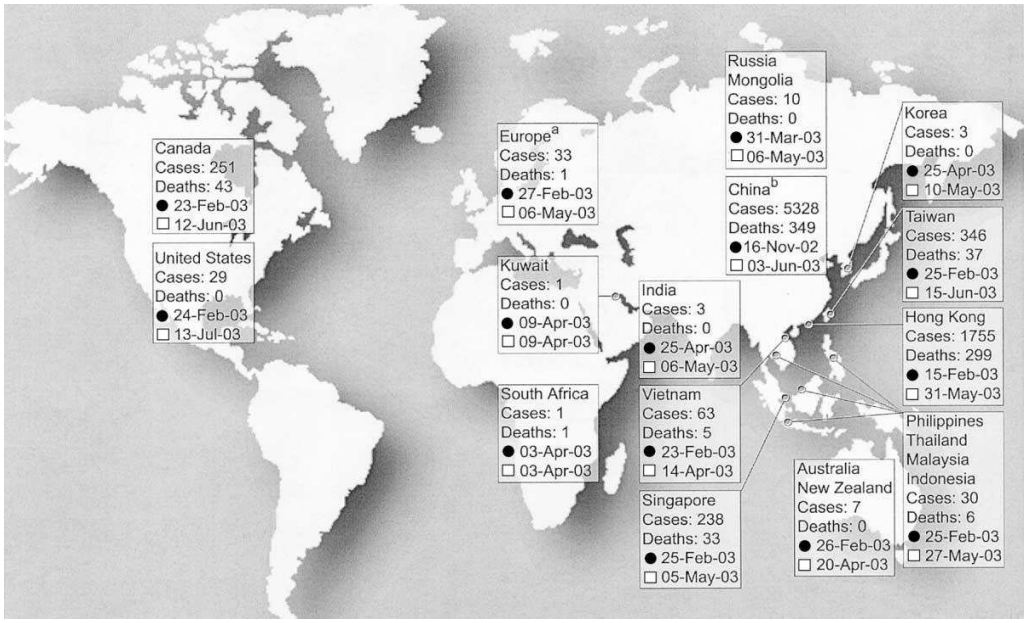


Figure 19 : Cas probables de SRAS reportés à travers le monde entre le 1er Novembre 2002 et le 31 Juillet 2003

[a] : inclus France, Allemagne, Irlande, Italie, Roumanie, Espagne, Suède, Suisse et Royaume-Uni. [b] : inclus Macao. Les ronds noirs symbolisent le début du 1er cas probable et le carré blanc, la date du début du dernier cas probable (Christian M.D. *et al.*, 2004).

Les premiers cas d'une pneumonie qualifiée d'atypique, rapidement renommée SRAS, sont survenus à la fin du mois de Novembre 2002, dans la province de Guangdong, au sud de la Chine. Une

première vague de cas groupés a été signalée en Janvier 2003 dans un hôpital de Guangzhou, capitale de cette même province (Zhao Z. *et al.*, 2003, Zhong N.S. *et al.*, 2003).

Cas présumé
1. A compter du 1er Novembre 2002, toute personne présentant les signes suivants : - **Poussée fébrile (>38°C)** ET - **Toux ou gène respiratoire** ET un ou plusieurs des éléments suivants au cours des 10 jours précédent l'apparition des symptômes : - Notion de **contact** rapproché avec un cas présumé ou probable de SRAS ; - Notion de **voyage** dans une zone affectée ; - Notion de résidence dans une zone affectée 2. A compter du 1er Novembre, 2002, en l'absence d'autopsie, toute personne atteinte d'une affection respiratoire aiguë inexpliquée ayant entraîné la mort, ET un ou plusieurs des éléments suivants au cours des 10 jours précédent l'apparition des symptômes : - Notion de contact rapproché avec un cas présumé ou probable de SRAS ; - Notion de voyage dans une zone affectée ; - Notion de résidence dans une zone affectée
Cas probable
1. Cas présumé qui présente à la radiographie thoracique des infiltrations compatibles avec une pneumonie ou un syndrome de détresse respiratoire. 2. Cas présumé qui, à l'autopsie, présente des caractéristiques compatibles avec un syndrome de détresse respiratoire sans cause identifiable.

Tableau 7 : Définition des cas présumés et des cas probables de SRAS publiée par l'OMS

Définition révisée par l'OMS le 1er avril 2003 et adaptée de (WHO, 2003b).

Cependant, aucun agent pathogène respiratoire connu n'avait alors pu être identifié. Dès Février 2003, de nouveaux cas de SRAS sont apparus dans d'autres régions, notamment à Hong-Kong (Lee N. *et al.*, 2003), au Vietnam (Vu T.H. *et al.*, 2003), à Singapour (Hsu L.Y. *et al.*, 2003) puis au Canada (Poutanen S.M. *et al.*, 2003, Varia M. *et al.*, 2003). Une analyse rétrospective de ces cas a montré une origine commune : un hôtel de Hong-Kong, où un médecin, en provenance de la province de Guangdong, a séjourné et certainement contaminé d'autres clients de l'hôtel. Ces derniers, retournés dans leur pays d'origine, infectés mais encore asymptomatiques, ont contaminé de nombreux cas secondaires (Peiris J.S. *et al.*, 2003c). Le SRAS s'est ainsi propagé dans le monde entier (Figure 19) via le transport international de personnes et de marchandises en un laps de temps très bref. L'OMS ou WHO (Organisation Mondiale de la Santé ou "World Health Organization"), ayant été saisie, a émis

une alerte mondiale le 12 Mars 2003 et a rendu publique une définition clinique des cas de SRAS (WHO, 2003b) mettant l'accent sur les notions d'historique du patient, de patient-contact et de zone épidémique (Tableau 7). Grâce au réseau mis en place par l'OMS, l'agent causal, un nouveau coronavirus, a très rapidement pu être identifié (Hsu L.Y.*, et al.*, 2003, Ksiazek T.G.*, et al.*, 2003, Peiris J.S.*, et al.*, 2003b, Poutanen S.M.*, et al.*, 2003). Suite aux différentes mesures de précaution prises au niveau mondial et préconisées par l'OMS, la chaîne de transmission de SRAS a été déclarée interrompue le 5 Juillet 2003 par l'OMS. Cette épidémie a finalement atteint 8096 personnes sur les cinq continents et fait 774 morts soit un taux de mortalité de 9,6% (WHO, 2003c). Une des caractéristiques les plus marquantes de cette épidémie a été sa propagation nosocomiale et le lourd tribut payé par le personnel soignant (Hsu L.Y.*, et al.*, 2003, Lee N.*, et al.*, 2003, Varia M.*, et al.*, 2003, Zhao Z.*, et al.*, 2003).

Variable	China	Hong Kong	Canada	Singapore	All Four Countries
Demographics					
No. of cases reported	190	388	154	20	752
Age of patients — yr	Range, 16–84	Mean, 42.9	Median, 45	Median, 28	NA
Sex					
Male — no.	70	174	94	5	343
Female — no.	120	214	60	15	409
Ratio of male to female	0.58:1	0.8:1	1.57:1	0.33:1	0.84:1
Clinical features — no./total no. (%)					
Fever	190/190 (100.0)	388/388 (100.0)	153/154 (99.4)	20/20 (100.0)	751/752 (99.9)
Chill or rigors	89/190 (46.8)	245/378 (64.8)	40/144 (27.8)	3/20 (15.0)	377/732 (51.5)
Myalgia	114/190 (60.0)	169/388 (43.6)	73/154 (47.4)	9/20 (45.0)	365/752 (48.5)
Malaise	179/190 (94.2)	72/175 (41.1)	57/154 (37.0)	9/20 (45.0)	317/539 (58.8)
Rhinorrhoea	NM	44/198 (22.2)	3/144 (2.1)	3/20 (15.0)	50/362 (13.8)
Sore throat	NM	65/378 (17.2)	21/154 (13.6)	5/20 (25.0)	91/552 (16.5)
Cough	175/190 (92.1)	162/338 (47.9)	108/154 (70.1)	15/20 (75.0)	460/702 (65.5)
Dyspnea	175/190 (92.1)	31/250 (12.4)	68/154 (44.2)	8/20 (40.0)	282/614 (45.9)
Chest pain or pleurisy	41/190 (21.6)	3/10 (30.0)	3/10 (30.0)	NM	47/210 (22.4)
Anorexia	NM	37/188 (19.7)	NM	NM	37/188 (19.7)
Nausea or vomiting	NM	NM	1/10 (10.0)	7/20 (35.0)	8/30 (26.7)
Diarrhea	46/190 (24.2)	45/303 (14.9)	39/154 (25.3)	NM	130/647 (20.1)
Headache	116/190 (61.1)	118/388 (30.4)	54/154 (35.1)	4/20 (20.0)	292/752 (38.8)
Dizziness	89/190 (46.8)	68/263 (25.9)	6/144 (4.2)	NM	163/597 (27.3)
Physical signs — no./total no. (%)					
Tachycardia	NM	NM	71/154 (46.1)	NM	71/154 (46.1)
Tachypnea	NM	NM	60/154 (39.0)	NM	60/154 (39.0)
Chest rales	NM	19/50 (38.0)	37/154 (24.0)	NM	56/204 (27.5)

Tableau 8 : Symptômes retrouvés chez les patients atteints de SRAS

(Peiris J.S.*, et al.*, 2003c)
NA : non applicable
NM : non mentionné

Des patients de tout âge ont été atteints par le SRAS, en montrant toutefois des signes de gravité différents selon les tranches d'âge. En effet, la mortalité à 65 ans était supérieure à 50%, alors que les enfants de moins de douze ans présentaient un pronostic beaucoup plus favorable que celui des autres tranches d'âge.

Les symptômes les plus fréquents étaient une fièvre >38°C, présente dans quasiment 100% des cas, associée à des myalgies, malaises et frissons. Une toux était généralement présente. D'autres symptômes pouvaient apparaître plus tardivement tels que des difficultés respiratoires, une tachypnée ou encore une pleurésie. Certains patients ont également souffert de diarrhées aqueuses, ce qui a fait suspecter un double tropisme du SARS-CoV. Les radiographies pulmonaires étaient anormales dans 60 à 100% des cas avec des lésions multiples montrant des images en verre dépoli (Tableau 8). Au niveau biologique, une lymphocytopénie et une thrombocytopénie étaient assez fréquentes. Pour un tiers des patients, la guérison est survenue avec diminution de la fièvre et résolution des images radiologiques. Cependant, le suivi de ces patients a montré des lésions pulmonaires persistantes et des difficultés respiratoires résiduelles chez 6 à 20% d'entre eux. Pour deux tiers des patients, la fièvre a persisté, les difficultés respiratoires se sont accrues entraînant une désaturation en oxygène. Des lésions diffuses sont parfois apparues au niveau des alvéoles pulmonaires allant jusqu'à la fibrose kystique. Parmi les patients ayant contracté ce virus, 20 à 30% ont été hospitalisés et admis en unité de soins intensifs, avec, pour la plupart, la nécessité d'une assistance respiratoire. Les patients avec une suspicion de SRAS admis à l'hôpital étaient tout d'abord traités par une antibiothérapie à large spectre pour exclure de façon empirique les autres causes possibles de pneumonies, à laquelle était associés ou non des corticoïdes et/ou de la ribavirine et/ou du tamiflu. La mortalité était due à une défaillance respiratoire sévère voire à une défaillance multiviscérale (Lee N*., et al.*, 2003, Peiris J.S*., et al.*, 2003c, Zhao Z*., et al.*, 2003).

3.7.2.2 Identification du SARS-CoV

Les recherches concernant les causes de cette pneumonie atypique sont restées pendant un temps infructueuses. De plus, le diagnostic clinique du SRAS était difficile car il n'existait pas de différence significative avec d'autres pneumonies atypiques induites par d'autres agents pathogènes (mycoplasmes, chlamydiae, légionelles, rickettsies, virus). De ce fait, une identification de l'agent causal rapide était primordiale pour une meilleure prise en charge des patients et la mise en place de mesures de protection efficaces. En quatre mois seulement et grâce à la collaboration des différents acteurs du réseau mis en place par l'OMS (onze laboratoires à travers le monde), l'agent responsable de ce syndrome a été identifié comme étant un nouveau coronavirus (Drosten C*., et al.*, 2003,

Ksiazek T.G*., et al.*, 2003, Peiris J.S*., et al.*, 2003b, WHO multicentre collaborative network for Severe Acute Respiratory Syndrome diagnosis, 2003). L'imputabilité de ce nouveau coronavirus a rapidement été démontrée en réponse aux postulats de Koch adaptés aux virus (Fouchier R.A. *et al.*, 2003, Kuiken T. *et al.*, 2003, Rivers T.M., 1937). Le virus a été isolé à partir de sécrétions respiratoires et de biopsies pulmonaires mais aussi à partir de matières fécales et d'urines (Chan K.H. *et al.*, 2004), ce qui montrait que le virus ne se cantonnait pas à la sphère respiratoire. Son identification a été basée sur des données de biologie moléculaire (RT-PCR sur la partie conservée du gène *Rep* des coronavirus, analyses phylogénétiques), par isolement sur culture cellulaire et observation en microscopie électronique. Les données épidémiologiques ont de plus montré que ce virus n'avait jamais circulé chez l'Homme auparavant (Chan K.H*., et al.*, 2004, Guan Y. *et al.*, 2003, Ksiazek T.G*., et al.*, 2003, Peiris J.S*., et al.*, 2003b). La séroconversion observée chez les patients atteints a ainsi permis de confirmer le diagnostic (Peiris J.S. *et al.*, 2003a).

3.7.2.3 Mesures mises en œuvre pour endiguer cette épidémie

Malgré les épisodes de "super-propagation" ("super-spread events") qui ont initié l'épidémie, il s'est avéré que la contagiosité du SRAS était finalement modérée et que sa transmission pouvait être maîtrisée par l'application de mesures sanitaires basiques (Lipsitch M. *et al.*, 2003, Riley S. *et al.*, 2003). Ces différentes mesures étaient : (i) l'identification, le tri et l'isolement des patients suspects pour limiter la transmission nosocomiale, (ii) l'information du public, (iii) la mise en quarantaine des sujets contacts, et (iv) bien évidemment, les mesures de précautions universelles, i.e. port de gants, masque, lavage hygiénique des mains, désinfection et stérilisation du matériel et des surfaces, qui se devaient d'être d'autant plus respectées que le SARS-CoV présente une certaine résistance dans l'environnement extérieur (Bibliographie, 3.8, p.91) (Zhao Z*., et al.*, 2003). De plus, l'OMS a émis des recommandations à l'attention des voyageurs ainsi que des personnes chargées d'organiser ces voyages (compagnies aériennes, aéroports, autorités sanitaires). Ces recommandations, visant à limiter la propagation internationale, relevaient du dépistage des personnes présentes dans les zones touchées (Hong-Kong, province chinoise de Guangdong) et désirant partir à l'étranger, de la prise en charge de cas possibles chez des voyageurs en transit, ou encore de la désinfection des appareils de transports, et ce quel que soit le moyen de transport (aérien, maritime, ferroviaire ou route) (WHO, 2003d).

3.7.2.4 Recherche du réservoir du SARS-CoV

Afin de pouvoir contrôler cette épidémie et de prévenir d'éventuelles résurgences de ce virus, il est extrêmement important de connaître son réservoir et son mode de transmission à l'Homme. Ainsi, les premiers cas de SRAS répertoriés en Novembre 2002 étant des personnes travaillant dans des marchés d'animaux vivants ainsi que chez un cuisinier, préparant ces mêmes animaux (Zhong N.S*., et al.*, 2003), les premières études se sont dirigées vers une origine zoonotique du SARS-CoV.

Guan et coll. ont isolé des SARS-like coronavirus (SARS-like CoV) chez certains animaux prélevés sur ces marchés, i.e. la civette masquée (*Paguma larvata*) et chez le chien viverrin (*Nyctereutes procyonoides*). Ces virus présentaient 99,8% d'homologie de séquence (sur le génome complet) avec les souches de SARS-CoV isolées chez l'Homme. Cette découverte a entraîné l'abattage massif d'animaux destinés à être vendus sur les marchés (Watts J., 2004). Cependant, des études ultérieures n'ont pas détecté de SARS-like CoV et/ou d'anticorps anti-SARS-like CoV chez ces mêmes animaux, civette palmée et chien viverrin. Cependant, il s'agissait d'individus sauvages et/ou prélevés au sein de fermes dans des provinces chinoises différentes, et non en provenance des marchés. Les auteurs supposent alors que ces animaux ont servi d'hôte d'amplification et ont permis le contact avec l'Homme mais ne seraient *a priori* pas les réservoirs du virus (Guan Y*., et al.*, 2003). La transmission à ces animaux et à l'Homme est probablement liée à la présence d'animaux exotiques, à la surpopulation animalière et au mélange des espèces régnant au sein de ces marchés (Kan B. *et al.*, 2005, Tu C. *et al.*, 2004).

Des études ont alors été entreprises chez les animaux sauvages, mais à plus large échelle et sur de nombreuses espèces animales, menant à l'identification de nombreux nouveaux coronavirus (Bibliographie, 3.1, p.56 et 3.6, p.73) dont un SARS-like CoV chez une chauve-souris du genre *Rhinolophe*. Ce virus présentait 96 à 100% d'identité de séquence avec le SARS-CoV pour les protéines E, M et N ainsi que pour la polymérase et 64% au niveau de la protéine S. De plus, ce virus partageait, avec le SARS-CoV, les ORFs spécifiques du SARS-CoV et que l'on n'a retrouvé chez aucun autre coronavirus. Enfin, les chauves-souris du genre *Rhinolophe*, et seulement celles-ci, présentaient une forte séroprévalence d'anticorps anti-SARS-CoV. Ces différents éléments suggéraient alors de façon très probable que cette chauve-souris serait le réel réservoir du SARS-CoV (Li W*., et al.*, 2005).

Ainsi, cette épidémie, de part ses caractères exceptionnels, a amené un regard nouveau sur la famille des *Coronaviridae*.

3.8 Potentialité de survie des coronavirus

Les virus enveloppés, et notamment les coronavirus, sont généralement considérés comme fragiles dans le milieu extérieur par rapport aux virus nus. Cependant, cette notion est à relativiser, et différentes études ont pu montrer la relative résistance de cette famille de virus selon les conditions environnementales.

3.8.1 Température et humidité relative

Ijaz et coll. ont réalisé une étude comparant les taux de survie du HCoV 229E et du poliovirus de type 1 dans différentes conditions d'humidité et de température (Tableau 9).

	HCoV 229E						Poliovirus type 1, souche Sabin			
Humidité relative	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

Tableau 9 : Comparaison des taux de survie du HCoV 229E et du poliovirus dans différentes conditions d'humidité et de température

NR : Non réalisé (Ijaz M.K. *et al.*, 1985).

Ainsi, les taux de survie du HCoV 229E à 30%, 50% et 80% d'humidité relative, placé dans une enceinte thermostatée à 20°C pendant 15 min était de 87%, 91% et 55% respectivement. Après 24 h passées dans les mêmes conditions, les taux de survie sont passés à 65%, 75% et 3%. Lorsque le taux d'humidité relative était augmenté, le taux de survie diminuait drastiquement.
Le HCoV 229E montrait donc une capacité de survie importante à 20°C et surtout dans des conditions d'humidité relative moyenne (50%).

Cependant, la même expérience menée dans une enceinte thermostatée à 6°C a montré au contraire un taux de survie plus important à fort taux d'humidité relative (80%), puisqu'à 24 h le taux de survie était de 86%.

Ces données pourraient expliquer la présence des épidémies hivernales ainsi que la transmission aérienne de ce virus.

De façon assez surprenante, lorsqu'Ijaz et coll. ont répété cette expérience sur le poliovirus, le taux de survie de ce dernier était nul à 30% et à 50% d'humidité relative après 15 min dans une enceinte thermostatée à 20°C mais à 90% d'humidité relative, le taux de survie est passé à 90% (Ijaz M.K.*, et al.*, 1985). Cependant, une étude similaire a montré que les taux de survie du rotavirus simien, souche SA-11, également un virus nu, sont de 55%, 80% et 35% pendant 15 min à 20°C et à 25%, 50% et 80% d'humidité relative, respectivement, montrant une meilleure survie à une humidité relative moyenne (Sattar S.A. *et al.*, 1984).
D'autres études menées sur le SARS-CoV, ont permis la mise en évidence de sa sensibilité à la température. Par exemple, le traitement par la chaleur à 56°C pendant 30 min permet de ramener le titre du SARS-CoV à un niveau indétectable, sauf en présence de protéines montrant un effet protecteur, i.e. réduction de 2 $\log_{10}$ en présence de 20% de SVF (sérum de veau fœtal) au lieu de plus de 5 $\log_{10}$ en l'absence de ce dernier. De la même façon, une exposition pendant 90, 60 ou 30 min à 56°C, 67°C et 75°C, respectivement, provoque la perte de son pouvoir infectieux. Par ailleurs, l'infectiosité du SARS-CoV est conservée à 4°C. Enfin, des irradiations UV pendant 60 min entraîne également la perte du pouvoir infectieux du SARS-CoV (Duan S.M. *et al.*, 2003, Rabenau H.F.*, et al.*, 2005a).

Ces éléments soulignent les différences de sensibilité existant entre les virus qu'ils soient enveloppés ou nus, selon les conditions dans lesquelles ils se trouvent, notamment la température et l'humidité relative.

3.8.2 Suspension vs dessiccation

En suspension, les coronavirus affichent aussi une résistance notable. Des essais ont été menés sur le HCoV 229E et sur le HCoV OC43 pour tester leur survie dans différentes suspensions à 37°C. Le milieu le plus favorable était le PBS ("phosphate buffered saline" ou solution tamponnée au phosphate), quelle que que soit la souche virale. En effet à trois jours, le taux de survie était de 80% et de 100% pour le HCoV 229E et le HCoV OC43, respectivement, et à six jours de 30% et 55%, respectivement. Cependant, la survie de ces deux virus était beaucoup plus faible lorsqu'ils étaient placés dans du milieu de culture. Effectivement, les taux de survie n'étaient plus que de 50% et 30% à trois jours et de 0% et 10% à dix jours, pour le HCoV 229E et le HCoV OC43, respectivement.

Cette même étude a montré que la dessiccation avait un effet plus délétère sur les coronavirus. En effet, le pouvoir infectieux résiduel du HCoV 229E tombait à 30% après 3 h de séchage dans des conditions environnementales standards (21°C et entre 55 et 70% d'humidité relative). Ce résultat a été obtenu pour différents types de supports inertes, retrouvés notamment au sein du secteur hospitalier, tels que l'aluminium, des éponges stériles ou encore des gants chirurgicaux en latex. Le pouvoir infectieux du HCoV OC43 était quant à lui devenu nul (Sizun J. *et al.*, 2000).

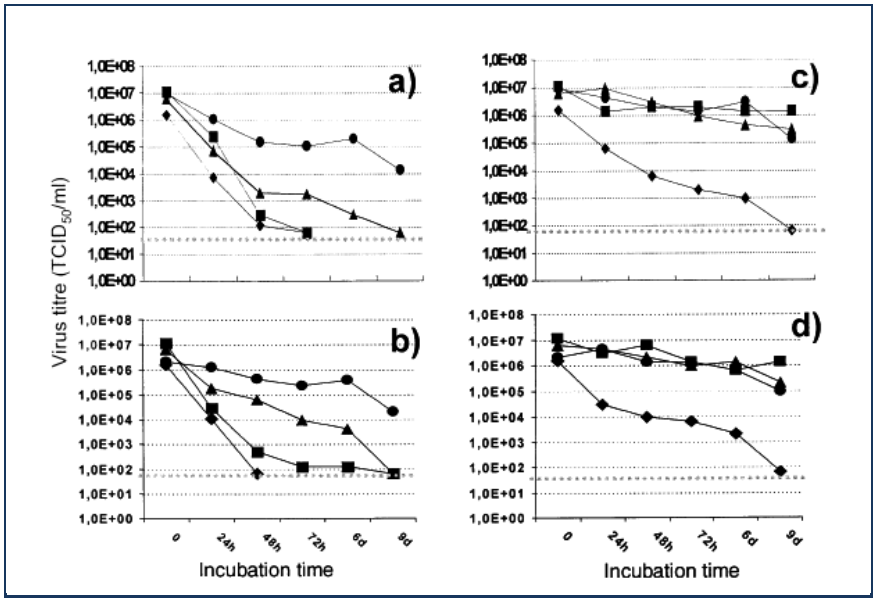


Figure 20 : Etude de la stabilité du SARS-CoV, du HCoV 229E, du HSV-1 et de l'adénovirus de type 3

En a) et en b), les suspensions virales sont séchées sur une surface en plastique. En c) et en d) les virus sont placés en suspension. En b) et d), sont ajoutés à la suspension virale 10% de SVF. Les courbes de stabilité sont représentées par : ♦HCoV 229E, ▲SARS-CoV, ■ HSV-1, ● adénovirus de type 3. La ligne en pointillé indique la limite de détection (Rabenau H.F.*, et al.*, 2005a).

L'épidémie de SRAS a donné lieu à des investigations sur la stabilité et la résistance du SARS-CoV. Il s'est avéré que ce dernier semble le plus résistant des coronavirus Humains. Rabenau et coll. ont réalisé une étude comparative sur la stabilité du SARS-CoV et d'autres virus pathogènes, i.e. le HCoV 229E, le HSV-1 et l'adénovirus de type 3 (Figure 20). En suspension dans du milieu de culture, le HCoV 229E a perdu progressivement son pouvoir infectieux en neuf jours, en présence ou en l'absence de protéines (10% de SVF), ce qui corroborait les résultats de l'étude précédemment citée. Les trois autres virus, SARS-CoV inclus, ont conservé un pouvoir infectieux stable pendant neuf jours, temps consacré à l'expérience, en présence ou non de protéines. Après séchage sur une surface en plastique, les quatre virus testés ont perdu graduellement leur pouvoir infectieux. Le HCoV 229E et le HSV-1 étaient les virus les plus sensibles et ont perdu leur pouvoir infectieux en 72 h, en présence ou

en absence de SVF. Le SARS-CoV a conservé quant à lui son infectiosité pendant six jours, avec un effet protecteur de la présence de protéines. A neuf jours seulement, il avait perdu la totalité de son pouvoir infectieux. L'adénovirus de type 3, virus nu, s'est montré comme le virus le plus stable et a conservé son pouvoir infectieux pendant les neuf jours de l'expérience (Rabenau H.F*., et al.*, 2005a). D'autres études ont confirmé ces résultats en prouvant la survie du SARS-CoV sur différents matériaux ou dilué dans de l'eau, ne révélant une diminution de son pouvoir infectieux qu'après 72 h à 96 h. Cependant, ce dernier est rapidement perdu lorsque le SARS-CoV est déposé sur des surfaces poreuses telles que du coton ou du papier, bien que ceci dépendît de la quantité initiale d'inoculum (Duan S.M*., et al.*, 2003, Lai M.Y*., et al.*, 2005).

Ceci étaye l'idée que les virus nus sont plus stables que les virus enveloppés, tout en mettant l'accent sur le fait que ces derniers font preuve d'une certaine stabilité.

3.8.3 pH

Les coronavirus sont également très sensibles aux variations de pH et présentent une meilleure stabilité et une production plus importante de virions aux environs de pH légèrement acides, vers 6 – 6,5, qu'à des pH plus alcalins aux alentours de 8. Cela a été démontré pour le HCoV 229E (Lamarre A. et Talbot P.J., 1989), le MHV-A59 (Sturman L.S. *et al.*, 1990), le TGEV (Pocock D.H. et Garwes D.J., 1975) et le CCoV (Pratelli A., 2008). Cette différence de stabilité en fonction du pH semble être liée à des changements conformationnels de la protéine S, mis en évidence sur le MHV-A59 par méthodes biochimiques et par microscopie électronique à pH 8 et à 37°C. Ces changements impliquent une perte de pouvoir infectieux et l'agrégation des virions. Il se produit dans ces conditions une scission de la région S1 de la protéine S et la région S2 résiduelle provoquerait l'agrégation des virions. Ces évènements semblent liés à des réarrangements des ponts disulfure (Sturman L.S*., et al.*, 1990).

3.8.4 Fluides biologiques

Lors de l'épidémie de SRAS, le virus avait été retrouvé dans diverses sécrétions et notamment dans les selles sans que l'on puisse réellement les impliquer dans la transmission de la maladie. Duan et coll. ont montré que le SARS-CoV peut survivre pendant au moins 96 h lorsqu'il est mis en suspension dans du sérum, des crachats ou des selles, tandis qu'il peut rester vivant, mais avec un faible niveau d'infectiosité, pendant 72 h, dans les urines (Duan S.M*., et al.*, 2003). Il a également été noté que la

stabilité du SARS-CoV dépendait du type de selles, dont le pH peut varier, dans lesquelles il était mis en suspension. En effet, Le SARS-CoV ne survit pas au-delà de 24 h dans les selles normales d'un adulte et au-delà de 3 h dans les selles d'un nourrisson, légèrement plus acides. Cependant, le virus peut survivre jusqu'à quatre jours dans des selles diarrhéiques dont le pH s'approche de 9. Ces résultats sont d'ailleurs assez surprenants par rapport aux observations précédemment réalisées pour les autres coronavirus qui montraient une plus grande stabilité aux pH légèrement acides. Cette même étude révèle que le SARS-CoV peut rester vivant jusqu'à quatre à cinq jours dans des échantillons respiratoires (Lai M.Y*., et al.*, 2005, WHO, 2003a).

3.8.5 Transfert à partir de surfaces contaminées

Ainsi, cette capacité de survie dans des conditions variables implique alors leur possible transmission via les surfaces et/ou les mains. Il a été d'ailleurs montré le transfert de virus à partir de patients contaminés (mains, muqueuse nasale) vers des surfaces inertes et inversement, le transfert de virus à partir de surfaces contaminées vers des hôtes sains, susceptibles alors d'être eux-mêmes infectés.

Une étude a par exemple montré que des patients atteints d'un rhume à rhinovirus contaminent les surfaces lors d'une activité quotidienne normale. Pour explorer la possibilité et la fréquence de ce transfert, Winther et coll. ont placé quinze volontaires sains porteurs d'un rhume à rhinovirus dans un hôtel en leur demandant d'exercer leurs activités quotidiennes. Dix objets touchés régulièrement au cours d'une journée tels que les interrupteurs ou les touches de téléphone, ont été examinés après 24 h passées dans la chambre d'hôtel. Il s'est alors avéré que 35% des objets testés avaient été contaminés par du rhinovirus. De plus, cette étude a également étudié le transfert inverse, c'est-à-dire des surfaces vers les doigts. Pour cela, quelques mois après la première partie de l'étude, lorsque les volontaires n'étaient plus porteurs du rhinovirus, Winther et coll. ont contaminé de façon volontaire les différents endroits touchés couramment. La contamination a été faite avec les sécrétions des volontaires prélevées lorsqu'ils étaient porteurs du rhinovirus. Il a alors été montré que le transfert du rhinovirus des surfaces contaminées vers les doigts des volontaires s'était produit dans 47% des cas (Sattar S.A*., et al.*, 1993, Winther B*., et al.*, 2007). D'autres études impliquant des virus enveloppés ont montré la possibilité de ce genre de transfert comme par exemple dans le cas du PIV-3 même si le taux de transfert était moins important que dans le cas d'un virus nu comme le rhinovirus (Ansari S.A. *et al.*, 1991a).

Quoique ce transfert ne soit pas directement démontré dans le cas des coronavirus, leur potentielle résistance environnementale rend leur transmission par le biais des surfaces inertes et/ou par les

mains non négligeable, particulièrement dans le cas des ILS. Il faut ainsi considérer comme source potentielle de contamination ces surfaces et des moyens de désinfection adaptés doivent être utilisés pour limiter les risques de contamination par ce biais.

3.9 Sensibilité des coronavirus aux ATS-D

Bien que, comme nous venons de le souligner, la connaissance des sensibilités virales aux ATS-D chimiques soit fondamentale pour une utilisation rationnelle, les études relevant de ce domaine sont encore assez sporadiques, plus particulièrement celles concernant les coronavirus. Il existe néanmoins quelques informations disponibles dans la littérature, qui se sont d'ailleurs enrichies après l'épidémie de SRAS.

Sattar et coll. ont réalisé une étude portant sur l'efficacité de quinze ATS-D chimiques de familles différentes sur quatre virus, deux virus nus et deux virus enveloppés dont le HCoV 229E, les autres virus étant un coxsackievirus de type B, un adénovirus de type 5 et un PIV-3. Les tests réalisés étaient des tests sur support utilisant des disques en acier inoxydable, le critère d'efficacité était une diminution de 3 $\log_{10}$ (critères Américains) et le temps de contact était de 1 min. Les résultats concernant le HCoV 229E sont réunis dans le Tableau 10. Le HCoV 229E s'est ainsi montré sensible globalement à toutes les familles d'ATS-D chimiques. Néanmoins, certains produits se sont avérés inactifs, ou tout du moins à certaines concentrations, comme l'hypochlorite de sodium à 0,1%, la chloramine T à 0,01%, certains ammoniums quaternaires et certains composés phénoliques. La CHX en solution aqueuse à 0,008% associée à du cétrimide à 0,08% s'est également révélée inactive sur le HCoV 229E. Cependant, la CHX à 0,05% associée avec du cétrimide à 0,5% en solution alcoolique (éthanol à 70%) permet une réduction supérieure à 3 $\log_{10}$ du titre viral (Sattar S.A*., et al.*, 1989).

Une étude plus récente a été menée par Sizun et coll. sur les HCoV 229E et OC43. Les essais menés étaient, cette fois, des tests en suspension avec des temps de contact de 5 min. L'activité des ATS-D testés a été neutralisée par dilution dans du milieu de culture. Sur les différents ATS-D testés, seule l'activité de la PVP-I a pu être évaluée. En effet, les autres produits, i.e. éthanol à 70%, une solution nettoyante pour les mains Synergel® dont la composition n'était pas identifiée et de l'eau de javel à 5% de chlore actif, étaient trop toxiques pour les cellules pour pouvoir évaluer une activité antivirale. La PVP-I (0,75% d'iode libre) a, quant à elle, permis la réduction du pouvoir infectieux des deux souches de 50%. Cependant, la réduction de 50% du titre viral du HCoV 229E a requis une concentration dix fois plus élevée que pour celle du HCoV OC43 (Sizun J*., et al.*, 2000).

ATS-D Testés	Concentration (%) et (pH approximatif) à la concentration utilisée	Réduction du titre viral du HCoV 229E ≥ 3 $\log_{10}$ en 1 min
Dérivés halogénés		
Hypochlorite de sodium	0,01 (8,0)	**Non**
	0,10 (9,4)	Oui
	0,50 (11,0)	Oui
Chloramine T	0,01 (7,0)	**Non**
	0,10 (8,0)	Oui
	0,30 (8,0)	Oui
Hypochlorite de sodium et bromure de potassium	0,01 (10,0)	**Non**
	0,05 (11,5)	Oui
	0,10 (12,0)	Oui
PVP-I	10,0 (3,0) (1% iode disponible)	Oui
Ethanol	70,0 (4,0)	Oui
Glutaraldéhyde	2,0 (7,0)	Oui
Ammoniums quaternaires		
Chlorure de *n*-alkyl-diméthylbenzyl	0,04 (6,0)	**Non**
Chlorure de *n*-alkyl-diméthylbenzyl + HCl	0,04 (1,0) 7,00	Oui
Chlorure de *n*-alkyl-diméthylbenzyl + éthanol	0,04 (5,0) 70,0	Oui
Chlorure de *n*-alkyl-diméthylbenzyl + métasilicate de sodium	0,04 (11,0) 0,5	Oui
Gluconate de chlorhexidine + cétrimide	0,008 (5,0) 0,08	**Non**
Gluconate de chlorhexidine + cétrimide + éthanol	0,05 (4,5) 0,50 70,0	Oui
Composés phénoliques		
o-phénylphénol + *o*-benzyl-chlorophénol + *p*-tert-amylphénol	0,02 (9,0) 0,03 0,01	**Non**
o-phénylphénol + *o*-benzyl-chlorophénol + *p*-tert-amylphénol + SDS	0,02 (9,0) 0,03 0,01 0,60	Oui
o-phénylphénol + *o*-benzyl-chlorophénol + *p*-tert-amylphénol + éthanol	0,02 (9,0) 0,03 0,01 70,0	Oui
o-benzyl-*p*-chlorophénate de sodium +SDS	0,50 (13,0) 0,60	Oui

Tableau 10 : Sensibilité du HCoV 229E à différentes formulations d'ATS-D chimiques

(Sattar S.A., *et al.*, 1989)
SDS : sodium dodecyl sulfate (détergent)

Enfin, diverses études ont été menées sur le SARS-CoV afin de limiter la propagation de l'épidémie particulièrement au niveau hospitalier. Ces études se sont tout naturellement tournées vers les produits utilisés dans la désinfection des mains et des instruments. Rabenau et coll. ont montré que la plupart des solutions à base d'alcools, de type isopropanol ou éthanol, permettaient une réduction supérieure à 3 $\log_{10}$ des titres viraux, en faisant appel à des tests en suspension. Cependant, les conditions des expériences n'ont pas permis de démontrer une réduction supérieure à 4 $\log_{10}$, notamment à cause de la dilution utilisée pour la neutralisation, à l'exception d'une solution d'éthanol à 78% où la réduction du titre viral était supérieure à 5 $\log_{10}$. De la même façon, les désinfectants de surface à base d'aldéhydes, formaldéhyde (1% v/v) et glutaraldéhyde (0,5% v/v), se sont avérés efficaces, induisant des réductions supérieures à 3 $\log_{10}$ et à 4 $\log_{10}$, respectivement, après des temps de contact de 2 min. Des désinfectants à base d'ammoniums quaternaires ont également induit des réductions supérieures à 3 $\log_{10}$ mais après des temps de contact de 30 min au minimum (Rabenau H.F*., et al.*, 2005a, Rabenau H.F. *et al.*, 2005b). La PVP-I s'est aussi montrée efficace après des temps de contact de 2 min (Kariwa H*., et al.*, 2006). Ainsi, malgré une relative résistance du SARS-CoV, il est relativement facilement inactivé par les ATS-D couramment utilisés.

PRINCIPES ET BUTS DE L'ETUDE

Objectif premier : Développement d'une stratégie d'évaluation de l'activité ATS antivirale fiable et standardisable

Un des objectifs de notre équipe de recherche, le GEVSM, s'inscrit dans le développement de stratégies anti-infectieuses. Ce projet s'est ainsi proposé d'investiguer, de façon plus approfondie, un axe de cette thématique : l'antisepsie et plus particulièrement l'antisepsie antivirale.

Ce domaine est particulièrement important dans un but évident de prévention. Cette nécessité résulte de plusieurs facteurs : l'importance croissante des ILS virales, l'émergence inévitable de nouveaux virus ainsi que le manque encore persistant de traitements antiviraux spécifiques.

La grande variété des ATS-D disponibles offre de multiples moyens pour combattre la propagation de ces infections. Cependant, il est impératif de pouvoir les choisir en fonction des besoins réels d'utilisation, i.e. nature et quantité des souches présentes, utilisation sur de la peau saine ou lésée ou encore sur des surfaces inertes, conditions environnementales, besoins spécifiques d'un secteur comme le secteur hospitalier, etc. Ainsi, ce choix sera guidé par les qualifications annoncées des différents produits disponibles. Pour cela, il est nécessaire de développer des stratégies adéquates et standardisables pour évaluer leur activité dans des conditions les plus proches des conditions d'utilisation.

Une seule norme Européenne, la norme NF EN 14476+A1, est disponible à ce jour pour définir le cadre de l'évaluation de l'activité ATS antivirale en médecine Humaine. Elle présente encore certaines insuffisances, notamment au niveau des méthodes de neutralisation de l'activité ATS et de la cytotoxicité des composés testés. Cette étape est pourtant fondamentale pour garantir le temps de contact et ne pas effectuer de mésestimation de l'activité du produit testé.

L'objectif de ce projet était alors de proposer une méthodologie améliorant notamment cette étape de neutralisation et qui soit par ailleurs reproductible, standardisable et suffisamment simple, pour être accessible au plus grand nombre. Une méthode par filtration sur gel a été développée mettant en œuvre des colonnes de gel de Séphadex™ G-25 et G-10 de notre conception. Ces gels ont été sélectionnés pour leur capacité de rétention, de 100 à 5000 $g.mol^{-1}$, correspondant aux masses moléculaires de molécules variées et notamment de nombreux ATS-D. La procédure globale est décrite dans le schéma ci-contre. Elle consiste à mettre en contact la drogue, dont l'activité ATS-D antivirale doit être évaluée, avec le virus test, et ce pendant un temps de contact précis. Ce temps de contact doit être en adéquation avec l'utilisation potentielle du produit. A la fin de ce dernier, le mélange drogue/virus est filtré sur les colonnes de Séphadex™ appropriées, selon la masse moléculaire de la molécule testée. Enfin, le titrage viral est effectué sur les suspensions virales ayant

été en contact ou non avec la drogue. La comparaison de ces titres permet alors l'évaluation de l'activité ATS-D antivirale. La norme NF EN 14476+A1 impose une diminution de 4 $\log_{10}$ pour qualifier le produit testé d'ATS-D à action virucide. Des contrôles appropriés, i.e. efficacité de la neutralisation, élimination de la possible cytotoxicité et absence d'interférence de la procédure sur l'infectivité du virus, ont bien évidemment été pensés et ajoutés à ce protocole.

Pourquoi le HCoV 229E comme modèle d'étude ?

Pour mettre au point cette méthode, le HCoV 229E a été choisi comme modèle d'étude. En effet, ce virus appartient à une famille dont le potentiel évolutif et adaptatif a été clairement démontré ces dernières années et l'émergence du SARS-CoV en est la preuve flagrante. De plus, les connaissances quant à leur pathogénicité, notamment chez l'Homme, se sont largement accrues au cours de ces dernières années. Ainsi, virulence du SARS-CoV mis à part, les coronavirus Humains, jusqu'alors connus pour être responsables de pathologies bénignes telles que le rhume ont été impliqués dans des pathologies plus sérieuses. Ces infections atteignent les voies respiratoires basses, provoquant bronchites, bronchiolites ou encore pneumonies, surtout chez les personnes fragilisées. En outre, leur imputabilité dans des ILS a été établie.

Un autre élément caractéristique de cette famille a également attiré notre attention : leur faculté de survie appréciable, bien que ce soient des virus enveloppés, et ce dans différentes conditions environnementales, i.e. 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 ces virus, l'évaluation l'activité des ATS-D à leur égard se révèle 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 est apparu comme un modèle d'étude judicieux pour évaluer l'efficacité de notre méthodologie.

Des molécules de référence, la CHX et l'HXM, pour éprouver cette nouvelle méthodologie

Pour mettre en application ce protocole, nous avons choisi deux molécules considérées comme molécules de référence, la CHX et l'HXM. Elles ont été sélectionnées parmi les différents ATS-D tout d'abord pour leur large utilisation en médecine Humaine. De plus, leurs masses moléculaires respectives nous permettaient de tester les deux types de colonnes de Séphadex™ G-10 et G-25, et de vérifier la fonctionnalité de cette méthode. Par ailleurs, concernant la CHX, des études préliminaires avaient évalué son potentiel ATS-D à l'encontre du HCoV 229E et offraient ainsi un point de comparaison. L'HXM, quant à elle, n'ayant, à notre connaissance pas fait l'objet d'étude sur son potentiel ATS-D antiviral, quel que soit le virus, il paraissait intéressant de connaître son activité sur un virus communément rencontré.

Vers de nouvelles molécules à potentiel antiviral, voire ATS-D : les calixarènes

Enfin, notre équipe étant une équipe mixte, biologie/chimie, un versant de son activité est la synthèse de nouvelles molécules, notamment macrocycliques, comme les calixarènes. Ces molécules, pouvant être substituées de multiples façons, ont démontré des capacités intéressantes comme agents chélateurs et/ou solubilisants, catalyseurs biomimétiques ou encore comme outils de reconnaissance moléculaire. Un pouvoir microbicide, antibactérien et antiviral, a été mis en évidence pour certains calixarènes et notamment pour le C[4]S-BTZ. Cependant, les études concernant cette potentielle activité antivirale sont encore à approfondir.

En vue d'accroître ces connaissances, deux calixarènes ont été testés, le C[4]S et le C[4]S-BTZ. Il était en effet intéressant de comparer l'activité de ces deux molécules, l'une substituée avec des groupements bithiazolés et l'autre non, afin de pouvoir discriminer l'activité propre des groupements bithiazolés.

Une autre raison ayant guidé ce choix est la nécessité de renouveler l'arsenal des ATS-D. Ce dernier, aussi riche soit-il, présente des faiblesses notamment au niveau de la toxicité de nombreuses molécules dont l'utilisation est, pour certaines, remise en cause.

Méthodologie développée au cours de ce projet

Dans le but d'établir un protocole fiable et reproductible, différentes étapes préliminaires ont été nécessaires.

Conception des colonnes - Vérification de leur reproductibilité et de leur fonctionnalité

Après un certain nombre d'essais, un protocole unique, quel que soit le type de gel de Séphadex™ utilisé G-10 ou G-25, a été développé. La reproductibilité des colonnes ainsi conçues a été établie par des analyses statistiques. De plus, leur fonctionnalité, i.e. rétention des molécules tests et non rétention des virus, a été prouvée de façon biologique d'une part, et physico-chimique d'autre part.

Contrôle de l'élimination de la cytotoxicité des molécules testées par filtration sur les colonnes de Séphadex™

Un des buts de l'étape de neutralisation, après stopper la potentielle activité du produit, est d'en éliminer la cytotoxicité.
Avant de procéder aux tests de virucidie à visée ATS-D proprement dits, des essais préliminaires ont été réalisés. Tout d'abord, la toxicité de chaque molécule à l'encontre des cellules L-132, utilisées dans cette étude, a été évaluée et quantifiée, grâce à des tests de viabilité au MTT et des tests de cytotoxicité au RN.
Par la suite, les mêmes expériences ont été menées mais avec les filtrats de ces solutions après passage sur les colonnes de Séphadex™ appropriées à leur masse moléculaire.
La comparaison des résultats obtenus au cours de ces deux séries d'expériences a permis de s'assurer de la suppression de la cytotoxicité potentielle des molécules testées.

Quantification des taux de rétention des molécules testées par spectrophotométrie UV-visible

Dans le but de standardiser ce protocole, il fallait quantifier la rétention des molécules testées. Une méthode de dosage par spectrophotométrie UV-visible a donc été mise en œuvre.

En premier lieu, les paramètres spectrophotométriques spécifiques de chaque molécule ont été déterminés. Par la suite, et grâce aux résultats précédents, un dosage des concentrations résiduelles existant dans les filtrats a été réalisé.
Enfin, en comparant cette concentration à celle de la solution avant filtration, les taux de rétention des solutions testées, à différentes concentrations, ont été estimés.

Evaluation de l'activité ATS-D antivirale

Notre méthode ayant ainsi été validée, sous différents aspects complémentaires, les tests d'ATS-D antivirale ont pu être accomplis avec fiabilité. Les activités virucides de différentes concentrations de CHX, HXM, C[4]S et C[4]S-BTZ ont alors été évaluées sur le HCoV 229E et pour différents temps de contact. Au sein de chaque expérience, les contrôles nécessaires à la validation des résultats ont été inclus, i.e. contrôles de neutralisation et d'absence d'interférence de la procédure sur l'infectivité du virus et contrôle de cytotoxicité.
Les différences entre les titres viraux obtenus avec et sans action de la molécule testée, ont été évaluées et comparées au seuil préconisé par la norme NF EN 14476+A1 pour prétendre à une activité ATS-D antivirale, soit une réduction de 4 $\log_{10}$.

PARTIE EXPERIMENTALE : MATERIELS, METHODES ET RESULTATS

Matériels et méthodes

1 Matériels, équipements et réactifs

1.1 Matériels et équipements

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 mm², 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_2	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 cm²	83.1810	Sarstedt
Flacon de culture pour cellules adhérentes 75 cm²	83.1813	Sarstedt
Lecteur de plaques ELISA	Multiscan EX	Thermo Scientific
Micropipette Research® monocanal, volume variable 2 – 20 µL 10 – 100 µL 50 – 200 µL 100 – 1000 µL	 613.3584 613.3585 613.3586 613.3587	Eppendorf
Micropipette Research® multicanaux, 8 canaux 10 – 100 µL 30 – 300 µL	 613.3600 613.3602	Eppendorf
Microplaques de culture cellulaire 96 puits	83.1835.300	Sarstedt
Microscope inversé à contraste de phase	CKX31	Olympus

Matériels	Références	Fournisseurs
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 10 mL 25 mL	 86.1253 001 86.1254.001 86.1685 001	Sarstedt
Pointes pour micropipettes 200 µL, jaune 300 µL, transparent 1000 µL, bleu	 70.760.002 70.765 70.762	Sarstedt
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 50 mL	 188271 227261	Greiner bio-one

1.2 Réactifs

Réactifs	Références	Fournisseurs
Acétone de synthèse	154598	Sigma
Acide acétique	45726	Fluka biochemical
Bleu de Trypan (BT)	15250-061	Invitrogen
Bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$) à 7,5% (m/v)	25080-060	Invitrogen
Chlorure de calcium ($CaCl_2$)	33604.261	Prolabo
Diméthylsulfoxyde (DMSO)	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 KCl 0,2 g Na_2HPO_4, 7 H_2O 2,2 g KH_2PO_4 0,2 g	 S9625 P4504 S9390 P5379	 Aldrich
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

Les différentes molécules testées lors de cette étude (l'HXM, la CHX, le C[4]S et le C[4]S-BTZ) ont été au préalable, et pour les différents lots utilisés, préparées et caractérisées au sein de notre équipe, par le groupe Chimie sous la direction de Jean-Bernard Regnouf-de-Vains, grâce à des techniques d'analyses élémentaires afin d'avoir la masse molaire exacte de chaque lot.

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

Les cellules L-132 (ATCC CCL-5), utilisées lors de cette étude, 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 ainsi 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. L'entretien tri-hebdomadaire des cellules L-132 est réalisé dans des boîtes de culture pour cellules adhérentes de 75 cm^2 et requiert au préalable trois lavages avec du PBS afin d'éliminer au maximum le SVF qui pourrait interagir avec la trypsine et empêcher son action enzymatique, entraînant la rupture des liens intercellulaires et des liens permettant l'adhésion des cellules à la boîte de culture. A la suite de ces trois lavages, 500 µL de trypsine–EDTA sont ajoutés et répartis de façon homogène par rotation de la boîte de culture qui est ensuite incubée quelques minutes dans un incubateur thermostaté à 37°C et sous 5% de CO_2. La boîte de culture est retirée de l'incubateur et 4,5 mL de MEM ("Minimum essential medium" ou milieu de culture) à 5% de SVF sont ajoutés pour procéder à la dissociation cellulaire par pipetages successifs à l'aide d'une pipette de 5 mL. 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_2 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% DMSO]. Le DMSO est utilisé pour ses propriétés cryoprotectrices. Cependant, étant cytotoxique à température ambiante, lors de la décongélation des cellules, il est éliminé des boîtes de culture par changement du milieu dès l'adhérence des cellules. De plus, afin d'éviter une chute trop brutale de température lors de leur congélation, les

cellules sont d'abord placées dans des boîtes de congélation, contenant de l'isopropanol permettant une vitesse de refroidissement reproductible et régulière de 1°C/min, et dans un congélateur à -80°C pendant 24 h avant d'être transférées dans la bonbonne d'azote liquide.

2.2 Culture et obtention de stocks de virus de HCoV 229E

La souche de HCoV 229E (ATCC VR 740) a été généreusement donnée par le Dr. S.A. Sattar (Faculté de Médecine, Ottawa, Canada). Le HCoV 229E est cultivé sur cellules L-132, dans du MEM à 2% de SVF dans une incubateur thermostaté à 33°C sous 5% de CO_2 et atmosphère humidifiée, 33°C étant la température optimale de croissance du HCoV 229E (Bradburne A.F., 1972). 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 cm². 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 diluée au 1/5ème dans du MEM avant d'être inoculée aux cellules (1 mL de suspension virale diluée au 1/5ème pour une boîte de culture de 75 cm²). Le titre du stock d'origine doit être préférablement d'au moins 10^6 particules virales infectieuses/mL. Après répartition homogène de la suspension virale sur les tapis cellulaires, les boîtes de culture infectées sont incubées pendant 1 h à 33°C sous 5% de CO_2 pour permettre l'adsorption du virus sur les cellules. A la fin de ce temps d'incubation, 11 mL de milieu de survie ne contenant que 2% de SVF sont ajoutés dans la boîte infectée, avant qu'elle ne soit ré-incubée pour 48 h à 33°C sous 5% de CO_2. Le milieu de survie ne contient que 2% de SVF pour deux principales raisons ; d'une part, pour permettre aux cellules de subsister sans se multiplier et surtout, pour limiter les interactions qui peuvent se produire entre les protéines virales et les protéines du SVF et alors empêcher les interactions nécessaires à l'entrée du virus dans la cellule, entre protéines virales et protéines cellulaires. Après environ 48 h d'incubation et avant que l'ECP, i.e. la lyse cellulaire, ne soit achevé (Figure 21), 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 2000x*g* 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. Pour toute réalisation d'un nouveau stock de virus, une boîte de culture contrôle de cellules non infectées subit les mêmes opérations pour s'assurer de l'intégrité des cellules utilisées.

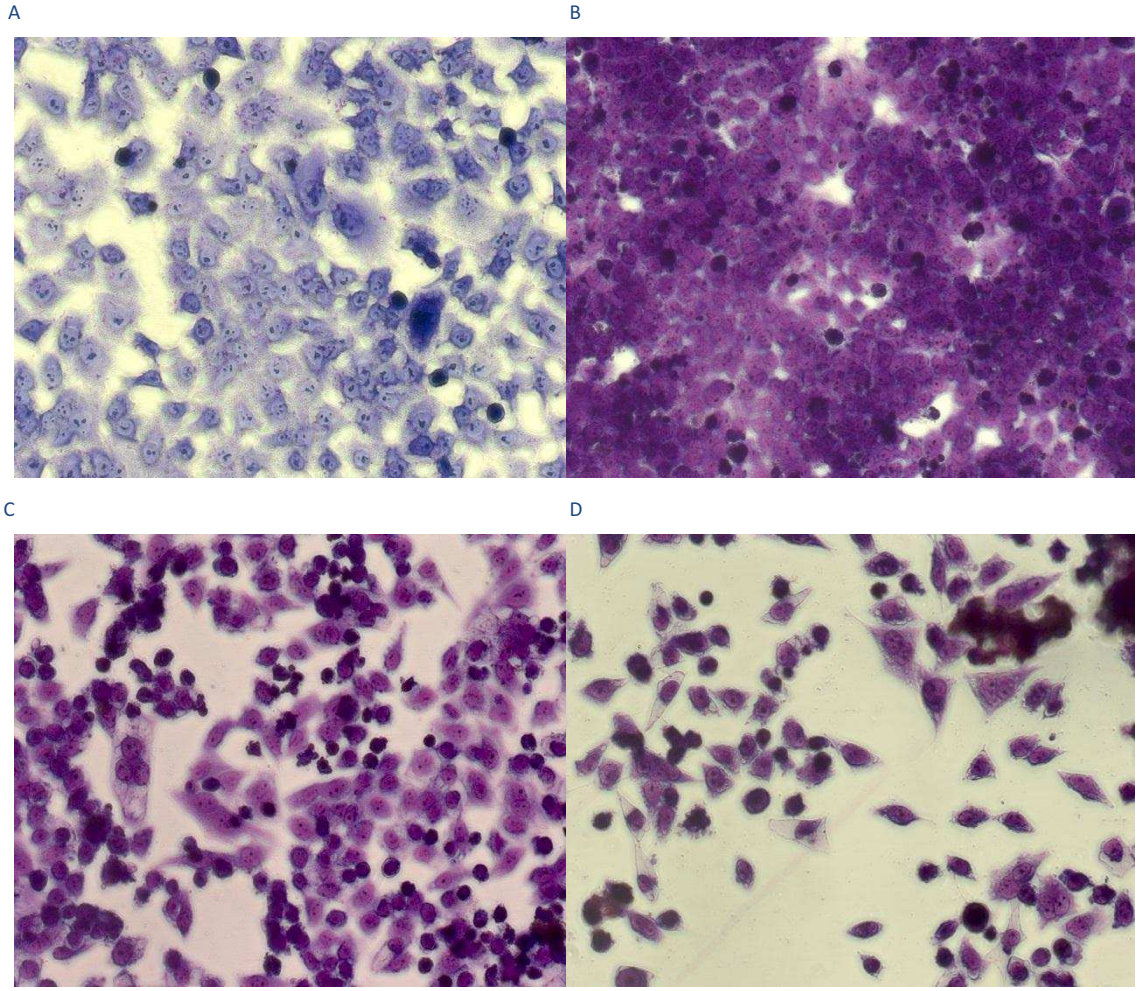


Figure 21 : Evolution de l'infection par le HCoV 229E des cellules L-132

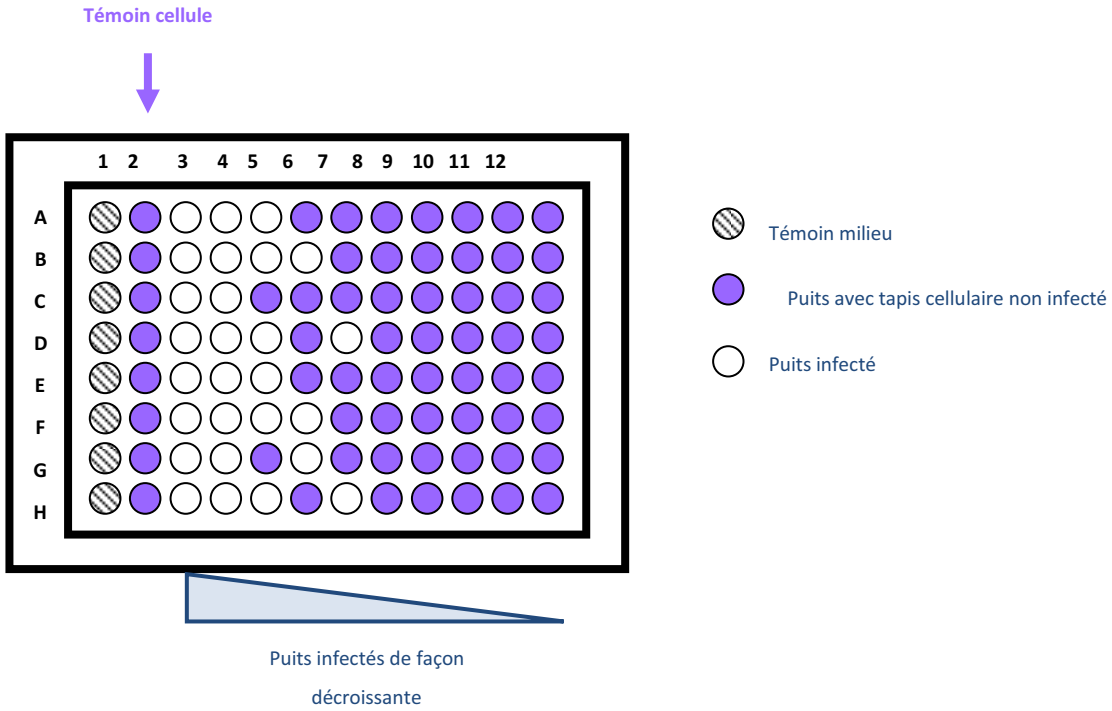
A : Cellules L-132 non infectées à 48 h après ensemencement à 90% de confluence. B : Cellules L-132 non infectées à 6 jours post-infection soit 8 jours après l'ensemencement. C : Cellules L-132 infectées par le HCoV 229E 5 jours post-infection. D : Cellules L-132 infectées par le HCoV 229E 6 jours post-infection avec une destruction nette du tapis cellulaire.

Les cellules L-132 ont été ensemencées dans des "slide-flasks" à raison de 5.10^5 cellules/"slide flask" et 3 mL de MEM à 5% de SVF puis incubées 48 h à 37°C afin d'atteindre 90% de confluence. Après élimination du milieu et rinçage par du PBS, la suspension virale de HCoV 229E a été ajoutée à une MOI de 0,1 (Multiplicity of infection = [nombre de particules infectieuses/mL] / [nombre de cellules/mL]). Après ajout de 3 mL de MEM à 2% de SVF, les "slide flasks" sont incubées à 33°C sous 5% de CO_2 pendant 5 à 6 jours. Après avoir détaché la lamelle de la "slide flask" sur laquelle les cellules ont adhéré, la lamelle est plongée pendant 5 min dans une solution de May-Grünwald puis après un rinçage à l'eau, la lamelle est plongée dans une solution de Giemsa diluée au $1/10^{ème}$ dans du PBS pendant 15 min. L'observation a été faite sous un microscope inversé, au grossissement x200, relié à un appareil photo (modèle Axiocam MRC, ZEISS AXIOSKOP, Allemagne) et l'acquisition des images a été réalisée grâce au logiciel Axiovision®, version 4.6.

2.3 Evaluation du titre viral par la méthode des dilutions limites

Le titrage du HCoV 229E est réalisé en plaques de culture cellulaire 96 puits à fond plat. Les plaques de culture sont ensemencées au préalable à raison de 10^4 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. Le BT est un colorant qualifié de "vital" qui ne peut pénétrer que dans les cellules dont la membrane est altérée et qui permet donc un dénombrement cellulaire en différenciant les cellules vivantes des cellules mortes. 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_2 pour 48 à 72 h jusqu'à atteindre 90% de confluence environ (Figure 21A).

Le titre moyen des stocks de HCoV 229E utilisés est d'environ 10^6 particules virales infectieuses/mL. Les suspensions virales, conservées à -80°C, sont d'abord décongelées à température ambiante, puis diluées au 1/10ème 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 1/10ème sont déposés dans les puits de la colonne 3 puis une dilution sériée au 1/10ème 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.



Les puits infectés sont tout d'abord comptés par observation au microscope pour ensuite calculer la somme et le pourcentage cumulé des puits infectés.

	Nombre de puits		Somme cumulée des puits		Pourcentage de puits infectés
Dilutions des suspensions inoculées	infectés	non infectés	infectés (vers le haut) = a	non infectés (vers le bas) = b	[(a/(a+b)]x100
10^{-1}	8	0	27	0	100
10^{-2}	8	0	19	0	100
10^{-3}	**6**	**2**	**11**	**2**	**84,62**
10^{-4}	**3**	**5**	**5**	**7**	**41,67**
10^{-5}	2	6	2	13	13,33
10^{-6}	0	8	0	21	0
10^{-7}	0	8	0	29	0
10^{-8}	0	8	0	37	0
10^{-9}	0	8	0	45	0
10^{-10}	0	8	0	53	0

La distance proportionnelle entre les 2 dilutions est calculée :

(84,62-50)/(84,62-41,67) = 0,81

La $CCID_{50}$ correspond donc à une dilution de $10^{-3,81}$ de l'inoculum initial soit $1/10^{-3,81}$ = $6,5.10^3$ particules virales infectieuses pour 20 µL d'inoculum initial soit $3,2.10^5$ particules virales/mL dans la suspension virale.

Figure 22 : Evaluation du titre viral par la méthode de Reed et Muench

(Reed L.J. et Muench H., 1938)

Les plaques ainsi infectées sont incubées à 33°C sous 5% de CO_2 pendant six à sept jours, temps nécessaire à l'apparition complète de l'ECP. L'ECP est caractérisé par une ballonisation et une individualisation des cellules avec apparition de vacuoles, formation de syncitia et désorganisation du tapis cellulaire jusqu'à la lyse des cellules et destruction du tapis cellulaire (Figure 21C et D). 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 $1/10^{ème}$ 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 $CCID_{50}$ ("Cell culture infective dose 50%" ou Dose infectant 50% des cellules) exprimé en particules virales infectieuses/mL (Figure 22). La limite inférieure de détection de la méthode par dilutions limites est de 5.10^2 particules infectieuses/mL.

2.4 Evaluation biologique de la rétention de molécules par le modèle de colonne : cytotoxicité et viabilité

La cytotoxicité sur les cellules L-132 des molécules testées a été évaluée et quantifiée. 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 la toxicité des molécules testées.

Pour chaque test, correspondent trois temps d'incubation différents, i.e. 24 h, 48 h et 168 h pour évaluer la toxicité dans les premiers temps de contact et pour avoir une toxicité à plus long terme. De plus, le temps 168 h, soit sept jours, correspond au temps nécessaire pour l'infection avec le HCoV 229E et l'accomplissement de son ECP.

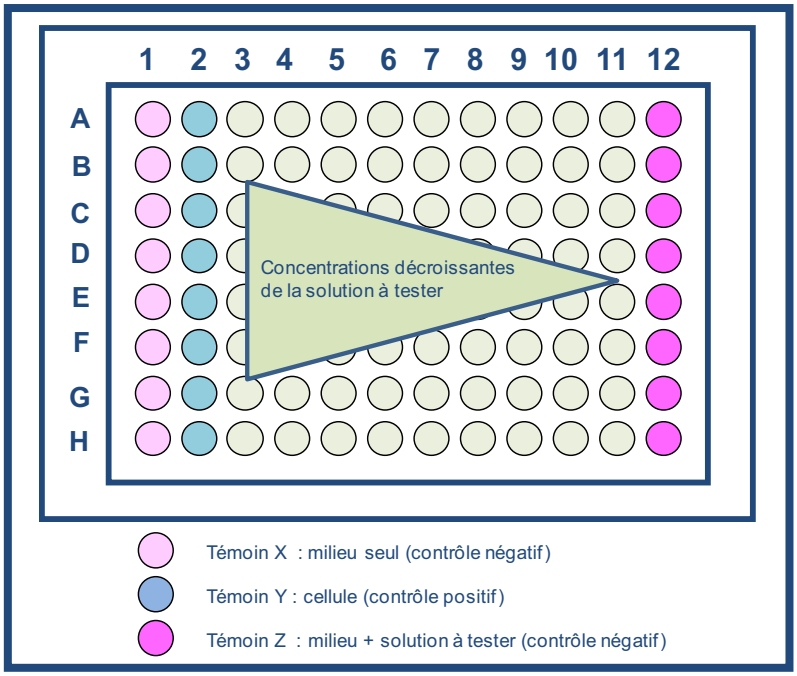


Figure 23 : Schéma des plaques 96 puits dans les tests MTT et RN

2.4.1 Etapes préliminaires communes aux tests de viabilité au MTT et de cytotoxicité au RN

Les cellules L-132 sont ensemencées dans une boîte de culture de 75 cm^2, et après 48 à 72 h d'incubation, les tapis cellulaires alors confluents sont soumis à l'action de la trypsine pour individualiser les cellules. Trois plaques 96 puits, pour les trois temps d'incubation qui seront testés (24 h, 48 h et 168 h), sont ensemencées à 2.10^3 cellules/puits puis incubées à 37°C sous 5% de CO_2. Après 48 h d'incubation, les cellules sont à environ 40% de confluence et les solutions dont la cytotoxicité doit être évaluée sont ajoutées.

Les solutions à tester sont préparées dans de l'eau osmosée stérile, puis la solution "mère" finale est soumise à une filtration stérilisante sur filtre 0,22 µm. Les colonnes 1, 2 et 12 servent de colonnes témoin : deux témoins négatifs, i.e. témoin X : milieu seul (colonne 1) et témoin Z : milieu + solution à tester (colonne 12) pour s'assurer qu'il n'y ait pas de fausse réactivité, et un témoin positif Y ne contenant que des cellules et du milieu (colonne 2), qui servira de référence pour calculer les pourcentages de viabilité et/ou de cytotoxicité (Figure 23). La drogue à tester est ajoutée dans les puits en utilisant la méthode des dilutions sériées, i.e. 20 µL de la solution "mère" sont ajoutés dans chaque puits de la colonne 3, puis après homogénéisation par pipetages successifs, 20 µL sont prélevés puis déposés dans les puits de la colonne 4 et ainsi de suite jusqu'à la colonne 11 où les 20 µL excédentaires sont éliminés pour avoir un volume équivalent dans tous les puits et pour qu'il

n'y ait pas d'interférence lors des mesures spectrophotométriques. Les plaques sont ensuite incubées à 37°C sous 5% de CO_2, pour les temps d'incubation définis précédemment.

2.4.2 Tests de viabilité au MTT

Le protocole de ce test au MTT suit un protocole modifié de Mosmann (Mosmann T., 1983). Après 24 h, 48 h et 168 h d'incubation, une des plaques 96 puits est retirée de l'incubateur, le milieu de culture est éliminé par retournement et 100 µL de PBS/puits sont ajoutés. Dix microlitres d'une solution de MTT à 5 $mg.mL^{-1}$ dans du PBS sont ajoutés, puis la plaque est replacée dans l'incubateur pendant 4 h à 37°C sous 5% de CO_2. Afin de dissoudre les cristaux bleu foncé de formazan formés, 100 µL d'une solution de SDS (Sodium dodecyl sulfate) sont ajoutés dans chaque puits puis la plaque est ré-incubée pendant 4 h à 37°C sous 5% de CO_2. A l'issue de ces 4 h, les mesures spectrophotométriques sont effectuées sur un lecteur de plaques ELISA à la longueur d'onde de 540 nm. Une autre mesure est également réalisée à 690 nm, longueur d'onde de référence. Les absorbances prises en compte dans les calculs suivants correspondent aux moyennes des absorbances obtenues dans les puits d'une même colonne après lecture à 540 nm auxquelles sont retranchées celles obtenues après lecture à 690 nm.

Les pourcentages de viabilité des cellules en présence des molécules à tester sont alors calculés grâce à la formule suivante :

Équation 1 : Pourcentage de viabilité cellulaire

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

où l'échantillon correspond aux puits contenant les cellules et la solution à tester, le témoin X correspond au témoin milieu seul, le témoin Y correspond au témoin cellule (100% de viabilité) et le témoin Z correspond au témoin milieu + solution à tester.

Les CI_{50} ("concentration inhibitrice 50%" soit la concentration inhibant la croissance de 50% des cellules) correspondent alors à la concentration du produit testée engendrant une perte de 50% dans la viabilité cellulaire.

2.4.3 Tests de cytotoxicité au RN

Le protocole pour le test de cytotoxicité au RN suit un protocole modifié de Borenfreund (Borenfreund E. et Borrero O., 1984, Borenfreund E. et Puerner J.A., 1985). Une solution stock de RN à 4 $mg.mL^{-1}$ dans de l'eau osmosée est préalablement préparée puis centrifugée à 405x*g* pendant 10 min pour éliminer les éventuels agrégats. Pour chaque test, une solution à 50 $\mu g.mL^{-1}$ est préparée extemporanément à partir de cette solution stock dans du MEM sans glutamine et sans rouge de phénol, pour ne pas gêner les mesures spectrophotométriques ultérieures, puis filtrée sur un filtre 0,45 µm pour éviter les fins précipités qui peuvent se former lors du mélange entre le RN et le MEM. Deux autres solutions sont également préparées au préalable :

- Une solution A de rinçage pour enlever l'excès de RN et améliorer la fixation des cellules sur le support. Elle contient 4% (v/v) de formaldéhyde à 36,5% (v/v) et 1% (m/v) de chlorure de calcium ($CaCl_2$) dans de l'eau osmosée
- une solution B permettant la lyse cellulaire et contenant 1% (v/v) d'acide acétique, 50% d'éthanol absolu (v/v) dans de l'eau osmosée.

A chaque temps d'incubation, i.e. 24 h, 48 h et 168 h, une des plaques est retirée de l'incubateur et le milieu de culture est éliminé par retournement. Les tapis cellulaires sont rincés avec 200 µL de PBS et 200 µL de la solution de RN à 50 $\mu g.mL^{-1}$ sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est ensuite replacée dans l'incubateur pendant 3 h à 37°C sous 5% de CO_2. La solution de RN est éliminée par retournement. Les puits sont rincés avec 200 µL de la solution A. Cette dernière est éliminée sans attendre par retournement de la plaque, pour ne pas endommager les lysosomes à cette étape, ce qui provoquerait l'extraction prématurée du colorant. Les puits sont alors remplis avec 200 µL de la solution B et la plaque est incubée pendant 20 min à 37°C sous 5% de CO_2. Après agitation des plaques, la quantité de RN libérée est mesurée par lecture spectrophotométrique à 540 nm.

La cytotoxicité est alors évaluée grâce à la formule suivante :

Équation 2 : Pourcentage de cytotoxicité

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

L'échantillon correspond aux puits contenant les cellules et la solution à tester, le témoin X correspond au témoin milieu seul (0% de cytotoxicité), le témoin Y correspond au témoin cellule et le témoin Z correspond au témoin milieu + solution à tester.

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% par comparaison au témoin cellule.

2.5 Evaluation physico-chimique de la rétention des molécules testées par spectrophotométrie UV-visible

Les analyses spectrophotométriques sont menées pour chaque molécule testée. Les paramètres spectrophotométriques spécifiques de chaque molécule (longueur d'onde d'absorption maximum λ_{max}, coefficient d'absorption molaire ε et limite de détection) sont tout d'abord établis en respect de la loi de Beer-Lambert :

Équation 3 : Loi de Beer-Lambert

$$A = \varepsilon.l.c$$

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

Les taux de rétention de chaque molécule aux différentes concentrations testées, après filtration sur les colonnes de Séphadex™, sont ensuite estimés par analyse spectrophotométrique.

Pour établir les paramètres spectrophotométriques spécifiques, une première gamme étendue de dilutions du produit à tester est réalisée afin de définir tout d'abord la limite de détection inférieure et la concentration maximale pouvant être analysée par spectrophotométrie en respect de la loi de Beer-Lambert. 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. De la même façon que dans le test 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. La fenêtre spectrale de mesure large au début, i.e. 180 nm à

600 nm, sera progressivement réduite en fonction des résultats préliminaires. Les spectres obtenus sont traités par le logiciel Spectro2000® (version 6.2.2, SAFAS S.A., Monaco). Après identification de la λ_{max}, les coefficients d'absorption molaire spécifiques sont établis par analyse de régression simple (Matériels et méthodes, 2.7.2, p.129).

Grâce aux données ainsi obtenues, les taux de rétention des différentes molécules par les colonnes de Séphadex™ ont été estimés de façon 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, 2.6.1, p.121 et 2.6.2, p.122) et les dilutions sont filtrées sur les colonnes de Séphadex™ par centrifugation à 1500*xg* pendant 1 min. Les filtrats sont dilués au 1/10ème dans de l'eau osmosée stérile pour avoir une quantité suffisante pour remplir les cuves du spectrophotomètre, i.e. 1 mL, et les mesures d'absorbance sont réalisées. Les concentrations résiduelles sont estimées grâce aux droites de régression obtenues précédemment. Enfin, les taux de rétention sont estimés par comparaison de ces concentrations résiduelles avec les concentrations initiales dans les solutions sans filtration, selon la formule :

Équation 4 : Taux de rétention (TR) des molécules testées par les colonnes de Séphadex™

$$TR = (Ci-Cf)/Ci) \times 100$$

TR est le taux de rétention ; Ci, la concentration initiale sans filtration en mol.L^{-1} et Cf, la concentration finale après filtration sur notre modèle de colonne en mol.L^{-1}.

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, i.e. 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 notre étude, deux types de Séphadex™ ont été utilisés selon leurs capacités de rétention : la Séphadex™ G-10 et la Séphadex™ G-25. Leurs capacités de rétention sont respectivement de 100 – 1000 $g.mol^{-1}$ et de 900 – 5000 $g.mol^{-1}$. 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 fabriquant, 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 $g.L^{-1}$, 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™



A B C

Figure 24 : 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 4500x*g* 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. 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 4500x*g* pendant 1 min en appliquant une accélération moyenne (pour la centrifugeuse utilisée dans cette étude, l'accélération est réglée sur 5 à 6 sur une échelle de 10) (Figure 24). Ce protocole s'applique aussi bien pour la Séphadex™

G-10 que pour la 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 puis neutralisation de l'activité et de la cytotoxicité du produit par filtration sur le modèle de colonnes de Séphadex™ décrit 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 6 à 7 jours, temps nécessaire à l'achèvement de l'ECP du HCoV 229E. Les titres viraux sont ensuite évalués par la méthode en dilutions limites (Matériels et méthodes, 2.3, p.114). 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 4, que nous avons reportée ci-contre pour plus de lisibilité).

Le test a lieu après 48 h à 72 h d'incubation de boîtes de culture de 75 cm^2 à 37°C et sous 5% de CO_2, lorsque les tapis cellulaires arrivent à 90 – 100% de confluence puis ensemencement de plaques 96 puits à raison de 10^4 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_1 et t_2) 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_1 dans de l'eau osmosée
- une plaque pour titrer le filtrat de la suspension virale après t_2 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_1
- deux plaques pour titrer le filtrat du mélange molécule à tester - virus après un temps de contact t_2.

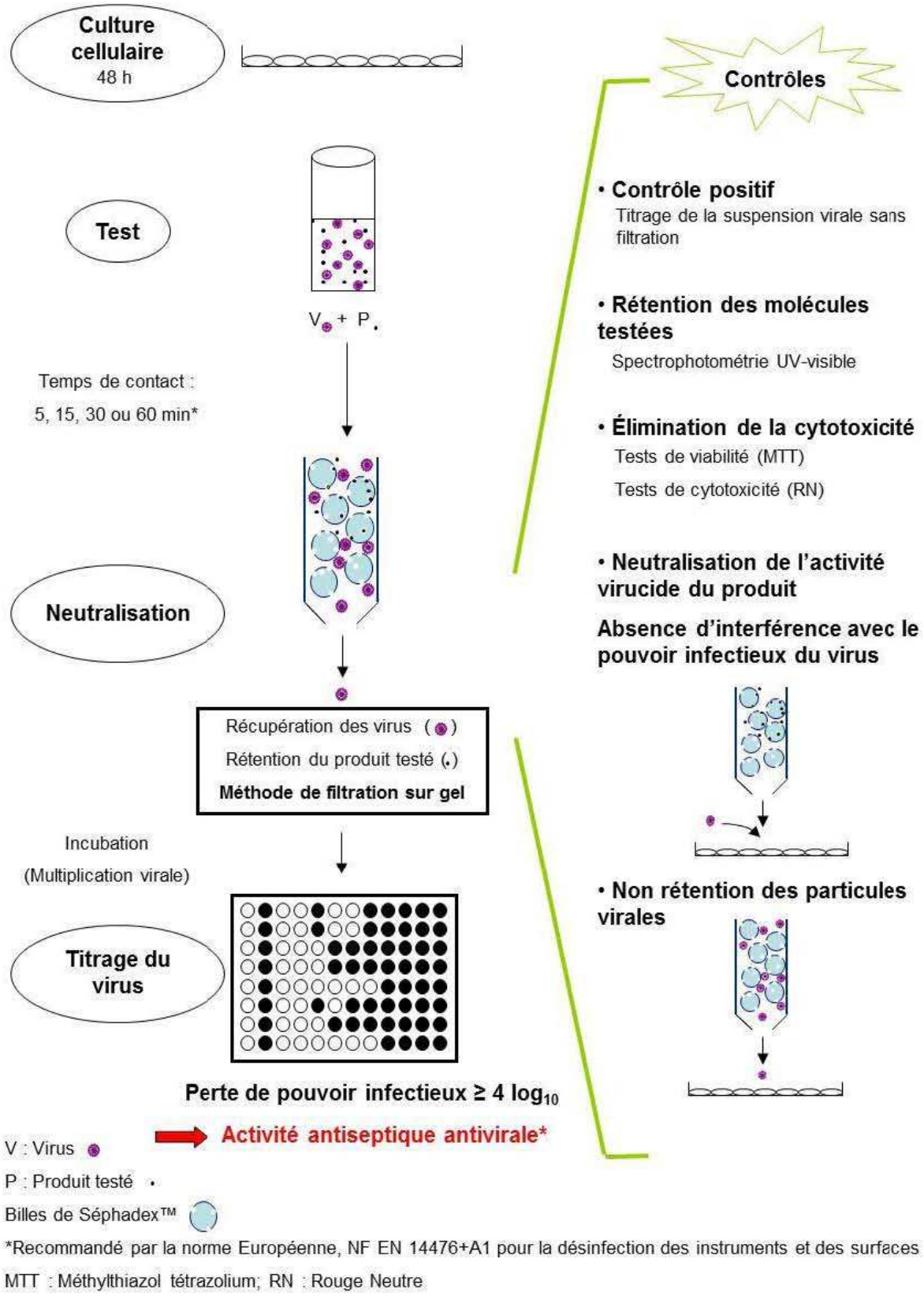


Figure 4 : Principe de l'évaluation de l'activité ATS-D antivirale

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

N° des tubes	Solution à filtrer	Volume nécessaire	Composition	Temps de contact avant filtration sur Séphadex™
Tube 1	Témoin virus t_1	500 µL	100 µL suspension virale + 900 µL eau osmosée stérile	t_1
Tube 2	Témoin virus t_2	500 µL	100 µL suspension virale + 900 µL eau osmosée stérile	t_2
Tube 3	Témoin neutralisation	500 µL	900 µL de la solution à tester à la concentration x + 100 µL eau osmosée stérile	t_1 (arbitrairement)
Tube 4	Témoin cytotoxicité	500 µL	900 µL de la solution à tester à la concentration x + 100 µL eau osmosée stérile	t_2 (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_1
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_2

Tableau 11 : Modalités de préparation des suspensions à tester lors de l'évaluation de l'activité ATS-D antivirale d'un produit

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 les 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 et entraîner des interférences, notamment pour l'estimation des titres viraux (Sturman L.S*., et al.*, 1990). Dans le cas où le pH de l'eau est acide, l'eau est tamponnée à l'aide d'une solution de $NaHCO_3$ à 7,5% (m/v) jusqu'à obtention de la neutralité. L'eau utilisée étant de l'eau osmosée donc désionisée, sa dureté, i.e. les 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 11). 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 405x*g* pendant 1 min, que ce soit pour la Séphadex™ G-10 ou la Séphadex™ G-25. 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 1/10ème 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.114). La potentielle perte de pouvoir infectieux du virus due à l'activité ATS 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 fondamentaux

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. Selon la norme Européenne NF EN 14476+A1, la différence de $\log_{10}$ obtenue entre les titres viraux avec et sans traitement, i.e. 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 (Matériels et Méthodes, 2.6.3, p.123).

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 1/10ème 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 la drogue. La différence entre ces deux titres viraux permet alors de quantifier l'activité virucide de la drogue testée.

2.6.4.2 Contrôle de neutralisation

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 pour reproduire les mêmes conditions de dilutions que celle des tests proprement dits, i.e. 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 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 $\log_{10}$.

2.6.4.3 Contrôle de cytotoxicité

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 complété par les tests vérifiant la rétention du produit à tester qui ont été réalisés au préalable, à savoir les tests de viabilité, de cytotoxicité et spectrophotométriques, réalisés pour chaque molécule testée avec et sans filtration sur nos colonnes de Séphadex™ (Matériels et Méthodes, 2.4, p.116 et 2.5, p.120).

2.7 Analyse statistique

Des analyses statistiques ont été réalisées à différents niveaux de la validation du protocole d'évaluation de l'activité ATS-D antivirale. Nous avons pour cela utilisé le logiciel Statview® (V. 5.0, SAS Institute, Cary, Etats-Unis).

2.7.1 Répétabilité de la fabrication des colonnes

Pour s'assurer de la répétabilité de la fabrication des colonnes de Séphadex™ G–10 et G–25 (Matériels et méthodes, 2.6.2, p.122), des études statistiques ont été effectuées. Nous avons tout d'abord vérifié l'homogénéité des volumes de gels obtenus après la première centrifugation. Différents lots de colonnes ont été réalisés (quatre pour chaque type de gel de Séphadex™) et, pour chaque colonne, les volumes de gel obtenu après la première centrifugation ont été évalués. Pour tester la normalité des distributions de ces volumes, un test non-paramétrique de Komolgorov-Smirnov s'appliquant à de petits échantillons a été mis en œuvre. L'homogénéité des variances a été évaluée par un test de Bartlett. Ce test permet de déterminer si les différences observées au niveau des variances des différents lots de colonnes de chaque gel de Séphadex™ sont bien imputables aux fluctuations d'échantillonnage, c'est-à-dire aléatoires et non causées par un facteur extérieur (biais). Selon le résultat de ce test, i.e. variances homogènes ou non, deux types de tests ont été appliqués.

Dans le cas de variances homogènes, des tests ANOVA ont permis de comparer les moyennes. Dans le cas contraire, un test non-paramétrique de Kruskall-Wallis, permettant d'effectuer une comparaison entre plusieurs échantillons a été mis en œuvre. Le même raisonnement a été suivi pour vérifier l'homogénéité des volumes de filtrats.

2.7.2 Taux de rétention et analyse spectrophotométrique

Pour établir les taux de rétention des molécules testées par les colonnes de Séphadex™, des études spectrophotométriques (Matériels et méthodes, 2.5, p.120) ont été effectuées.

Les paramètres spectrophotométriques spécifiques, notamment les coefficients d'absorption molaires, ont été déterminés pour chaque molécule. Pour cela, des analyses de régression simple entre les absorbances mesurées et les concentrations testées ont été mises en œuvre. Ces analyses ont permis la détermination des coefficients d'absorption molaire correspondant aux pentes des droites de régression et résultant de l'Équation 3 (Loi de Beer-Lambert). Pour chaque analyse, les coefficients de détermination (ou de régression) R^2, la valeur de p et l'intervalle de confiance du coefficient d'absorption molaire à 95% ont été calculés. Les valeurs des concentrations résiduelles dans les filtrats obtenus, et de là, les taux de rétention, ont ainsi pu être extrapolés.

Résultats

Afin de valider les différentes méthodes décrites ci-dessus, un certain nombre d'étapes d'optimisation ont été nécessaires.
Tout d'abord, suite à une variabilité dans la croissance cellulaire, les tests MTT et RN ont dû être optimisés pour les cellules L-132.
La conception des colonnes de Séphadex™ a bien évidemment nécessité un certain nombre d'étapes pour parvenir à un protocole unique permettant l'obtention de colonnes reproductibles. Ces étapes, ainsi que les études statistiques qui en ont découlé sont décrites dans ce chapitre.

Suite à cette démonstration, des études ont été menées pour un choix avisé des molécules de référence. Enfin, chaque molécule de l'étude (CHX, HXM, C[4]S et C[4]S-BTZ) a été soumise à différents essais : (i) cytotoxicité avant et après filtration sur les colonnes de Séphadex™, (ii) estimation du taux de rétention par les colonnes et (iii) évaluation de l'activité ATS-D sur le HCoV 229E.

1 Développement d'un protocole de détermination de l'activité ATS-D antivirale

1.1 Tests de viabilité et de cytotoxicité

1.1.1 Principe et objectifs

La cytotoxicité d'une molécule peut résulter d'actions différentes sur les cellules, i.e. altération de la membrane plasmique et/ou autres membranes cellulaires, avec fuite des composants intracellulaires, interactions et/ou blocage du métabolisme cellulaire, action délétère sur l'ADN cellulaire et/ou blocage du cycle cellulaire. La cytotoxicité peut également s'exprimer par une diminution de la sensibilité des cellules à l'infection virale. Pour apprécier au plus juste l'effet des molécules testées sur le système cellulaire choisi, i.e. les cellules L-132, deux types de tests complémentaires ont donc été utilisés. Les tests de viabilité, utilisant un sel de tétrazolium, le MTT ou bromure de 3(-4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium), permettent d'évaluer l'impact

d'une molécule sur le système enzymatique des cellules et donc sur le métabolisme cellulaire. Les tests de cytotoxicité ou tests au rouge neutre (RN), permettent de différencier les cellules mortes des cellules vivantes.

1.1.2 Test de viabilité au MTT

Le MTT est un sel de tétrazolium chargé positivement. Sa réduction intracellulaire induit la formation de cristaux de formazan, bleus et insolubles.

Sa réduction n'est pas exclusivement réalisée par les enzymes mitochondriales comme la succinate déshydrogénase, comme cela a longtemps été présumé. Les coenzymes nucléotidiques sous leur forme réduite, le NADH et le NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)), jouent en effet un rôle fondamental dans la réduction du MTT (Berridge M.V. *et al.*, 1996). De plus, ce dernier entre dans les cellules soit par un mécanisme d'endocytose soit par intervention de protéines membranaires – mécanismes tous deux actifs.

Les cristaux de formazan insolubles sont retrouvés dans des vésicules intracytoplasmiques puis, probablement par un mécanisme d'exocytose, ces cristaux sont relargués dans le milieu extracellulaire où ils forment des aiguilles de cristaux de formazan insolubles (Liu Y. *et al.*, 1997).

Pour mesurer alors la viabilité cellulaire, les cristaux de formazan sont alors solubilisés et une mesure spectrophotométrique est réalisée.

1.1.3 Test de cytotoxicité au RN

Le RN est un colorant vital, faiblement cationique, qui pénètre dans les cellules à travers la membrane plasmique par diffusion non ionique. Il s'accumule dans les lysosomes des cellules vivantes par un mécanisme actif ou passif, non élucidé et se lie à la matrice lysosomale par des liaisons électrostatiques hydrophobes. Les cellules vivantes ayant incorporé le RN sont ensuite lysées et la quantité de RN libérée, proportionnelle au nombre de cellules vivantes, est mesurée par spectrophotométrie à 540 nm.

1.1.4 Optimisation des protocoles MTT et RN

Le but de cette optimisation était d'avoir des conditions expérimentales similaires et optimales entre les tests MTT et RN (protocoles définitifs décrits dans Matériels et Méthodes, 2.4, p.116), afin d'obtenir des résultats comparables et homogènes.

Un premier point important pour évaluer la cytotoxicité de différentes molécules, que ce soit lors des tests MTT ou RN, est de ne pas être à une confluence totale des cellules lors de l'ajout des drogues. Un remplissage des puits d'environ 40% permet en effet un contact optimal entre les cellules et les molécules à tester. De plus, il est nécessaire d'avoir des absorbances interprétables, ni trop élevées (<1) ni trop basses (>0,2) pour pouvoir établir une comparaison entre les cellules non soumises à l'action de la molécule à tester (puits témoins) et les cellules en contact avec cette dernière.

Lors des premiers tests MTT sur les cellules L-132, les cellules ont été ensemencées dans des plaques 96 puits à raison de 10^4 cellules/puits. Or dès 24 h après l'ajout de la drogue, les absorbances étaient déjà supérieures à 1 et donc beaucoup trop élevées.

L'inoculum cellulaire a alors été réduit à 10^3 cellules/puits. Les résultats obtenus dans les tests MTT étaient satisfaisants (absorbances comprises entre 0,4 et 0,8 pour les différents temps d'incubation). Cependant, dans les tests RN, les absorbances à 24 h étaient beaucoup trop faibles (<0,2) pour être interprétables, et ce à cause des différentes étapes de lavages inhérentes au test de RN. Les résultats n'ont pas été améliorés par l'ajout de milieu à 10% de SVF (au lieu de 5% de SVF) pour accélérer la croissance.

Différents inocula cellulaires entre 10^3 et 10^4 cellules/puits ont donc été expérimentés (Figure 25). Or dès 3.10^3 cellules/puits, les absorbances à 48 h, dans les tests au RN, étaient supérieures à 1 et donc trop élevées pour être interprétables. L'inoculum à 2.10^3 cellules/puits semblait être le plus adapté pour les deux tests.

En effet, les absorbances pour les tests MTT étaient comprises entre 0,4 et 0,8 environ et pour les tests RN, entre 0,2 et 0,8. Cet inoculum a donc été retenu.

Au cours de ces essais, un "effet de bord" est apparu clairement dans les deux types de tests, avec une diminution de la viabilité et/ou augmentation de la cytotoxicité dans les puits situés sur le pourtour des plaques 96 puits. Ceci était probablement dû à un phénomène de séchage par évaporation du milieu sur les bords des plaques. Afin de ne pas diminuer la puissance de nos tests, les colonnes 1 et 12 ont donc été utilisées pour placer les contrôles négatifs (témoin milieu seul et témoin milieu + drogue à tester).

Nous pouvons également observer dans la Figure 25 un élément caractéristique des tests MTT et RN, que l'on retrouvera par la suite, i.e. une diminution de l'absorbance à 168 h traduisant une diminution du nombre de cellules métaboliquement actives (tests MTT) et/ou vivantes (tests RN). Ceci peut s'expliquer par la mort naturelle des cellules après plus d'une semaine d'incubation.

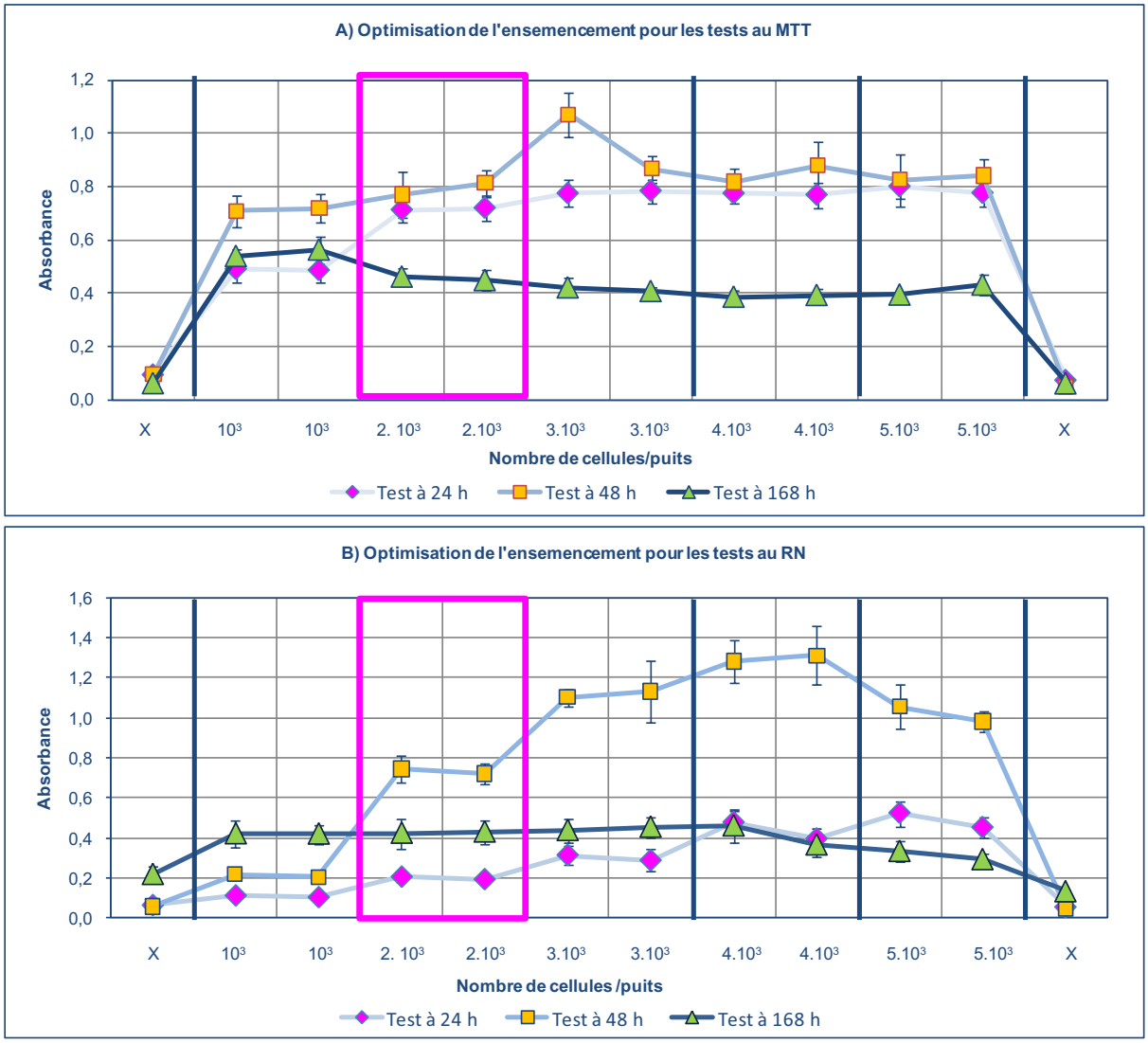


Figure 25 : Optimisation de l'ensemencement cellulaire pour les tests MTT et RN

Les résultats obtenus pour les tests MTT et pour les tests RN avec les différents inocula cellulaires sont représentés en A et en B respectivement. Les différents temps d'incubation, i.e. 24, 48 et 168 h, sont représentés pour les 2 types de tests. X représente le témoin milieu seul (contrôle négatif). Pour les tests MTT, les absorbances représentées correspondent aux absorbances obtenues à 540 nm auxquelles les absorbances à 690 nm (longueur d'onde de référence) ont été soustraites.

Ces protocoles ayant été optimisés, nous les avons mis en application pour l'évaluation de la cytotoxicité de différentes molécules, avec les résultats que nous décrivons dans la suite de cet exposé. Pour comparer ces résultats, les CI_{50} et les CC_{50} ont été calculées (Matériels et Méthodes, 2.4.2, p.118 et 2.4.3, p.119), pour les tests MTT et RN respectivement, valeurs caractéristiques des molécules testées sur les cellules L-132.

1.2 Obtention des colonnes de Séphadex™ G-10 et G-25

1.2.1 Optimisation des temps et vitesses de centrifugation

Le protocole aboutissant à l'obtention des colonnes de Séphadex™ G-10 et G-25 comporte deux centrifugations (Matériels et Méthodes, 2.6.2, p.122) : (i) une pour éliminer le PBS dans lequel est suspendu le gel de Séphadex™ et obtenir les colonnes prêtes à l'emploi, et (ii) une pour filtrer le mélange virus/solution à tester en retenant les molécules de la solution et en laissant passer les virus.

Lors des premières ébauches de ces colonnes, nous avons cherché les vitesses et temps de centrifugation optimaux pour parvenir à un protocole unique permettant l'obtention reproductible des colonnes. Pour cela, différentes combinaisons de volumes de gel déposé en haut des colonnes, de vitesses et de temps de centrifugation ont été examinées, en associant ces essais à la rétention de molécules colorées. Pour la première centrifugation, nous avons testé des volumes de gel de 750 µL et de 1000 µL. Des vitesses de centrifugation de 405*xg*, 720*xg*, 1620*xg*, 2880*xg* et 4500*xg* ont été combinées avec différents temps de centrifugation, i.e. 1 min, 2 min et 3 min. Pour la seconde centrifugation, les mêmes vitesses de centrifugation ont été testées mais le temps de centrifugation a toujours été d'une minute. Le temps de contact entre les molécules et les virus ne devait en effet pas être allongé. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec un dépôt de 1000 µL de gel, que ce soit pour la Séphadex™ G–25 ou G–10, une vitesse de centrifugation de 4500*xg* et un temps d'une minute pour la première centrifugation, et pour la seconde centrifugation, la vitesse de centrifugation semblant la plus adaptée à notre but était de 1500*xg* pendant une minute, et ce pour les deux types de gel. L'une de nos préoccupations était, en effet, d'élaborer des protocoles identiques ou les plus similaires possibles pour simplifier les démarches à suivre.

Afin de valider ces paramètres et la reproductibilité des colonnes obtenues, des études statistiques ont été conduites (Matériels et Méthodes, 2.7.1, p.128). Leur principe repose sur la démonstration de l'homogénéité : (i) des volumes de gel obtenus lors de la première centrifugation et (ii) des volumes de filtrats obtenus après la seconde centrifugation. De plus, des molécules colorées ont été

utilisées afin d'évaluer leur rétention par les colonnes en faisant appel à des méthodes spectrophotométriques (détermination des paramètres spectrophotométriques propres de ces molécules et évaluation de leur concentration résiduelle dans les filtrats) pour s'assurer de la fonctionnalité de nos colonnes. Ainsi ont été sélectionnés, d'une part, le bleu de trypan (BT) de masse moléculaire 960,83 $g.mol^{-1}$ pour tester les colonnes de Séphadex™ G–25 et d'autre part, le rouge neutre (RN), de masse moléculaire 288,78 $g.mol^{-1}$ pour tester les colonnes de Séphadex™ G-10. Pour chaque type de Séphadex™, quatre lots de dix colonnes ont été réalisées sur lesquelles deux concentrations différentes des solutions des molécules colorées citées précédemment ont été testées.

1.2.2 Homogénéité des volumes de gels et de filtrats

1.2.2.1 Colonnes de Séphadex™ G-25

L'homogénéité des volumes de gels de Séphadex™ G-25 obtenus après la première centrifugation ont tout d'abord été démontré (Annexe 2, 1.1). Les tests de Komolgorov–Smirnov ont permis d'établir la normalité de distribution des volumes de gels des différents lots. Les p obtenus, ($p_{lot\ A}$ = 0,8131, $p_{lot\ B}$, $p_{lot\ C}$ et $p_{lot\ D}$ > 0,9999) étaient tous supérieurs à 0,05 et indiquaient qu'il n'existait pas de différence significative dans les distributions. Elles pouvaient donc être considérées comme normales. Un test de Bartlett a ensuite permis de comparer les variances et d'en vérifier l'homogénéité (p = 0,1888 > 0,05), avant de pouvoir pratiquer un test ANOVA. Ce dernier a indiqué l'absence de différence significative entre les moyennes des volumes de gel obtenus (p = 0,0684 > 0,05). Dans un deuxième temps, l'homogénéité des volumes de filtrats obtenus a été établie (Annexe 2,1.2). Comme pour les volumes de gels, les tests de Komolgorov-Smirnov ont permis de montrer la normalité des distributions des volumes de filtrats ($p_{lot\ A}$ > 0,9999, $p_{lot\ B}$ = 0,4038, $p_{lot\ C}$ = 0,8131 et $p_{lot\ D}$ > 0,9999 donc tous supérieurs à 0,05). Le test de Bartlett montrait cependant que les variances n'étaient pas homogènes (p = 0,0240 < 0,05). On ne pouvait donc pas utiliser le test ANOVA. Un test non-paramétrique de type Kruskall-Wallis, équivalent non paramétrique du test ANOVA et permettant la comparaison de plus de deux moyennes, a donc été mis en œuvre. Ce test a permis de montrer qu'il n'existait pas de différence significative entre les moyennes des filtrats obtenus (p = 0,5242 > 0,05).

1.2.2.2 Colonnes de Séphadex™ G-10

Les mêmes analyses ont été menées sur les colonnes de Séphadex™ G–10 et dans un premier temps pour les volumes de gels obtenus après la première centrifugation. La normalité des distributions a tout d'abord été démontrée par un test de Kolmogorov-Smirnov (tous les p sont > 0,9999 et donc à 0,05). Après avoir mis en œuvre un test de Bartlett (p = 0,8110 > 0,05) pour vérifier l'homogénéité des variances, un test ANOVA a été réalisé (p = 0,5954 > 0,05). Ce dernier a permis de conclure qu'il n'existait pas de différence significative dans les moyennes des volumes de gel obtenus. Enfin, l'homogénéité du volume des filtrats a été confirmée en suivant la même méthode (Annexe 2, 2.2). Les tests de Kolmogorov-Smirnov ont indiqué la normalité des distributions des volumes de filtrats ($p_{lot\ A}$ = 0,8131, $p_{lot\ B}$ > 0,9999, $p_{lot\ C}$ = 0,4038 et $p_{lot\ D}$ = 0,8131 donc tous supérieurs à 0,05). Le test de Bartlett, comme dans le cas des colonnes de Séphadex™ G–25, montrait que les variances n'étaient pas homogènes (p = 0,0055 et donc < 0,05). Un test de Kruskall–Wallis a alors permis de démontrer qu'il n'existait pas de différence significative entre les moyennes des volumes de filtrats obtenus (p = 0,0167 <0,05).

La reproductibilité de la fabrication de nos colonnes a donc été démontrée en s'assurant de l'homogénéité des volumes de gels et des volumes de filtrats obtenus. Dans le cadre de la validation de notre méthode, une autre étape était également fondamentale : s'assurer de la rétention de molécules par nos colonnes de Séphadex™ et de la non-rétention des particules virales.

1.2.3 Contrôle de la fonctionnalité des colonnes : rétention de molécules colorées

1.2.3.1 Rétention du BT par les colonnes de Séphadex™ G-25

Le BT a été utilisé pour tester les colonnes de Séphadex™ G–25. Sa masse moléculaire, de 960,83 g.mol^{-1}, le place à la limite inférieure de la rétention théorique du gel de Séphadex™ G–25.

Paramètres spectrophotométriques spécifiques du BT

Ses paramètres spectrophotométriques ont tout d'abord été établis par la réalisation d'une gamme étalon. Une gamme de 10^{-7} mol.L^{-1} à $4{,}1.10^{-4}$ mol.L^{-1} (la concentration de la solution commerciale de BT est de $4{,}1.10^{-3}$ mol.L^{-1}) a été réalisée. Les spectres d'absorption du BT dans l'UV-visible sont représentés dans la Figure 26.

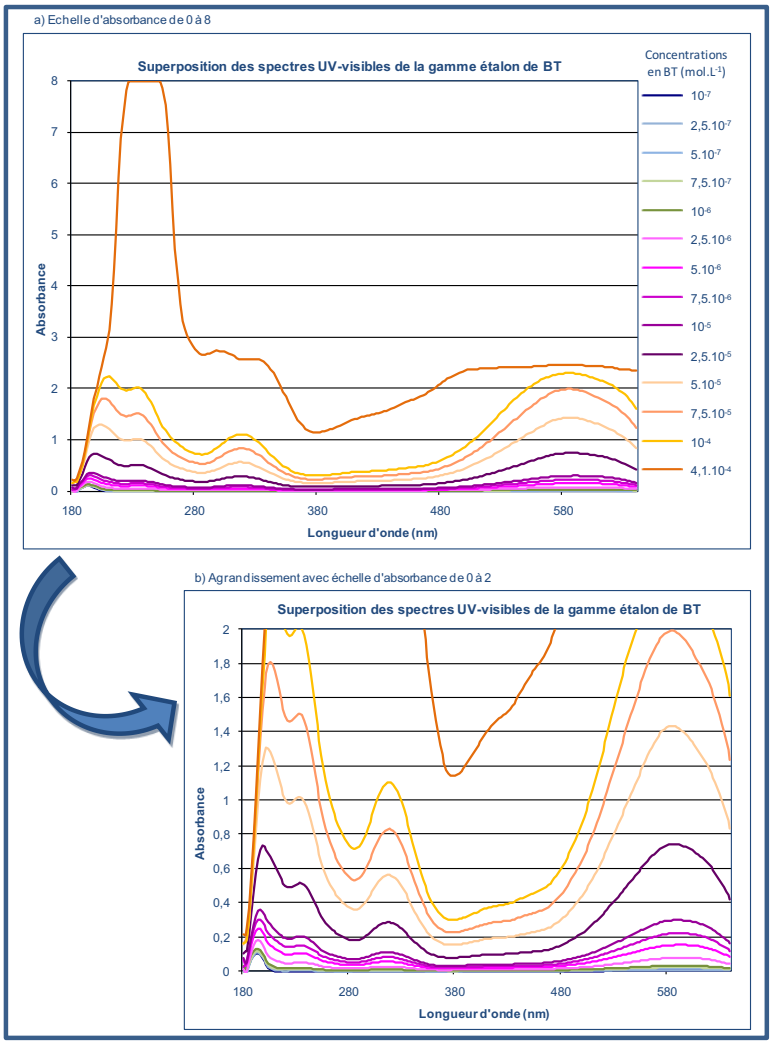


Figure 26 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible du BT

Les solutions de BT dont les concentrations étaient supérieures à 10^{-4} mol.L^{-1} présentaient des absorbances trop fortes pour être interprétables et celles dont les concentrations étaient inférieures à $2{,}5.10^{-6}$ mol.L^{-1} sont trop faibles (< 0,2). Le BT ne semblait pas être détectable en-dessous de cette concentration. Trois pics d'absorption maximale à 234 nm, 317 nm et 590 nm étaient observables (Annexe 2, 3.1). Il existait également un pic aux environs de 200 nm mais à cette longueur d'onde, l'absorption est considérée comme non spécifique. Une analyse de régression simple a été réalisée A = f(c) (Matériels et Méthodes, 2.7.2, p.129) pour déterminer les coefficients d'absorption molaires spécifiques.

Pour $\lambda_{max\,=}$ 234 nm, la relation était linéaire entre $2{,}5.10^{-6}$ et 10^{-4} mol.L^{-1} (coefficient de détermination $R^2 = 1$) et la limite de détection était de 5.10^{-7} mol.L^{-1}. Le coefficient d'absorption molaire à 234 nm, ε_{234}, était de $2{,}02.10^{4}$ L.mol^{-1}.cm^{-1} (Annexe 2, 3.2.1).

Pour $\lambda_{max\,=}$ 317 nm, la relation était linéaire entre $2{,}5.10^{-6}$ et 10^{-4} mol.L^{-1} ($R^2 = 0{,}999$). La limite de détection était de $7{,}5.10^{-7}$ mol.L^{-1} et $\varepsilon_{317} = 1{,}11.10^{4}$ L.mol^{-1}.cm^{-1} (Annexe 2, 3.2.2).

Pour $\lambda_{max\,=}$ 590 nm, la relation était linéaire entre 5.10^{-7} mol.L^{-1} et $7{,}5.10^{-5}$ mol.L^{-1} (R^2 = 0,987). La limite de détection était de 5.10^{-7} mol.L^{-1} et $\varepsilon_{590,}$ = $2{,}44.10^{4}$ L.mol^{-1}.cm^{-1} (Annexe 2, 3.2.3).

Taux de rétention du BT par les colonnes de Séphadex™ G-25

Ces paramètres ayant été définis, les taux de rétention pouvaient alors être déterminés par filtration de solution de BT sur nos colonnes de Séphadex™ G–25. Les filtrats des deux solutions de BT à deux concentrations différentes obtenus lors la validation de la reproductibilité ont été utilisés (Résultats, 1.2.2.1, p. 136). Ainsi, quatre lots distincts ont été testés. Les lots A et B correspondaient aux filtrats d'une solution de BT à $4{,}1.10^{-3}$ mol.L^{-1} et les lots C et D correspondaient aux filtrats d'une solution à $4{,}1.10^{-4}$ mol.L^{-1}. Les spectres obtenus sont représentés dans la Figure 27. Le protocole opératoire correspond à celui défini dans Matériels et méthodes, 2.6.2, p.122, i.e. filtration des solutions après dépôt de 500 µL de ces solutions en haut des colonnes suivie d'une centrifugation à 1500*xg*.

Lors de la filtration de la solution de BT à $4{,}1.10^{-4}$ mol.L^{-1}, l'absence des pics caractéristiques du BT laissait penser à la rétention du BT. Cependant, lors de la filtration d'une solution à $4{,}1.10^{-3}$ mol.L^{-1}, l'existence de pics impliquait la présence de BT dans les filtrats et donc une rétention au moins incomplète. Pour quantifier cette rétention, les taux de rétention du BT par les colonnes de Séphadex™ ont été calculés (Tableau 12) en utilisant l'Équation 4. Les taux de rétention obtenus différaient quelque peu selon les longueurs d'onde maximales mais ils sont tous supérieurs à 80% quelque soit la concentration initiale. Les moyennes des taux de rétention obtenus de la solution à $4{,}1.10^{-4}$ mol.L^{-1} étaient, pour le lot A, de 85,2%, 92,5% et 96,4% à 234 nm; 317 nm et 590 nm respectivement et pour le lot B, de 84,1%, 87,2% et de 92,2% aux mêmes longueurs d'onde.

Les moyennes des taux de rétention pour la solution à $4{,}1.10^{-3}$ mol.L^{-1} étaient pour le lot C de 92,9%, 93,6% et 93,5% et pour le lot D 87,3%, 87,7% et de 86,9% à 234 nm, 317 nm et 590 nm. Ces taux étaient donc très encourageants et la rétention des solutions de BT était pratiquement complète. Il nous faut préciser ici que les taux de rétention plus élevés pour les solutions à 10^{-3} mol.L^{-1} que pour les solutions à 10^{-4} mol.L^{-1} résultaient des limites de sensibilité de la méthode et des techniques de calcul.

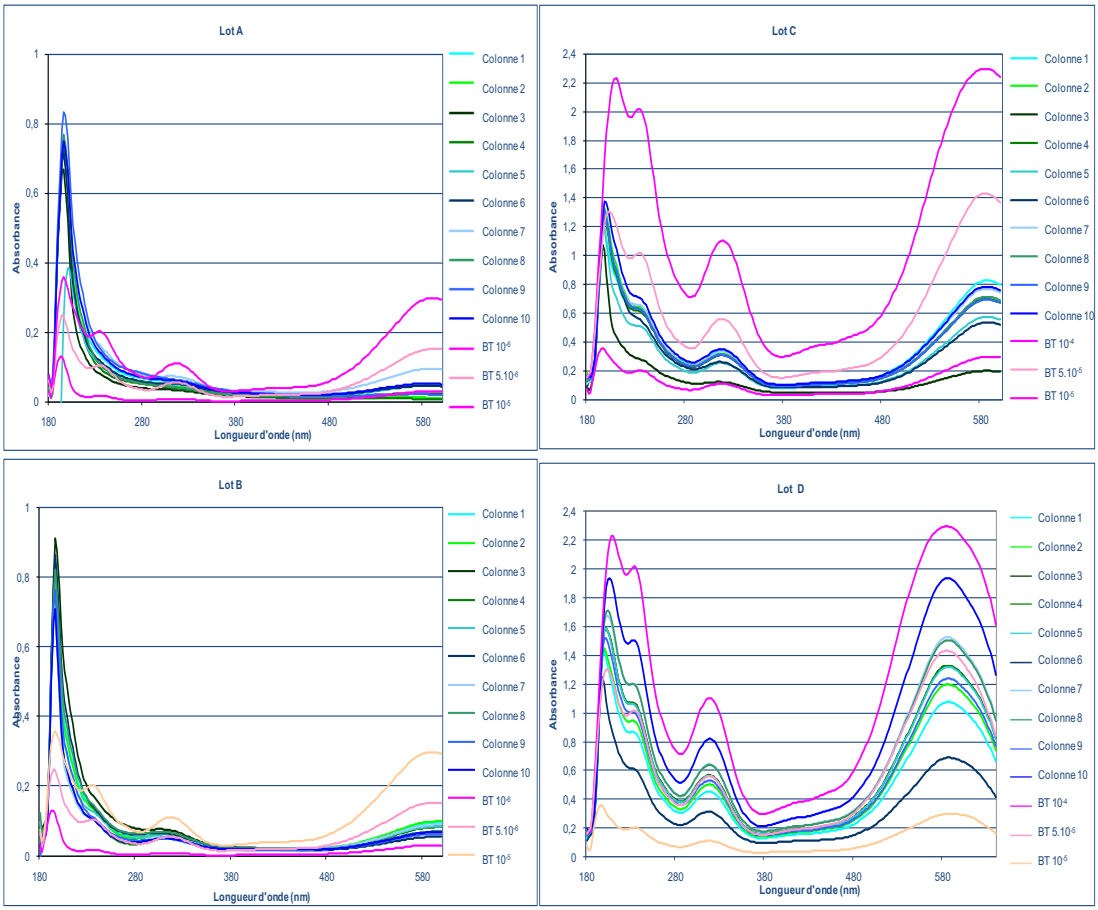


Figure 27 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible de filtrats de solutions de BT après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-25

Chaque lot comprend 10 filtrats différents. Les lots A et B correspondent aux filtrats d'une solution à $4{,}1.10^{-4}$ mol.L^{-1} et les lots C et D correspondent aux filtrats d'une solution à $4{,}1.10^{-3}$ mol.L^{-1}. Sur chaque graphique, sont représentés les spectres de solutions de BT non filtrées (concentrations exprimées en mol.L^{-1}) pour comparaison.

Concentration des solutions de BT filtrées	A à 234 nm	C estimée (mol.L^{-1})	TR (%)	A à 317 nm	C estimée (mol.L^{-1})	TR (%)	A à 590 nm	C estimée (mol.L^{-1})	TR (%)
$4{,}1.10^{-4}$ mol.L^{-1}									
lot A (n = 10)	0,122 ± 0,027	(6,05 ± 1,31).10^{-5}	**85,2 ± 3,2**	0,052 ± 0,031	(3,06 ±1,68).10^{-5}	**92,5 ± 4;1**	0,066 ± 0,026	(1,48 ± 1,06).10^{-5}	**96,4 ± 2,6**
lot B (n = 10)	0,132 ± 0,024	(6,52 ± 1,17).10^{-5}	**84,1 ± 2,8**	0,058 ± 0,001	(5,26 ± 0,77).10^{-5}	**87,2 ± 1,9**	0,078 ± 0,014	(3,21 ± 5,84).10^{-5}	**92,2 ± 1,4**
$4{,}1.10^{-3}$ mol.L^{-1}									
lot C (n = 10)	0,587 ± 0,120	(2,90 ± 0,60).10^{-4}	**92,9 ± 1,5**	0,291 ± 0,067	(2,62 ± 0,60).10^{-4}	**93,6 ± 1,4**	0,684 ± 0,181	(2,66 ± 0,74).10^{-4}	**93,5 ± 1,8**
lot D (n = 10)	1,050 ± 0,234	(5,20 ± 1,16).10^{-4}	**87,3 ± 2,83**	0,560 ± 0,133	(5,04 ± 1,19).10^{-4}	**87,7 ± 2,9**	1,310 ± 0,321	(5,37 ± 1,31).10^{-4}	**86,9 ± 3,2**

Tableau 12 : Taux de rétention de solutions de BT à $4{,}1.10^{-4}$ et $4{,}1.10^{-3}$ mol.L^{-1} par les colonnes de Séphadex™ G-25

Les moyennes des absorbances obtenues aux longueurs maximales d'absorption du BT, i.e 234 nm, 317 nm et 590 nm, ainsi que les moyennes des concentrations résiduelles estimées dans les filtrats et les moyennes des taux de rétention sont représentées pour chaque lot dans ce tableau. Les concentrations ont été estimées grâce à l'Équation 3 (Loi de Beer-Lambert) et les taux de rétention ont été calculés grâce à l'Équation 4.

1.2.3.2 Rétention du RN par les colonnes de Séphadex™ G-10

Une démarche similaire a été appliquée pour les colonnes de Séphadex™ G-10 en évaluant la rétention de solutions de RN à deux concentrations différentes. De même que pour les colonnes de Séphadex™ G-25 et le BT, les filtrats correspondent à ceux obtenus lors de la validation de la reproductibilité de l'élaboration des colonnes (Résultats, 1.2.2.2, p.137).

Paramètres spectrophotométriques spécifiques du RN

Les paramètres spectrophotométriques spécifiques du RN ont été établis en réalisant tout d'abord une gamme étalon, de 5.10^{-7} à 5.10^{-4} mol.L^{-1} (la limite de solubilité du RN dans l'eau est de 4% (m/V) soit 0,14 mol.L^{-1} (Merck Index. 10ème édition, 1983), et en réalisant les spectres dans le domaine UV-visible (Figure 28).

Trois pics d'absorption maximale étaient observables sur ce graphique, un aux environs de 200 nm, considéré, comme précédemment pour le BT, comme non spécifique, un aux environ de 270 nm et un aux environs de 450 nm. Les longueurs d'onde précises, obtenues en faisant les moyennes des longueurs d'onde des maxima d'absorption pour chaque concentration testée de RN (Annexe 2, 4.1, Tableau II) étaient de 276 nm et de 456 nm. Des analyses de régression simple A = f(c) (Matériels et Méthodes, 2.7.2, p.129) ont été menées pour les deux pics à 276 nm et à 456 nm afin de déterminer les coefficients d'absorption molaire spécifiques ε grâce à l'Équation 3 (Loi de Beer-Lambert).

Ainsi, à 276 nm, la relation était linéaire entre 5.10^{-7} et 5.10^{-5} mol.L^{-1} (R^2 = 0,982) et le coefficient d'absorption molaire spécifique ε_{276} était de $2,67.10^4$ L.mol^{-1}.cm^{-1} (Annexe 2, 4.2.1)

A 456 nm, la relation était également linéaire entre 5.10^{-7} et 5.10^{-5} mol.L^{-1} (R^2 = 0,987) et le coefficient d'absorption molaire spécifique ε_{276} était de $8,63.10^4$ L.mol^{-1}.cm^{-1} (Annexe 2, 4.2.2).

La limite de détection inférieure du RN était de $2,5.10^{-6}$ mol.L^{-1} et supérieure de 5.10^{-5} mol.L^{-1}. En effet, malgré une conservation de la linéarité de la relation jusqu'à 5.10^{-7} mol.L^{-1}, les absorbances obtenues pour des concentrations inférieures à $2,5.10^{-6}$ mol.L^{-1} étaient trop faibles pour être interprétables. Cependant, selon le MERCK Index (Merck Index. 10ème édition, 1983), la λ_{max} du RN est de 533 nm mais dilué dans l'alcool.

Taux de rétention du RN par les colonnes de Séphadex™ G-10

Ces paramètres ainsi déterminés, les taux de rétention de solutions de RN à deux concentrations différentes, i.e. 10^{-4} mol.L^{-1} et 10^{-3} mol.L^{-1} ont pu être évalués. Comme lors des tests avec le BT et les colonnes de Séphadex™ G-25, les filtrats analysés étaient ceux obtenus lors de l'évaluation de la

reproductibilité de la fabrication des colonnes de Séphadex™ G-10, soit deux lots de dix colonnes pour chaque concentration (lot A et B pour la concentration 10^{-4} mol.L^{-1} et les lots C et D pour la concentration 10^{-3} mol.L^{-1}).

Les graphiques obtenus sont représentés dans la Figure 29. Ainsi, après filtration sur les colonnes de Séphadex™ de solutions de RN à 10^{-4} mol.L^{-1} et 10^{-3} mol.L^{-1}, les pics d'absorbance spécifiques du RN avaient disparu, signifiant la rétention de ces solutions. Les concentrations résiduelles dans les filtrats ont été estimées en suivant la loi de Beer-Lambert (Équation 3) et les taux de rétention ont été calculés (Équation 4). Les résultats sont consignés dans le Tableau 13. Cependant les concentrations estimées étaient proches voire en-dessous du seuil de détection que nous avions défini précédemment, notamment pour les concentrations estimées à λ_{456}. Ainsi, comme pour le BT, les taux de rétention plus élevés pour les solutions à 10^{-3} mol.L^{-1} que pour les solutions à 10^{-4} mol.L^{-1} résultaient des limites de sensibilité de la méthode et des techniques de calcul. Nous pouvons donc conclure à une rétention quasi complète des solutions de RN, aux concentrations testées, par les colonnes de Séphadex™ G-10.

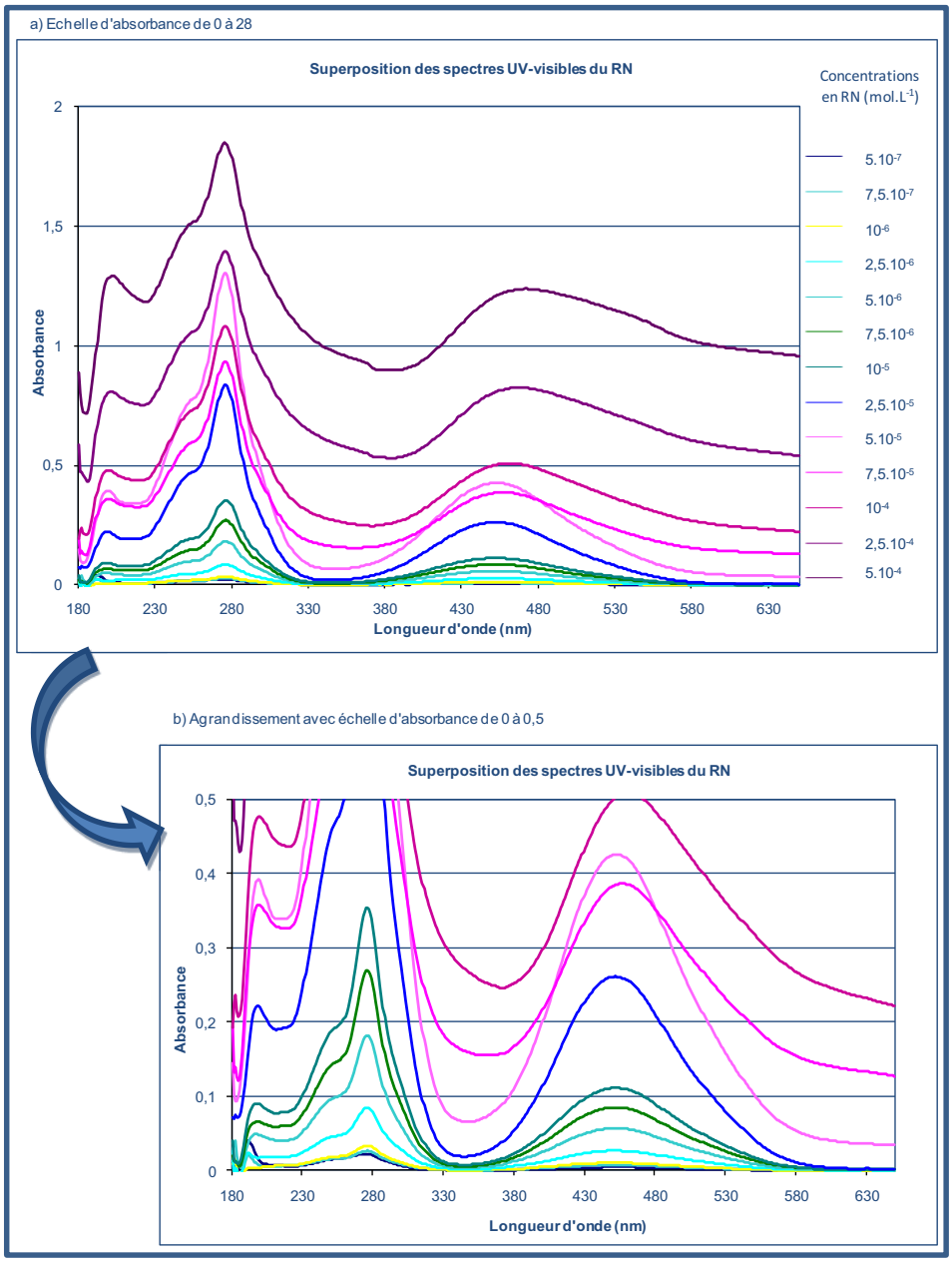


Figure 28 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible du RN

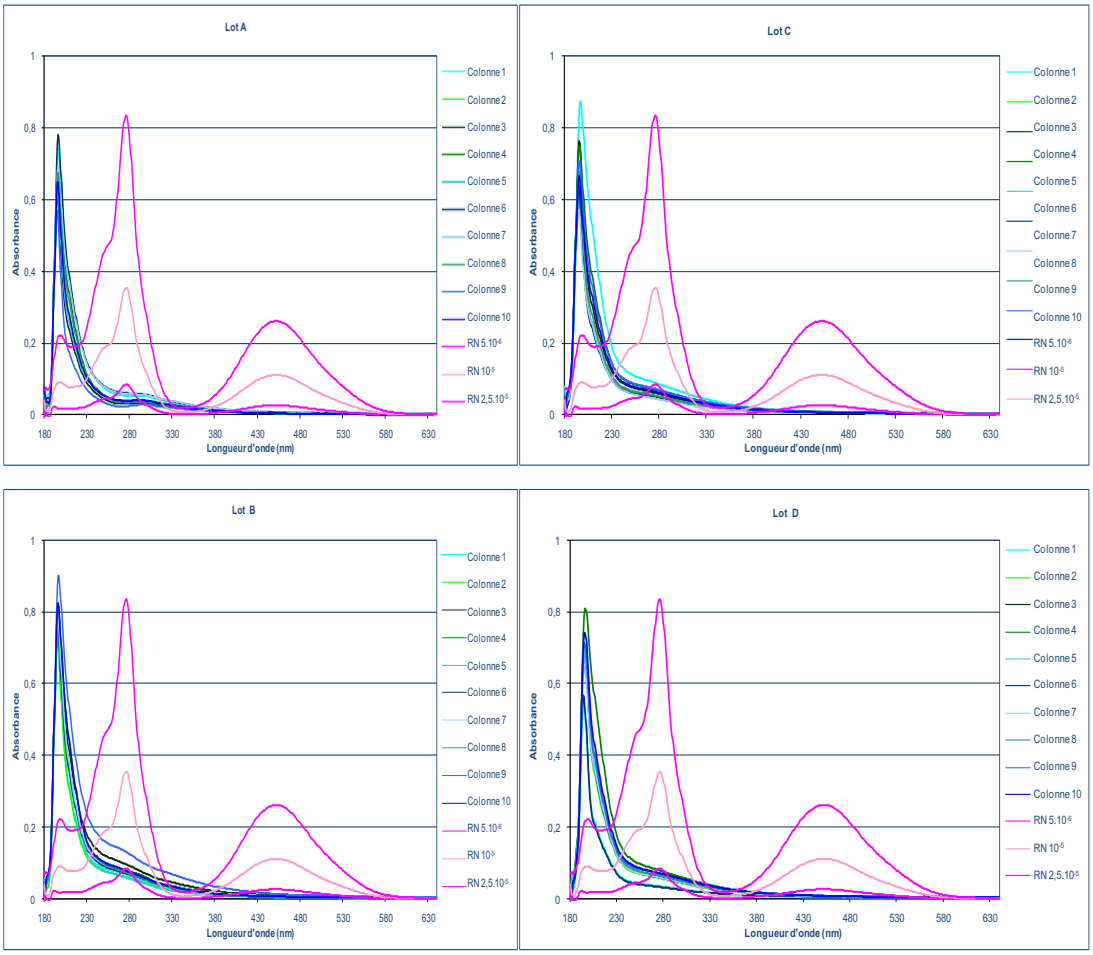


Figure 29 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible de filtrats de solutions de RN après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-25

Chaque lot comprend 10 filtrats différents. Les lots A et B correspondent aux filtrats d'une solution à 10^{-4} mol.L^{-1} et les lots C et D correspondent aux filtrats d'une solution à 10^{-3} mol.L^{-1}. Sur chaque graphique, sont représentés les spectres de solutions de RN non filtrées (concentrations exprimées en mol.L^{-1}) pour comparaison.

Concentration des solutions de RN filtrées	A à 276 nm	C estimée	TR (%)	A à 456 nm	C estimée	TR (%)
10^{-4} mol.L^{-1}						
lot A (n = 10)	0,042 ± 0,012	(1,57 ± 0,45).10^{-5}	**84,3 ± 4,5**	0,005 ± 0,001	(5,65 ± 1,00).10^{-7}	**99,4 ± 0,1**
lot B (n = 10)	0,079 ± 0,021	(2,95 ± 2,72).10^{-5}	**70,5 ± 7,8**	0,007 ± 0,002	(7,74 ± 2,72).10^{-7}	**99,2 ± 0,3**
10^{-3} mol.L^{-1}						
lot C (n = 10)	0,060 ± 0,014	(2,26 ± 0,51).10^{-5}	**97,7 ± 0,5**	0,006 ± 0,001	(7,32 ± 0,93).10^{-7}	**99,9 ± 0,0**
lot D (n = 10)	0,059 ± 0,015	(2,20 ± 10,55).10^{-5}	**97,8 ± 0,6**	0,007 ± 0,001	(7,86 ± 1,13).10^{-7}	**99,9 ± 0,0**

Tableau 13 : Taux de rétention de solutions de RN à 10^{-4} et 10^{-3} mol.L^{-1} par les colonnes de Séphadex™ G-10

Les moyennes des absorbances obtenues aux longueurs maximales d'absorption du RN, i.e 276 nm et 456 nm, ainsi que les moyennes des concentrations résiduelles estimées dans les filtrats et les moyennes des taux de rétention sont représentées, pour chaque lot, dans ce tableau. Les concentrations ont été estimées grâce à l'Équation 3 (Loi de Beer-Lambert) et les taux de rétention ont été calculés grâce à l'Équation 4.

1.2.4 Contrôle de la fonctionnalité des colonnes : Non rétention du HCoV 229E

Afin de compléter l'évaluation fonctionnelle des colonnes, il fallait s'assurer que le virus n'était pas retenu par les colonnes ou tout du moins que la différence entre les titres viraux n'excédait pas 0,5 $\log_{10}$ sans filtration et après filtration de la suspension virale sur les colonnes, selon les recommandations de la norme NF EN 14476+A1. Des essais (n = 6 pour chaque type de colonne) ont donc été menés en parallèle en titrant le HCoV 229E sans filtration et après filtration. Le titre moyen obtenu sur les différents pools de virus utilisés lors de cette étude était de $(4,2 \pm 2,9).10^6$ particules infectieuses/mL. Pour titrer le virus après filtration, 500 µL de suspension virale ont été déposés en haut des colonnes puis après une centrifugation à 405*xg*, les filtrats ont été déposés dans des plaques 96 puits en réalisant une dilution sériée puis les titres viraux ont été évalués (Matériels et Méthodes, 2.3, p.114). Les résultats sont consignés dans le Tableau 14 et ont confirmé la non rétention du HCoV 229E par les colonnes de Séphadex™ G-25 et G-10. Les différences observées étaient en effet de 0,3 et de 0,2 $\log_{10}$ pour les colonnes Séphadex™ G-25 et G-10, respectivement. De plus, ces expériences ont permis d'établir que cette méthode ne créait pas d'interférence sur le pouvoir infectieux du virus.

Cependant, un certain nombre d'essais ont été nécessaires, mettant en évidence l'importance du pH lors du titrage du HCoV 229E. Il a en effet été montré que les coronavirus sont très sensibles au pH. Ils montrent une certaine stabilité à pH 6 mais le pouvoir infectieux est fortement réduit à pH 8 par phénomène d'agrégation (Bibliographie, (Sturman L.S.*, et al.*, 1990)3.8.3, p.94). Or deux paramètres présentaient une variabilité de pH : l'eau osmosée stérile, dans laquelle était diluée la suspension virale, et les gels de Séphadex™.

Contrôle de la non rétention du HCoV par les colonnes de Séphadex™ G-25 et G10			
Séphadex™	Titre viral sans filtration ($\log_{10}$)	Titre viral après filtration ($\log_{10}$)	**Différence ($\log_{10}$)**
G-25 (n = 6)	6,0 ± 0,6	5,8 ± 0,6	**0,3 ± 0,2**
G-10 (n = 6)	6,3 ± 0,8	6,4 ± 0,9	**0,2 ± 0,2**

Tableau 14 : Contrôle de la non rétention du HCoV 229E par les colonnes de Séphadex™ G-25 et G-10

La stérilisation par autoclavage peut en effet induire une acidification de l'eau alors qu'une quantité insuffisante de solution tampon, i.e. PBS, lors de la mise en suspension des gels de Séphadex™ peut conduire à un pH basique (pH environ à 8). Ces facteurs expliquaient les premiers résultats disparates qui avaient été obtenus.

Par la suite, tous les pH ont été vérifiés extemporanément. Le pH acide de l'eau a été neutralisé par ajout de $NaHCO_3$ à 7,5% (m/v) et les gels de Séphadex™ ont été mis en suspension dans une quantité suffisante de PBS sous agitation magnétique pour atteindre un pH neutre.

2 Activité ATS-D de molécules de référence (CHX et HXM) sur le HCoV 229E

2.1 Choix des molécules de référence

Avant d'arrêter notre choix sur la CHX et l'HXM comme molécules de référence, d'autres molécules utilisées comme ATS-D ont été évaluées.

2.1.1 La polyvinylpyrrolidone iodée ou PVP-I

La PVP-I aurait pu être une molécule intéressante pour tester nos colonnes de Séphadex™ G-25. La PVP-I est un iodophore, c'est-à-dire un complexe organique polymérique permettant de fixer et de solubiliser l'iode (Bibliographie, 1.6.4.1, p.34). Le monomère, de masse moléculaire 364,94 $g.mol^{-1}$, est représenté dans la Figure 30 et sa polymérisation donne lieu à des polymères de masse moléculaire élevée. Cependant, sa nature colorée perturbait drastiquement les tests de viabilité et les rendait ininterprétables. Nous n'avons ainsi pas pu évaluer la toxicité de la PVP-I sur les cellules L-132. De ce fait, nous ne l'avons pas choisie comme molécule de référence pour valider notre protocole.

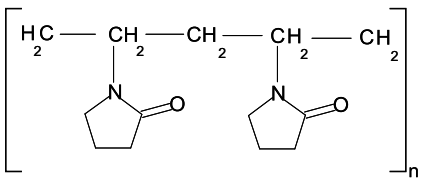


Figure 30 : Monomère de la polyvinylpyrrolidone

2.1.2 L'hypochlorite de sodium

L'hypochlorite de sodium ou eau de javel, de formule brute HOCl et de masse moléculaire 74,4 $g.mol^{-1}$, n'a pas été retenue non plus, du fait de sa faible masse moléculaire. Cette dernière est en effet est en-dehors des limites de rétention de nos colonnes de Séphadex™ ; les colonnes de Séphadex™ G-10 peuvent en théorie retenir des molécules de masse moléculaire de 100 à 1000 $g.mol^{-1}$.

2.1.3 Le glutaraldéhdye

Le glutaraldéhyde aurait également pu être un candidat attrayant. De masse moléculaire 100,13 $g.mol^{-1}$ et de formule brute $C_5H_8O_2$ (Figure 31), il a été utilisé dans la désinfection des surfaces et des instruments, notamment en milieu hospitalier. Cependant, depuis une circulaire de 2001 publiée au Bulletin Officiel (DGS/DHOS (Direction Générale de la Santé et Direction de l'Hospitalisation et de l'Organisation de Soins), 2001), le glutaraldéhyde n'est plus recommandé dans la désinfection des instruments thermosensibles de type endoscopes car il est susceptible de fixer le pouvoir infectieux des prions par polymérisation protéique (Bibliographie, 1.6.7.2, p.43). Il a été néanmoins démontré dans des études plus récentes, une activité partielle du glutaraldéhyde sur le prion, comparable à celle de l'acide peracétique, actuellement recommandé pour la désinfection des instruments thermosensibles (Vadrot C. et Darbord J.C., 2006). De plus, son activité à 2% (v/v) sur le HCoV 229E (réduction supérieure à 3 log_{10} en 1 min) avait été démontré lors d'une étude antérieure (Sattar S.A*., et al.*, 1989).

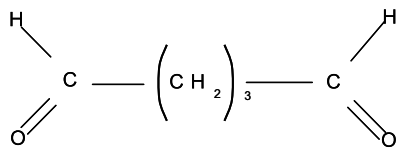
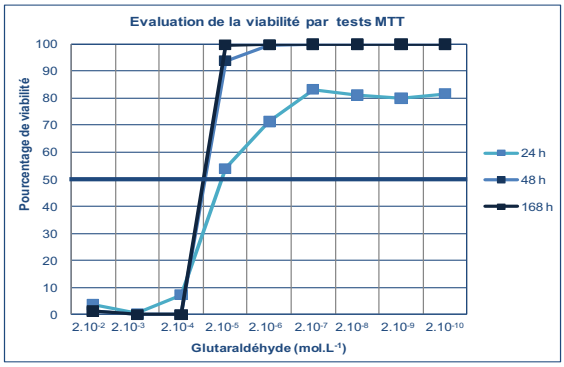


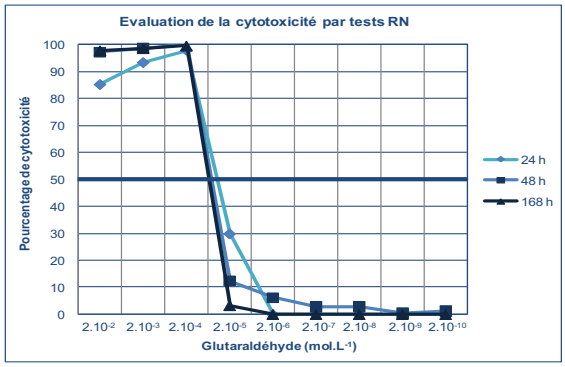
Figure 31 : Glutaraldéhyde

Dans un premier temps, la toxicité du glutaraldéhyde a été évaluée sur les cellules L-132 par les tests MTT et RN (Matériels et Méthodes, 2.4, p.116) puis, dans un second temps, la toxicité d'une solution de glutaraldéhyde à 2% (v/v) après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-10 (Figure 32).

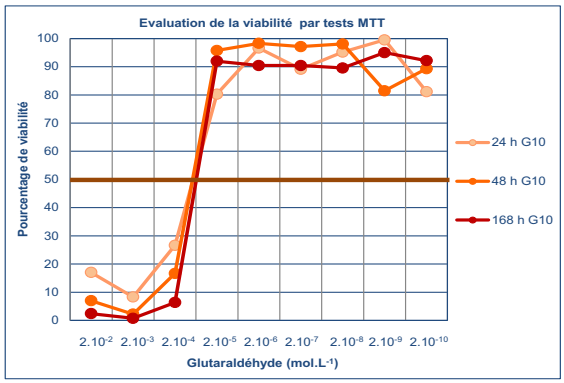
L'observation des graphiques obtenus révèle une non rétention du glutaraldéhyde à 2% (v/v) (soit 0,2 mol.L^{-1}) ou tout du moins, la non élimination de sa cytotoxicité. En effet, que ce soit dans les tests MTT et/ou RN, il n'existait pas de différence significative dans les pourcentages de viabilité et/ou de

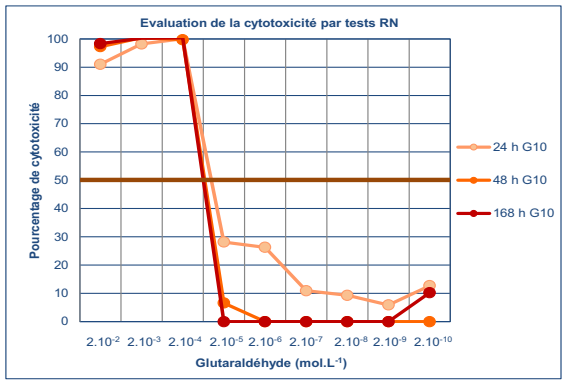
A) Evaluation de la toxicité du glutaraldéhyde sur les cellules L-132 par des tests MTT et RN





B) Evaluation de la toxicité d'une solution de glutaraldéhyde à 2% (m/v) après filtration sur Séphadex™ G-10





C) CI_{50} et CC_{50} (exprimées en mol.L^{-1}) du glutaraldéhyde sur cellules L-132 sans filtration et après filtration d'une solution à 2% m/v soit 0,2 mol.L^{-1} sur Séphadex™ G-10

	CI_{50}			CC_{50}		
	24 h	48 h	168 h	24 h	48 h	168 h
Glutaraldéhyde (n = 1)	**$3{,}5.10^{-4}$**	**$1{,}0.10^{-3}$**	**$1{,}1.10^{-3}$**	**$7{,}3.10^{-4}$**	**$9{,}7.10^{-4}$**	**$1{,}1.10^{-3}$**
Solution de glutaraldéhyde à 2% (m/v) après filtration sur Séphadex™ G-10 (n = 1)	$1{,}2.10^{-3}$	$1{,}2.10^{-3}$	$1{,}1.10^{-3}$	$7{,}5.10^{-4}$	$1{,}0.10^{-3}$	$1{,}1.10^{-3}$

Figure 32 : Evaluation de la toxicité du glutaraldéhyde sur les cellules L-132 sans filtration et après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-10

A : Représentation de la viabilité des cellules L-132 estimée par test MTT en présence de glutaraldéhyde et de la cytotoxicité, estimée par test au RN, induite par le glutaraldéhyde sur les cellules L-132 pour des temps d'incubation de 24 h, 48 h et 168 h. B : Représentation de la viabilité des cellules L-132 estimée par test MTT et de la cytotoxicité estimée par test au RN, en présence d'une solution de glutaraldéhyde à 2% (v/v) après filtration sur Séphadex™ G-10, pour des temps d'incubation de 24 h, 48 h et 168 h. Les concentrations indiquées en abscisse correspondent aux concentrations théoriques si la solution n'est absolument pas retenue. C : CI_{50} et CC_{50} caractéristiques du glutaraldéhyde sur les cellules L-132 et obtenues lors des tests représentés en A et B.

cytotoxicité obtenus avec et sans filtration sur Séphadex™ G-10. Ces résultats étaient également illustrés par les CI_{50} (Figure 32C) obtenues sans filtration à 24 h, 48 h et 168 h, i.e. $3{,}5.10^{-4}$; $1{,}0.10^{-3}$; $1{,}1.10^{-3}$ mol.L^{-1}, respectivement et après filtration, pour les mêmes temps de contact, soit $1{,}2.10^{-3}$; $1{,}2.10^{-3}$ et $1{,}1.10^{-3}$ mol.L^{-1}.

Les CC_{50} ne présentaient pas non plus de différence significative sans filtration à 24 h, 48 h et 168 h, où elles étaient de $7{,}3.10^{-4}$; $9{,}7.10^{-4}$; $1{,}1.10^{-3}$ mol.L^{-1} et après filtration sur Séphadex™ G-10, où leurs valeurs étaient de $7{,}5.10^{-4}$; $1{,}0.10^{-3}$; $1{,}1.10^{-3}$ mol.L^{-1}, respectivement, pour les mêmes temps de contact.
Le glutaraldéhyde se trouvant à la limite inférieure de la capacité de rétention de la Séphadex™ G-10, les tests n'ont pas été poursuivis avec cette molécule ni réalisés en triplicat, par souci d'économie.

2.1.4 Le cétrimide

Une autre possibilité aurait pu être le cétrimide. Ce dernier appartient à la grande famille des ammoniums quaternaires et est constitué d'un mélange de bromure de cétrimonium ou bromure de cétyl-triméthyl-ammonium, de formule brute $C_{19}H_{42}BrN$ et de masse moléculaire 364,48 g.mol^{-1} (Figure 33), composé majoritaire, et en quantité moindre de dodécyl-triméthyl-ammonium.

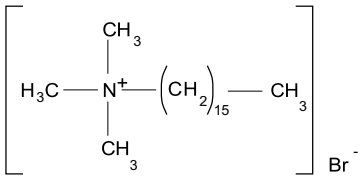


Figure 33 : Bromure de cétrimonium

Le cétrimide nous avait intéressés du fait de son association fréquente avec la CHX. Sattar et coll. ont réalisé une étude en utilisant des tests de virucidie sur support (disque en acier inoxydable) et une méthode de neutralisation chimique. Ils ont démontré, qu'après un temps de contact d'une minute, une solution de CHX (0,008% m/v soit $8{,}9.10^{-6}$ mol.L^{-1}, pH 5) et de cétrimide (0,08% m/v) était inactive sur le HCoV 229E. Cependant, après le même temps de contact, une solution de CHX (0,05% m/v soit $5{,}6.10^{-4}$ mol.L^{-1}, pH 4,5), de cétrimide (0,5% m/v) et d'éthanol (70% v/v) avait montré une activité ATS sur le HCoV 229E. Le critère d'efficacité suivait les recommandations Américaines soit une diminution de 3 $\log_{10}$ du titre viral (Sattar S.A*., et al.*, 1989). L'éthanol ayant une masse moléculaire trop faible pour être testé sur nos colonnes (46,1 g.mol^{-1}), il nous avait paru attrayant de

pouvoir discriminer les activités ATS antivirales respectives de la CHX et du cétrimide en utilisant notre protocole.

2.1.4.1 Toxicité du cétrimide sur les cellules L-132

Dans un premier temps, l'éventuelle toxicité du cétrimide sur les cellules L-132 a été évaluée. Des tests MTT et RN (Matériels et Méthodes, 2.4, p.116) ont été mis en œuvre par dépôt et dilution sériée d'une solution à 0,5% (m/v) sur des cellules L-132 à environ 40% de confluence. Ces tests ont été réalisés en duplicat et chaque test comprenait une mesure spectrophotométrique à 24 h, à 48 h et à 168 h. Ils sont représentés dans la Figure 34A. Les CI_{50} et les CC_{50} sont représentées dans la Figure 34C. Les CI_{50} du cétrimide sur les cellules L-132 étaient de $(2,0 \pm 0,0).10^{-4}$, $(2,1 \pm 0,5).10^{-5}$ et de $(2,8 \pm 0,4).10^{-5}$% (m/v) à 24 h, 48 h et 168 h, respectivement. Les CC_{50} étaient quant à elles égales à $(1,7 \pm 2,3).10^{-5}$, $(1,9 \pm 0,9).10^{-5}$ et de $(2,9 \pm 0,1).10^{-5}$% (m/v) pour les mêmes temps d'incubation. Le cétrimide présentait donc une cytotoxicité sur les cellules L-132 de l'ordre de 10^{-5}% (m/v) que ce soit pour les CI_{50} ou les CC_{50}.

2.1.4.2 Cytotoxicité du cétrimide après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-10

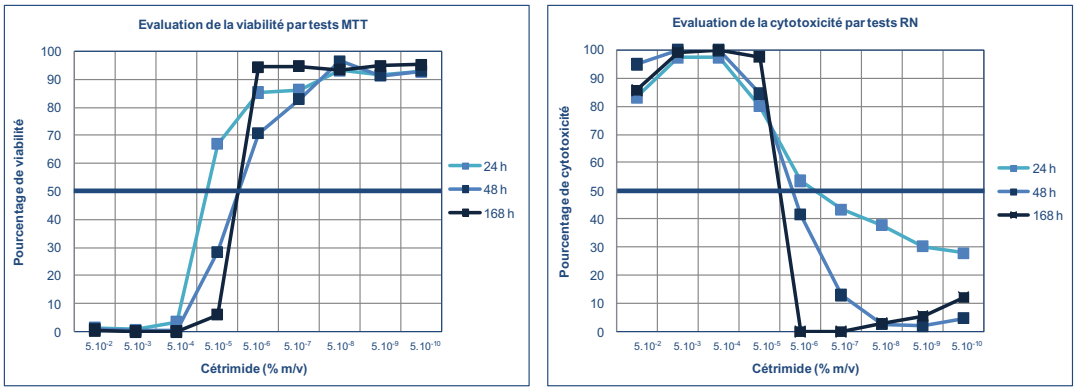
Le cétrimide étant le plus souvent utilisé à 0,5% (m/v) dans les formulations commerciales type Cetavlon®, la toxicité d'une solution de cétrimide à 0,5% (m/v) après filtration sur Séphadex™ G-10 a été évaluée. Les résultats sont représentés dans la Figure 34B et C. Ils mettaient en évidence que la cytotoxicité du cétrimide n'était pas supprimée par la filtration sur Séphadex™ G-10, avec des CI_{50} et des CC_{50}, équivalentes à celles obtenues sans filtration (Figure 34C). Les CI_{50} du cétrimide à 0,5% (m/v) après filtration étaient de $(1,7 \pm 1,4).10^{-4}$, $(1,2 \pm 1,1).10^{-5}$ et de $(3,6 \pm 1,3).10^{-5}$% (m/v) à 24 h, 48 h et 168 h, respectivement. Les CC_{50} étaient de $(4,1 \pm 5;8).10^{-5}$, $(5,6 \pm 4,6).10^{-5}$ et de $(2,2 \pm 1,5).10^{-5}$% (m/v) pour les mêmes temps d'incubation.

La toxicité d'une solution de cétrimide à 0,05% (m/v), après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-10, a également été estimée, dans les mêmes conditions que précédemment. Les graphiques correspondants, très proches de ceux précédemment obtenus, n'ont pas été représentés pour plus de lisibilité. Nous avons tout de même rapporté les CI_{50} et les CC_{50} obtenus lors de ces tests. Ces dernières, de l'ordre de 5.10^{-5}% (m/v), ont révélé qu'une solution de cétrimide, même à une concentration de 0,05% (m/v), ne semblait pas retenue par nos colonnes de Séphadex™ G-10 ou tout du moins, la cytotoxicité n'était pas éliminée. Comme dans le cas du glutaraldéhyde, l'expérience n'a pas été réalisée en triplicat vu son faible intérêt. Le cétrimide n'a donc pas été retenu comme

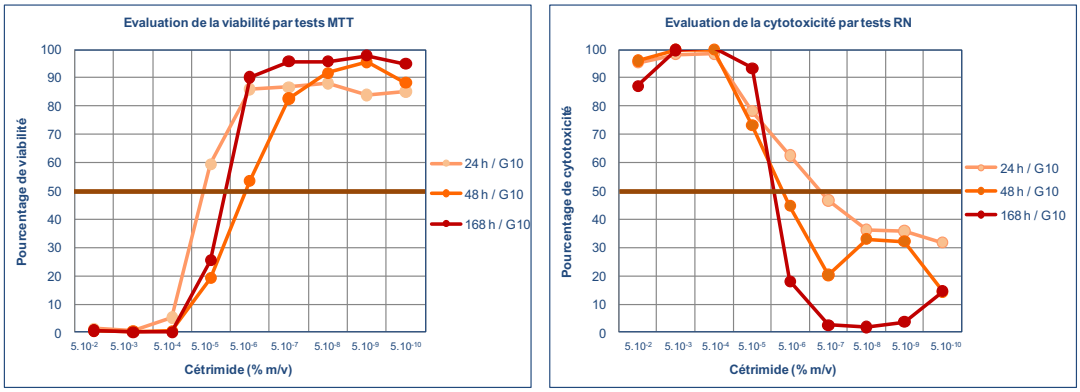
molécule de référence pour valider notre protocole et nous ne sommes pas allés plus avant dans l'étude de cette molécule.

Suite à ces résultats, nous avons testé la CHX et HXM ; les résultats obtenus, beaucoup plus satisfaisants que les précédents, sont présentés dans les sections suivantes (Résultats, 2.2, p.152 et 2.3, p.166).

A) Evaluation de la toxicité du cétrimide sans filtration



B) Evaluation de la toxicité d'une solution de cétrimide à 0,5% (m/v) après filtration sur Séphadex™ G-10



C) Moyennes des CI_{50} et CC_{50} (exprimées en % (m/v)) obtenues lors des tests MTT et RN décrits en A et B

	CI_{50}		
	24 h	48 h	168 h
Cétrimide (n= 2)	**$(2,0 \pm 0,0).10^{-4}$**	**$(2,1 \pm 0,5).10^{-5}$**	**$(2,8 \pm 0,4).10^{-5}$**
Cétrimide à 0,5% / Séphadex™ G-10 (n = 3)	$(1,7 \pm 1,4).10^{-4}$	$(1,2 \pm 1,1).10^{-5}$	$(3,6 \pm 1,3).10^{-5}$
Cétrimide à 0,05% / Séphadex™ G-10 (n = 1)	$4,5.10^{-5}$	$2,6.10^{-5}$	$2,2.10^{-5}$

	CC_{50}		
	24 h	48 h	168 h
Cétrimide (n= 2)	**$(1,7 \pm 2,3).10^{-5}$**	**$(1,2 \pm 0,9).10^{-5}$**	**$(2,9 \pm 0,1).10^{-5}$**
Cétrimide à 0,5% / Séphadex™ G-10 (n = 3)	$(4,1 \pm 5,8).10^{-4}$	$(5,6 \pm 4,6).10^{-5}$	$(2,2 \pm 1,5).10^{-5}$
Cétrimide à 0,05% / Séphadex™ G-10 (n = 1)	$7,7.10^{-5}$	$2,5.10^{-5}$	$2,3.10^{-5}$

Figure 34 : Evaluation de la toxicité du cétrimide sur cellules L-132 sans filtration et après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-10

A : Evaluation de la toxicité du cétrimide sans filtration sur cellules L-132. L'expérience a été réalisée en double. Les courbes représentent les moyennes des % de viabilité et de cytotoxicité obtenues aux différents temps d'incubation (24 h, 48 h et 168 h). **B** : Evaluation de la toxicité sur cellules L-132 d'une solution de cétrimide à 0,5% (m/v) après filtration sur colonnes de Séphadex™
G-10. L'expérience a été réalisée en triplicat. Les courbes représentent les moyennes des % de viabilité et de cytotoxicité obtenues aux différents temps d'incubation (24 h, 48 h et 168 h). En **C,** sont représentées les moyennes des CI_{50} et des CC_{50} obtenues dans les tests décrits en A et en B et dans les tests au MTT et au RN d'une solution de cétrimide à 0,05% (m/v) après filtration sur Séphadex™ G-10.

2.2 Evaluation de l'activité ATS-D anti-coronavirus de la CHX

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

Cytotoxicité de la CHX sur cellules L-132

Comme pour les molécules précédentes, la cytotoxicité de la CHX a tout d'abord été évaluée, sur les cellules L-132, par les tests MTT et RN (Matériels et Méthodes, 2.4, p.116). Dans un premier temps, une gamme de concentrations de 10^{-3} à 10^{-11} mol.L^{-1} a été mise en œuvre afin d'avoir une idée globale des CI_{50} et des CC_{50} de la CHX sur les cellules L-132.

Une gamme de concentrations plus précises, i.e. de 5.10^{-5} à 5.10^{-7} mol.L^{-1}, a par la suite été réalisée. L'expérience a été réalisée en duplicat. Les moyennes des pourcentages de viabilité et de cytotoxicité obtenues sont représentées dans les Figure 35 et Figure 36.

Les résultats étant très similaires et reproductibles, seuls les résultats de la deuxième gamme sont représentés dans les graphiques. Cependant, les CI_{50} et CC_{50} spécifiées dans le Tableau 15 tiennent compte des deux gammes. Au cours de ces expériences, une variabilité dans la croissance cellulaire a pu être observée. Cette variabilité, affectant l'ensemble de l'expérience, n'altérait cependant pas la reproductibilité du calcul des CI_{50} et CC_{50}, résultant d'un rapport entre les absorbances mesurées dans le témoin cellule et les absorbances mesurées dans les puits contenant les cellules en contact avec la CHX. Les CI_{50} de la CHX sur les cellules L-132 étaient de $(4,3 \pm 0,6).10^{-6}$; $(2,4 \pm 1,3).10^{-6}$ et $(3,9 \pm 0,2).10^{-6}$ mol.L^{-1} à 24 h ; 48 h et 168 h respectivement. Les CC_{50} avaient des valeurs très proches, i.e. $(6,0 \pm 1,3).10^{-6}$; $(3,0 \pm 1,3).10^{-6}$ et $(3,5 \pm 0,3).10^{-6}$ mol.L^{-1} à 24 h ; 48 h et 168 h, respectivement.

Cytotoxicité de la CHX après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-25

La cytotoxicité de solutions de CHX à différentes concentrations, i.e. 10^{-4}, 10^{-3} et 10^{-2} mol.L^{-1} après filtration sur Séphadex™ G-25 a ensuite été évaluée. Les moyennes des pourcentages de viabilité et de cytotoxicité obtenues sont représentées dans les Figure 35 et Figure 36. Pour chaque concentration testée, les expériences ont été répétées trois fois.

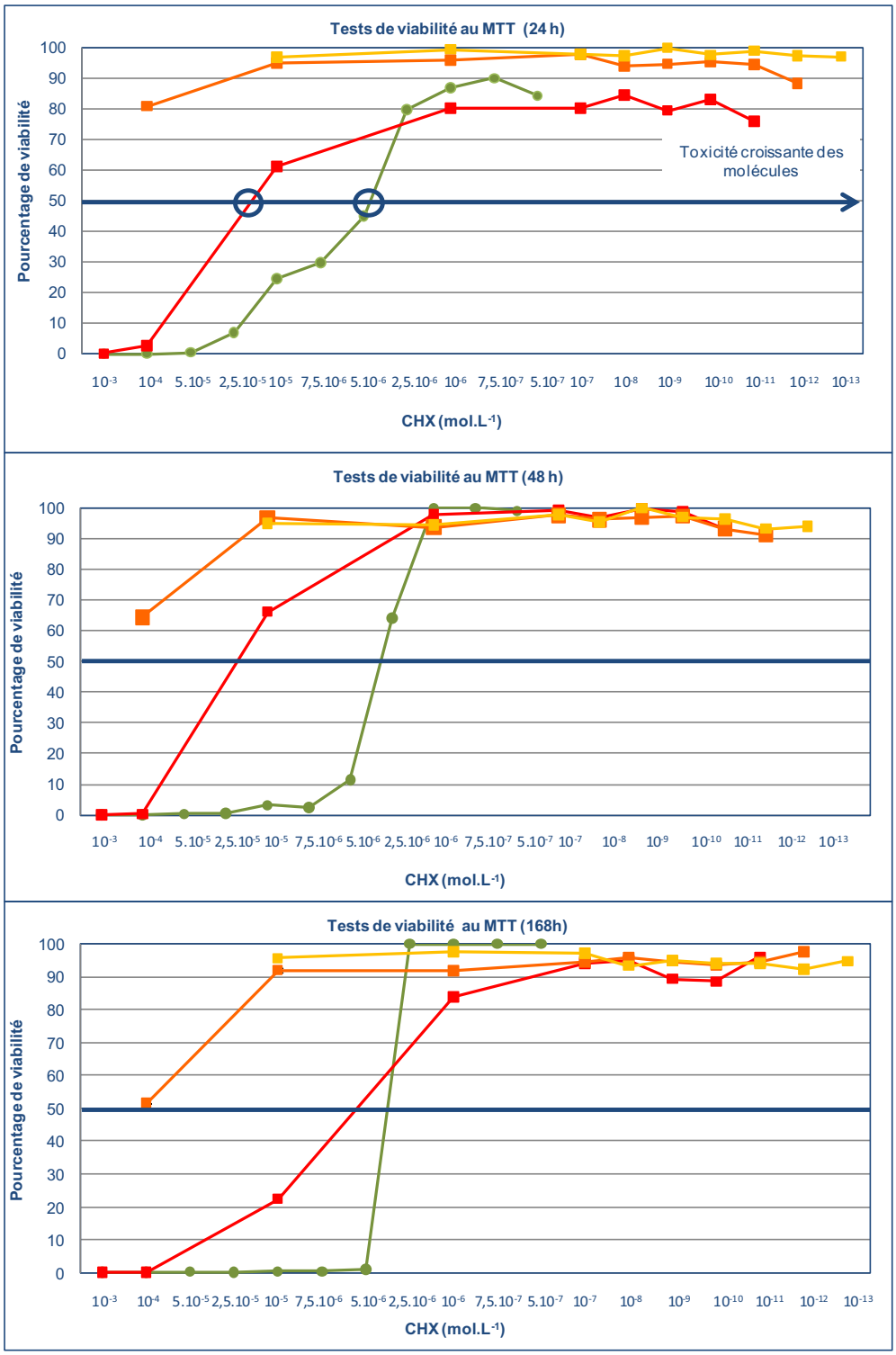


Figure 35 : Evaluation de la viabilité cellulaire en présence de CHX non filtrée et après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-25

Les graphiques représentent les moyennes des % de viabilité des cellules obtenus, grâce aux tests MTT, en présence de CHX non filtrée et filtrée, aux différents temps d'incubation 24 h, 48 h et 168 h. représente les moyennes (n = 2) des % de viabilité obtenus avec la CHX sans filtration, gamme de 5.10^{-5} à 5.10^{-7} mol.L^{-1}. , et représentent les moyennes (n = 3) des % de viabilité obtenus avec des solutions de CHX à 10^{-2}, 10^{-3} et 10^{-4} mol.L^{-1}, respectivement, après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-25. Les concentrations en abscisse correspondent aux concentrations théoriques si la CHX n'était absolument pas retenue.

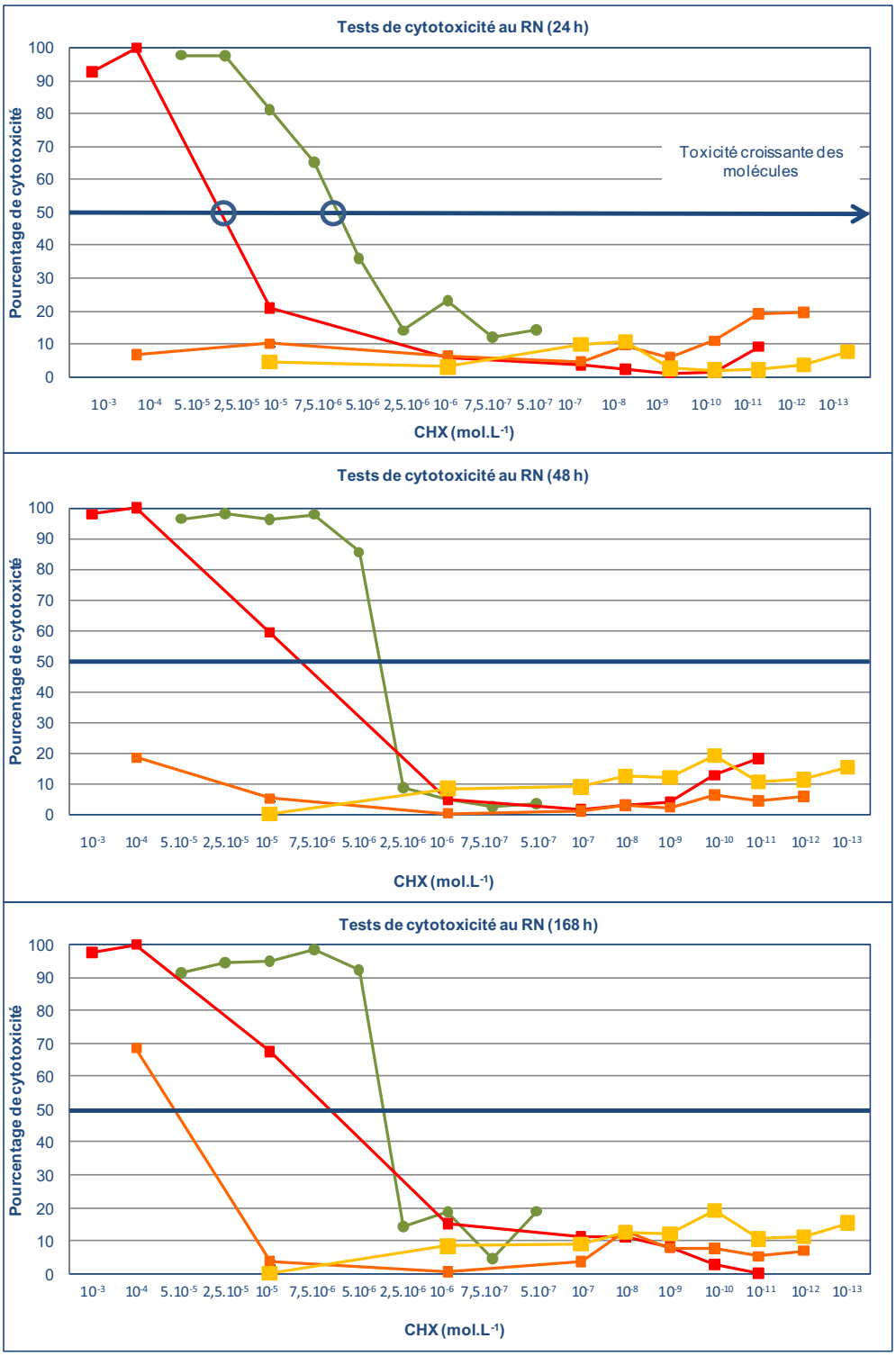


Figure 36 : Evaluation de la cytotoxicité induite sur les cellules L-132 par la CHX non filtrée et après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-25

Les graphiques représentent les moyennes des % de cytotoxicité obtenus, grâce aux tests RN, en présence de CHX non filtrée et filtrée, aux différents temps d'incubation 24 h, 48 h et 168 h. représente les moyennes (n = 2) des % de cytotoxicité obtenus avec la CHX sans filtration, gamme de 5.10^{-5} à 5.10^{-7} mol.L^{-1}. , et représentent les moyennes (n = 3) des % de cytotoxicité obtenus avec des solutions de CHX à 10^{-2}, 10^{-3} et 10^{-4} mol.L^{-1}, respectivement, après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-25. Les concentrations en abscisse correspondent aux concentrations théoriques si la CHX n'était absolument pas retenue.

La solution à 10^{-4} mol.L^{-1} 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%. Les CI_{50} et les CC_{50} étaient toutes supérieures à 10^{-5} mol.L^{-1}, seule valeur accessible dans les conditions de l'expérience. En effet, 10 µL de filtrat étaient déposés dans chaque puits de la colonne 3 (dilution au 1/10ème du filtrat) puis une dilution sériée était ensuite réalisée. Cela induisait que la concentration la plus forte testée (dans la colonne 3) était de 10^{-5} mol.L^{-1}, sachant qu'il s'agissait des concentrations théoriques dans le cas où la CHX n'était absolument pas retenue par les colonnes de Séphadex™ G-25.

La filtration de solutions à 10^{-3} mol.L^{-1} sur colonnes de Séphadex™ G-25 a donné également de bons résultats, les CI_{50} et les CC_{50} étaient > 10^{-4} mol.L^{-1}. Cependant, une toxicité résiduelle a été observée dans certains tests : une CI_{50} à $7{,}9.10^{-5}$ mol.L^{-1} à 48 h dans le premier test et une CI_{50} à $5{,}5.10^{-5}$ mol.L^{-1} à 168 h dans le troisième test ont en effet été constatée. 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^{-1} (Tableau 15). Ainsi, malgré une diminution d'environ 1 $\log_{10}$ 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^{-1} après filtration sur les colonnes de Séphadex™ G-25.

		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^{-1} / 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^{-1} / 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^{-1} / G25 (n= 3)		$>10^{-5}$	$>10^{-5}$	$>10^{-5}$	$>10^{-5}$	$>10^{-5}$	$>10^{-5}$

Tableau 15 : Moyennes des CI_{50} et des CC_{50} obtenues pour la CHX non filtrée et après filtration sur les cellules L-132

Les moyennes des CI_{50} et des CC_{50} obtenues pour la CHX non filtrée sont représentées ci-dessus. Elles incluent les CI_{50} et les CC_{50} obtenues pour la 1ère gamme de 10^{-3} à 10^{-11} mol.L^{-1} (n = 1) et pour la 2ème gamme de 5.10^{-5} à 5.10^{-7} mol.L^{-1} (n = 2). Les moyennes des CI_{50} et des CC_{50} obtenues avec les solutions de CHX à 10^{-2} et 10^{-4} mol.L^{-1} après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-25 sont également représentées. Pour les solutions à 10^{-3} mol.L^{-1}, les CI_{50} et les CC_{50} obtenues sont détaillées pour plus de précision.

Les résultats de ces expériences sont représentés dans les Figure 35 et Figure 36. A la lecture des graphiques, une toxicité de ces filtrats était nettement visible sur les cellules L–132.

Cependant, le déplacement des courbes, 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^{-1} par les colonnes de Séphadex™ G-25. Les moyennes des CI_{50} obtenues étaient $(2,5 \pm 2,3).10^{-5}$, $(3,0 \pm 1,5).10^{-5}$ et $(1,4 \pm 1,6).10^{-5}$ mol.L^{-1} à 24 h, 48 h et 168 h respectivement. Les moyennes des CC_{50} étaient, quant à elles, égales à $(4,2 \pm 0,5).10^{-5}$, $(2,1 \pm 2,5).10^{-5}$ et $(2,1 \pm 2,9).10^{-5}$ mol.L^{-1} à 24 h, 48 h et 168 h respectivement (Tableau 15). Un $\log_{10}$ de différence par rapport aux CI_{50} et aux CC_{50} obtenues 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^{-1}, i.e. une surcharge des colonnes qui ne pourraient pas retenir l'ensemble des molécules en cas de concentration élevée.

2.2.2 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, le taux de rétention de la CHX a été quantifié 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.

Lors de la réalisation de ces spectres dans l'UV-visible, différents facteurs doivent être pris en considération pour obtenir des résultats fiables et reproductibles. La température ambiante représente notamment une variable importante. En effet, une forte augmentation de la température perturbe drastiquement les mesures. Par ailleurs, les modalités de nettoyage des cuves avant et après utilisation, ainsi qu'entre les mesures, peuvent influer de façon notable sur les résultats en cas de persistance du solvant utilisé pour le nettoyage.

Ainsi, après avoir obtenu des premiers résultats peu reproductibles en effectuant des rinçages à l'acétone et séchages à l'argon entre chaque mesure, les cuves ont été nettoyées avant toute manipulation avec de l'acétone et séchées à l'argon, puis entre chaque mesure les cuves ont été rincées trois fois avec l'eau osmosée stérile (solvant de référence) puis avec un peu de la solution à doser pour ne pas engendrer de dilution.

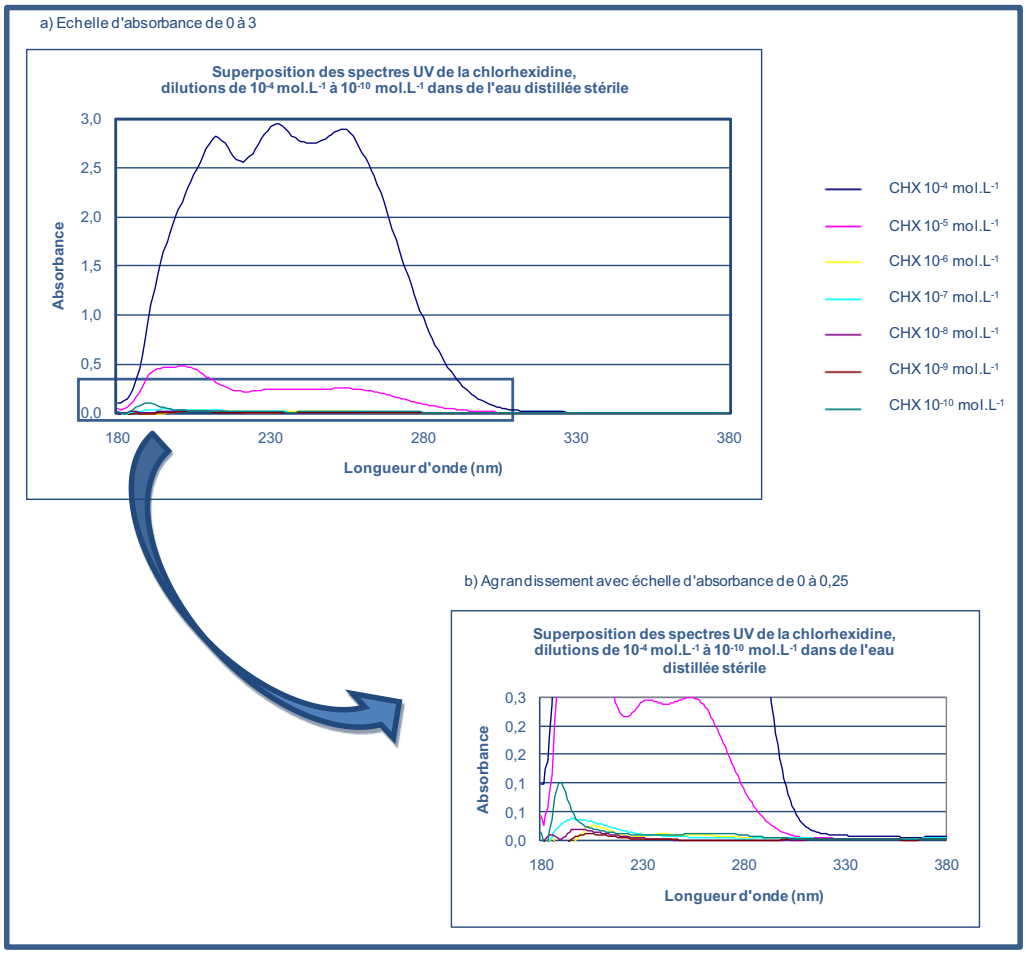


Figure 37 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible de dilutions de CHX de 10^{-4} à 10^{-10} mol.L^{-1}

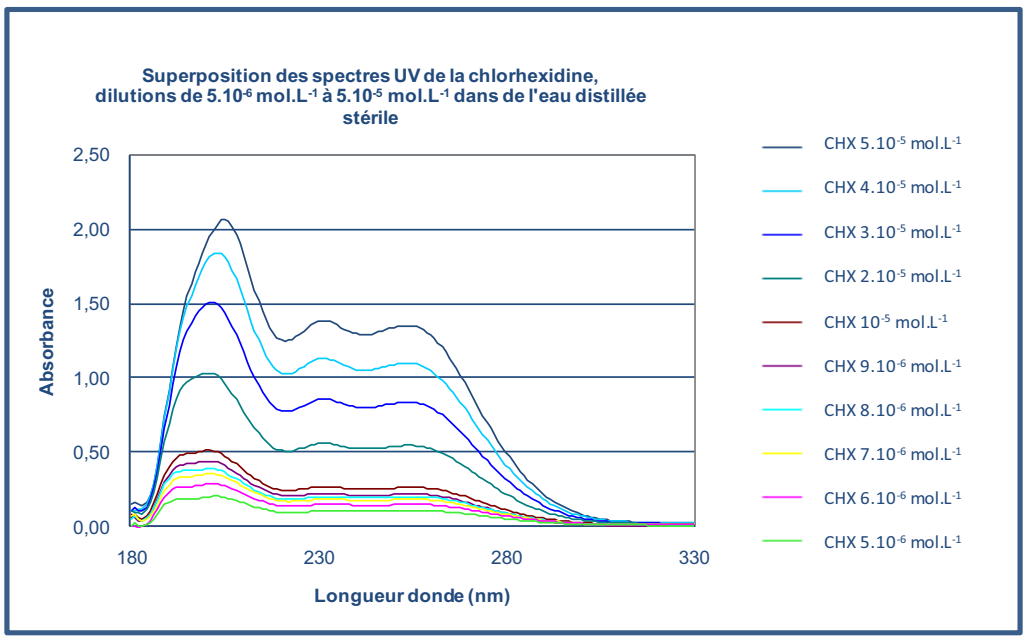


Figure 38 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible de dilutions de CHX de 5.10^{-5} à 5.10^{-6} mol.L^{-1}

2.2.2.1 Détermination des paramètres spectrophotométriques de la CHX

Avant de pouvoir estimer les taux de rétention de la CHX par les colonnes de Séphadex™, les paramètres spectrophotométriques spécifiques de la CHX ont au préalable été déterminés.
La première gamme de dilutions réalisée pour la CHX allait de 10^{-10} à 10^{-4} mol.L^{-1} pour déterminer les limites de détections inférieures et supérieures en respect de la loi de Beer-Lambert ainsi que pour avoir une première idée des longueurs d'onde d'absorption maximum. Les spectres obtenus sont représentés dans la Figure 37. La limite de détection inférieure était de 10^{-6} mol.L^{-1}. Au-dessus de 10^{-4} mol.L^{-1}, les absorbances obtenues étant proches de 3, la loi de Beer-Lambert, s'appliquant aux solutions diluées, n'était plus respectée. De ce fait, les mesures n'étaient pas valables. De plus, deux pics d'absorption maximale semblaient se détacher aux environs de 232 – 233 nm et aux environs de 253 – 255 nm, avec un coefficient d'absorption molaire proche pour les deux pics d'absorption maximale, d'environ 2,5.10^4 L.mol^{-1}.cm^{-1} (Annexe 3, 1, Tableau I).

Une deuxième gamme, plus précise, de 5.10^{-5} à 5.10^{-6} mol.L^{-1}, a ensuite été réalisée. Les spectres obtenus sont représentés dans la Figure 38. Les deux pics d'absorption maximale ont donc été déterminés avec plus de précision en faisant la moyenne des longueurs d'onde correspondant aux deux maxima d'absorption pour les différentes concentrations mesurées (Annexe 3, 1, Tableau II). Deux pics d'absorption maximale à (232 ± 1,3) nm et à (255 ± 0,72) nm ont ainsi été déterminés, ce qui était cohérent avec les données de la Pharmacopée Européenne.

Une analyse de régression simple (Matériels et Méthodes, 2.7.2, p.129) a ensuite été effectuée pour estimer les coefficients d'absorption molaires spécifiques en utilisant le logiciel Statview®. L'analyse de régression à 232 nm a permis de vérifier la linéarité de la relation A = f(c) avec un coefficient de détermination R^2 de 0,999. Le coefficient d'absorption molaire à 232 nm a donc été estimé à 2,8.10^4 L.cm^{-1}.mol^{-1} (Annexe 4, 1.1).
De la même façon, l'analyse de régression à 255 nm a montré une très forte linéarité de la relation A = f(c) avec un coefficient de détermination R^2 de 0,999. Le coefficient d'absorption molaire spécifique de la CHX à 255 nm a ainsi été estimé à 2,7.10^4 L.cm^{-1}.mol^{-1} (Annexe 4, 1.2).

2.2.2.2 Taux de rétention par les colonnes de Séphadex™ G-25

Suite à la détermination de ces paramètres, les taux de rétention de solutions de CHX à différentes concentrations par les colonnes de Séphadex™ G-25 ont été estimé (Matériels et Méthodes, 2.5, p.120). Trois concentrations de CHX ont été testées, i.e. 10^{-2}, 10^{-3} et 10^{-4} mol.L^{-1}. Chaque

concentration a été testée sur deux colonnes différentes de Séphadex™ G-25 et sur trois lots différents. Les spectres obtenus sont représentés dans la Figure 39.

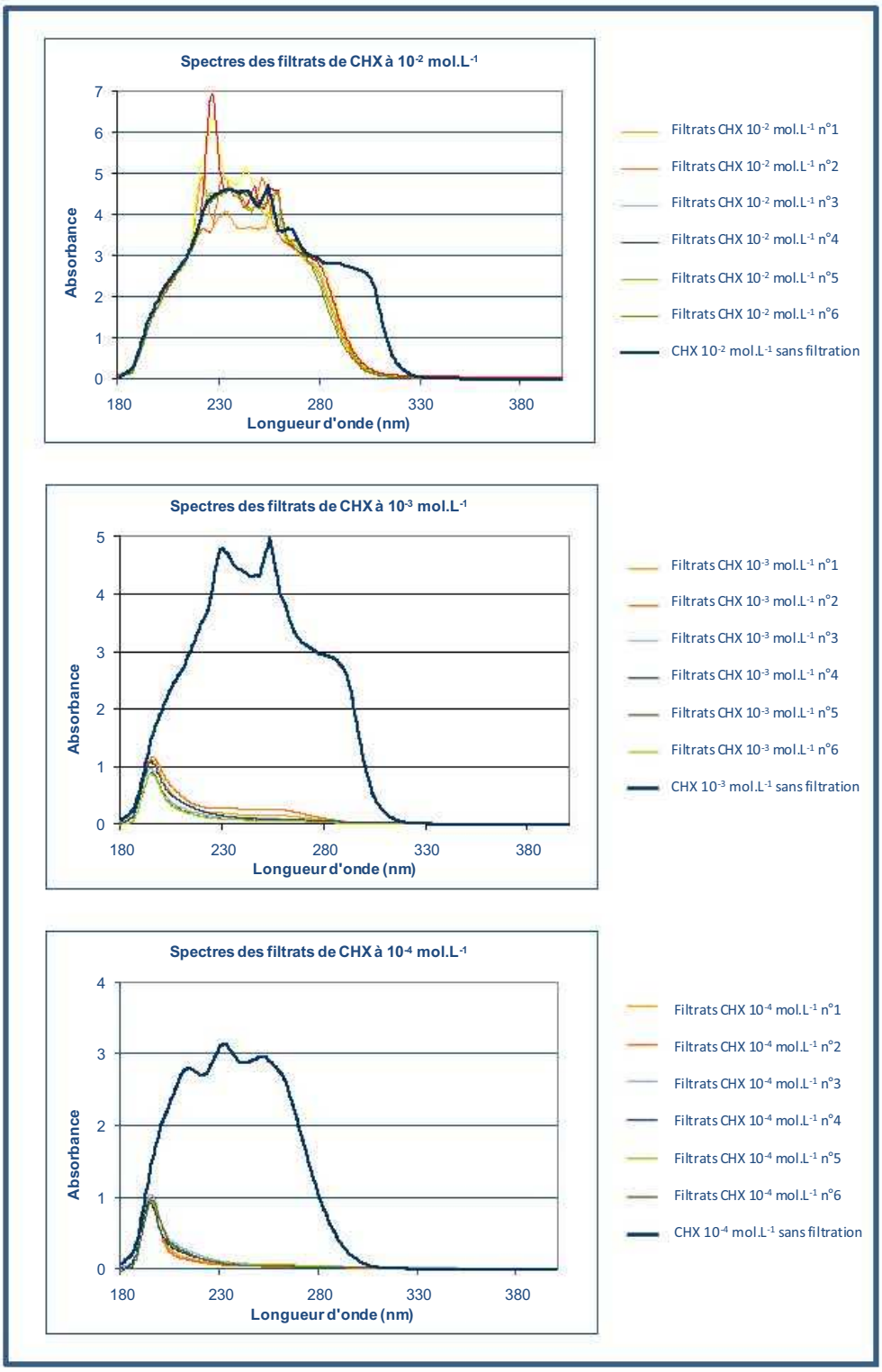


Figure 39 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible de filtrats des solutions de CHX à 10^{-2}, 10^{-3} et 10^{-4} mol.L^{-1}

Solutions de CHX filtrées sur colonnes de Séphadex™ G-25 et comparaison aux spectres de CHX obtenus sans filtration

La Figure 39, par l'absence de différence significative avec les spectres obtenus sans filtration, montre assez clairement que la solution de CHX à 10^{-2} mol.L^{-1} n'était pas retenue par les colonnes de Séphadex™ G-25. Par ailleurs, l'absence des pics spécifiques de la CHX sur les spectres obtenus après filtration des solutions à 10^{-3} et 10^{-4} mol.L^{-1} révélait leur rétention.

Cependant, un pic apparaissait aux environs de 200 nm que ce soit après filtration d'une solution à 10^{-3} mol.L^{-1} ou à 10^{-4} mol.L^{-1}. Ce pic avait déjà était observé dans les spectres obtenus avec du BT et du RN (Résultats, 1.2.3.1, p.137 et 1.2.3.2, p.141), et avait été qualifié de non spécifique. Pour mieux comprendre la nature de ce pic, nous avons réalisé le spectre de l'eau osmosée stérile, véhicule des molécules testées, après filtration sur colonne de Séphadex™ G-25, et le même pic d'absorbance aux environs de 200 nm a été observé. L'origine de ce pic peut donc, soit être due au PBS, solvant des gels de Séphadex™, soit à des composés relargués par la colonne lors de la centrifugation. Le spectre dans l'UV-visible d'une solution de PBS, a donc été réalisé et le même pic est observé, ce qui rend très vraisemblablement le PBS responsable (Figure 40).

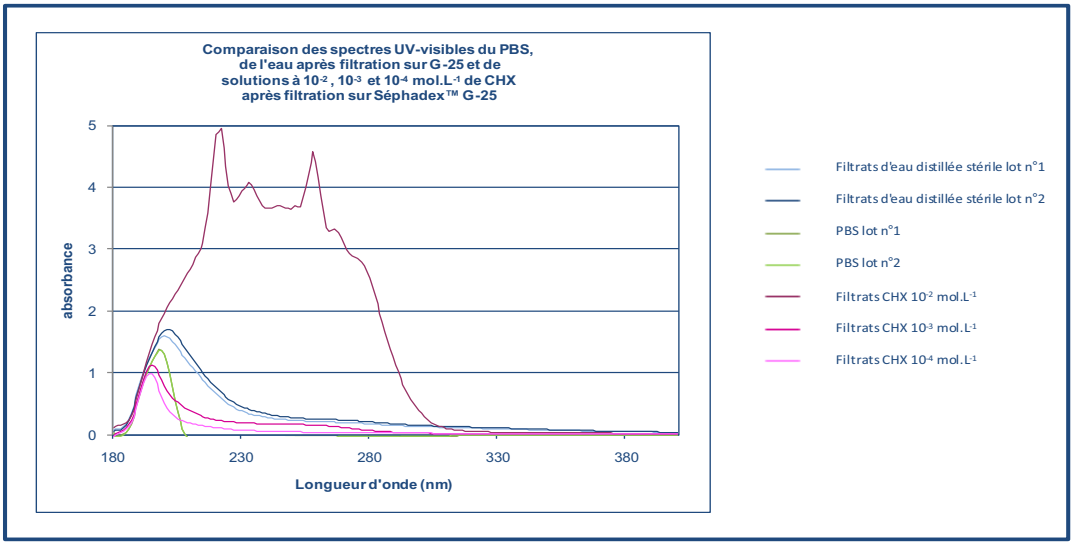


Figure 40 : Comparaison des spectres UV-visibles de l'eau, du PBS et de la CHX

Sont représentés les spectres de : (i) l'eau osmosée stérile après filtration sur Séphadex™ G-25, (ii) du PBS et (iii) des solutions de CHX à 10^{-2}, 10^{-3} et 10^{-4} mol.L^{-1} après filtration sur Séphadex™ G-25

Cette expérience a ainsi permis de confirmer que la CHX n'est pas à l'origine de ce pic mais qu'il s'agit très probablement d'une absorbance non spécifique due au PBS. Après une analyse plus fine des résultats obtenus, nous avons établi les taux de rétention de chaque solution de CHX testée à l'aide de l'Équation 4 (Matériels et Méthodes, 2.5, p.120). La concentration finale Cf a été estimée au

Concentration des solutions de CHX filtrées	A à 232 nm	C estimée	TR (%)	A à 255 nm	C estimée	TR (%)
10^{-2} mol.L^{-1}						
lot 1, colonne 1	4,042	$1,45.10^{-4}$	NC	4,002	$1,48.10^{-4}$	NC
lot 1, colonne 2	4,955	$1,78.10^{-4}$	NC	4,153	$1,53.10^{-4}$	NC
lot 2, colonne 1	4,993	$1,80.10^{-4}$	NC	3,902	$1,44.10^{-4}$	NC
lot 2, colonne 2	4,606	$1,66.10^{-4}$	NC	4,678	$1,72.10^{-4}$	NC
lot 3, colonne 1	4,519	$1,62.10^{-4}$	NC	4,069	$1,50.10^{-4}$	NC
lot 3, colonne 2	4,584	$1,65.10^{-4}$	NC	4,409	$1,63.10^{-4}$	NC
Moyenne		**$1,66.10^{-4}$**	**NC**		**$1,55.10^{-4}$**	**NC**
Ecart-type		**$1,15.10^{-5}$**	**NC**		**$9,59.10^{-6}$**	**NC**
10^{-2} mol.L^{-1}[(a)]	*4,594*	*$1,65.10^{-4}$*	*X*	*4,538*	*$1,67.10^{-4}$*	*X*
10^{-3} mol.L^{-1}						
lot 1, colonne 1	0,190	$6,83.10^{-6}$	99,32	0,160	$5,90.10^{-6}$	99,41
lot 1, colonne 2	0,288	$1,03.10^{-5}$	98,97	0,263	$9,69.10^{-6}$	99,03
lot 2, colonne 1	0,124	$4,45.10^{-6}$	99,56	0,100	$3,67.10^{-6}$	99,63
lot 2, colonne 2	0,140	$5,04.10^{-6}$	99,50	0,089	$3,29.10^{-6}$	99,67
lot 3, colonne 1	0,090	$3,24.10^{-6}$	99,68	0,071	$2,62.10^{-6}$	99,74
lot 3, colonne 2	0,088	$3,15.10^{-6}$	99,69	0,068	$2,51.10^{-6}$	99,75
Moyenne		**$5,51.10^{-6}$**	**99,45**		**$4,61.10^{-6}$**	**99,54**
Ecart-type		**$2,76.10^{-6}$**	**0,27**		**$2,77.10^{-6}$**	**0,28**
10^{-4} mol.L^{-1}						
lot 1, colonne 1	0,068	$2,45.10^{-6}$	97,55	0,041	$1,51.10^{-6}$	99,85
lot 1, colonne 2	0,057	$2,04.10^{-6}$	97,96	0,038	$1,39.10^{-6}$	99,86
lot 2, colonne 1	0,108	$3,88.10^{-6}$	96,12	0,066	$2,42.10^{-6}$	99,76
lot 2, colonne 2	0,091	$3,27.10^{-6}$	96,73	0,049	$1,79.10^{-6}$	99,82
lot 3, colonne 1	0,087	$3,13.10^{-6}$	96,87	0,065	$2,38.10^{-6}$	99,76
lot 3, colonne 2	0,076	$2,71.10^{-6}$	97,29	0,045	$1,64.10^{-6}$	99,84
Moyenne		**$2,92.10^{-6}$**	**97,08**		**$1,85.10^{-6}$**	**99,81**
Ecart-type		**$6,53.10^{-7}$**	**0,65**		**$4,43.10^{-7}$**	**0,04**

Tableau 16 : Analyse des spectres UV-visibles obtenus après filtration de solutions de CHX à 10^{-2}, 10^{-3} et 10^{-4} mol.L^{-1} sur colonnes de Séphadex™ G-25

Les absorbances à 232 et à 255 nm et les concentrations estimées sont mentionnées. Figurent aussi les taux de rétention des différentes solutions testées, calculés selon l'Équation 4.
[(a)] Les absorbances à 232 nm et à 255 nm d'une solution de CHX à 10^{-2}mol.L^{-1} sans filtration sont données à titre indicatif
NC : non calculable.

moyen de l'analyse de régression réalisée précédemment pour définir le coefficient d'absorption molaire spécifique de chaque λ_{max} en faisant appel, bien évidemment, à la loi de Beer-Lambert.

Pour la solution à 10^{-2} mol.L^{-1}, les absorbances des filtrats au maxima d'absorption étaient supérieures à 4 et donc en-dehors des limites de linéarité définie précédemment, soit des concentrations supérieures à 10^{-4} mol.L^{-1}. Ceci a également été confirmé par la mesure des absorbances à 232 nm et 255 nm d'une solution de CHX à 10^{-2} mol.L^{-1} sans filtration où la

concentration estimée était de l'ordre de $1,6.10^{-4}$ mol.L^{-1} (Tableau 16), ce qui soulignait la perte de linéarité de la relation et l'inapplicabilité de cette dernière au-dessus de 10^{-4} mol.L^{-1}. Le taux de rétention n'a pu donc qu'être estimé en prenant 10^{-4} 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} mol.L^{-1} pouvait être confirmée.

Les solutions de CHX à 10^{-3} et 10^{-4} mol.L^{-1} étaient quant à elles retenues en quasi-totalité par les colonnes de Séphadex™ G-25 comme l'ont montré les taux de rétention obtenus, i.e. (99,45 ± 0,27)% à 232 nm et (99,54 ± 0,28)% à 255 nm pour la solution à 10^{-3} mol.L^{-1} et (97,08 ± 0,65)% à 232 nm et (99,81 ± 0,04)% à 255 nm pour la solution à 10^{-4} mol.L^{-1} (Tableau 16). Ces résultats confirmaient ceux obtenus lors des tests de cytotoxicité. Cependant, une toxicité résiduelle avait été observée dans certains tests et à certain temps d'incubation des filtrats de CHX à 10^{-3} mol.L^{-1} laissant penser à une rétention incomplète (Résultats, 2.2.1, p.152). Ceci a été démenti par la spectrophotométrie UV-visible. Cette technique, plus reproductible et plus spécifique que les tests de cytotoxicité de part la sensibilité des cellules à de nombreux paramètres, a montré une rétention supérieure à 99% des solutions de CHX à 10^{-3} mol.L^{-1} et 10^{-4} mol.L^{-1}. 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^{-1}. 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^{-1}, ne présentaient aucun pic spécifique ni à 232 nm ni à 255 nm. La concentration estimée était donc inférieure à 10^{-6} mol.L^{-1}, limite inférieure de détection de la CHX. Les taux de rétention de ces solutions étaient ainsi supérieurs à 99% en utilisant la même formule pour le calcul du taux de rétention et en prenant 10^{-6} mol.L^{-1} 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.

2.2.3 Activité ATS-D de la CHX sur le HCoV 229E

Ces expériences préliminaires ont permis de démontrer : (i) la rétention de la CHX par les colonnes de Séphadex™ G25 et ses limites, (ii) la non rétention du HCoV 229E par ces mêmes colonnes et (iii) l'absence d'interférence de la technique elle-même sur le pouvoir infectieux du virus.

L'activité ATS de la CHX sur le HCoV 229E a donc pu être évaluée, selon le protocole décrit dans Matériels et Méthodes, 2.6, p. 121. Les concentrations de CHX testées étaient de 10^{-3} mol.L^{-1} et de 10^{-4} mol.L^{-1}, c'est-à-dire les concentrations dont la rétention par les colonnes de Séphadex™ G-25 avait été démontrée. Chaque concentration a été testée pour les temps de contact recommandés par la norme NF EN 14476+A1 dans le cas de la désinfection de surfaces et d'instruments (Tableau 3, p.25), i.e. 5 min, 15 min, 30 min et 60 min. 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 HCoV 229E 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 HCoV 229E 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, que ce soit lors des expériences avec la CHX à 10^{-4} mol.L^{-1} ou la CHX à 10^{-3} mol.L^{-1}, étaient en moyenne de 0,4 ; 0,2 ; 0,1 et 0,2 $\log_{10}$ pour les temps de contact de 5 min, 15 min, 30 min et 60 min, respectivement. Ces différences étaient donc inférieures à 0,5 $\log_{10}$ comme il l'est recommandé dans la norme NF EN 14476+A1, et la non rétention du HCoV 229E lors de ces expériences a été confirmée (Tableau 17).

Contrôle de la non rétention du HCoV par les colonnes de Séphadex™ G-25 lors des tests effectués avec la CHX aux différents temps de contact			
Temps de contact (min)	Titre viral sans filtration (log_{10})	Titre viral sans filtration (log_{10})	Différence (log_{10})
5	5,9 ± 0,7	5,6 ± 0,6	0,4 ± 0,2
15	5,6 ± 0,5	5,6 ± 0,4	0,2 ± 0,1
30	6,1 ± 0,2	6,0 ± 0,4	0,1 ± 0,2
60	6,1 ± 0,2	6,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1
Contrôle de la neutralisation de l'activité antivirale potentielle de la CHX par filtration sur colonne de Séphadex™ G-25			
Concentrations de CHX testées	Titre viral sans filtration (log_{10})	Titre viral sans filtration (log_{10})	Différence (log_{10})
CHX à 10^{-4} mol.L^{-1}	5,9 ± 0,6	6,1 ± 0,6	0,2 ± 0,1
CHX à 10^{-3} mol.L^{-1}	6,0 ± 0,4	5,8 ± 0,5	0,2 ± 0,2

Tableau 17 : Résultats des contrôles effectués lors des tests de l'évaluation de l'activité ATS anti-coronavirus de la CHX

Les résultats correspondent à la moyenne des résultats obtenus lors de chaque expérience validée.

Les contrôles de neutralisation consistaient en l'inoculation, sur les cellules L-132, des filtrats des solutions de CHX à 10^{-3} mol.L^{-1} et à 10^{-4} mol.L^{-1}, puis ensuite seulement, l'inoculation de la suspension virale sur les cellules. Les titres viraux obtenus ont été comparés à ceux obtenus avec la suspension virale sans filtration. Les différences de log_{10} obtenues étaient de 0,2 en moyenne que ce soit pour la solution de CHX à 10^{-3} mol.L^{-1} ou à 10^{-4} mol.L^{-1}, et donc inférieures à 0,5 tel que recommandé dans la norme (Tableau 17). L'activité potentielle de la CHX a donc bien été neutralisée pour les deux concentrations 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.

Le dernier contrôle permettait de s'assurer, visuellement par observation au microscope inversé, de la non cytotoxicité des filtrats des solutions de CHX, en vérifiant l'intégrité des tapis cellulaires, après dépôt des filtrats sur les cellules et incubation pendant six à sept jours, durée nécessaire à l'apparition de l'ECP du HCoV 229E. Ce contrôle était complémentaire des tests de cytotoxicité réalisés au préalable (Résultats, 2.2.1, p.152). 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 la perte de pouvoir infectieux du HCoV 229E induite par la CHX. Cette 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 41.

La CHX à 10^{-4} mol.L^{-1} a induit une baisse dans les titres viraux de 0,8 ; 0,5 ; 1,4 et 2,1 log_{10} pour les temps de contact de 5 min, 15 min, 30 min et 60 min, respectivement.

A 10^{-3} mol.L^{-1}, des diminutions des titres viraux de 1,4 ; 2,1 ; 2,4 et 3 $\log_{10}$ ont été déterminés à 5 min, 15 min, 30 min et 60 min, respectivement.

Ainsi, l'activité ATS de la CHX sur le HCoV 229E a pu être quantifiée et montrait une évolution concentration- et temps-dépendante.

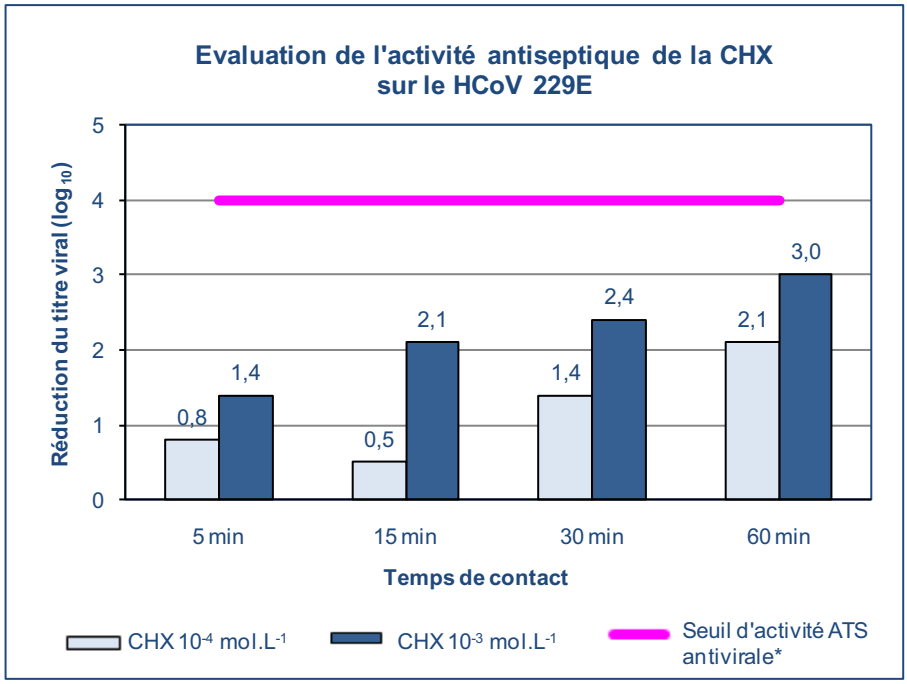


Figure 41 : Evaluation de l'activité ATS-D de la CHX sur le HCoV 229E

(*Seuil défini par la norme Européenne NF EN 14476+A1)

Cependant, la norme NF EN 14476+A1 impose une diminution de 4 $\log_{10}$ pour prétendre à une activité ATS antivirale. Or, même à 60 min de temps de contact, la CHX à 10^{-3} mol.L^{-1}, n'a induit qu'une diminution de 3 $\log_{10}$. Elle ne peut donc pas être considérée comme un ATS-D actif sur le HCoV 229E. Nous pouvons cependant souligner, que selon les critères Américains, elle serait reconnue comme efficace puisqu'ils n'imposent qu'une diminution de 3 $\log_{10}$.

2.3 Evaluation de l'activité ATS-D anti-coronavirus de l'HXM

2.3.1 Cytotoxicité de l'HXM sur les cellules L-132 avec et sans filtration

2.3.1.1 Cytotoxicité de l'HXM sur les cellules L-132

De la même façon que pour la CHX, dont la rétention par les colonnes de Séphadex™ G-25 pour des concentrations inférieures à 10^{-2} mol.L^{-1} a été prouvée, la rétention de l'HXM par les colonnes de Séphadex™ G-10 a été examinée. En effet, sa masse moléculaire de 606,72 g.mol^{-1} la prédestine à être retenue par ces colonnes.

La toxicité de l'HXM sur les cellules L-132 a tout d'abord été estimée. En se référant aux résultats obtenus précédemment, l'apport des résultats de la seconde gamme, plus précise, pour la CHX n'ayant pas apporté d'information supplémentaire (Résultats, 2.2.1, p.152), une seule gamme de concentrations a été réalisée pour évaluer la toxicité de l'HXM sur les cellules L-132. Les tests MTT et RN, pour une gamme de concentrations d'HXM de 10^{-3} à 10^{-11} mol.L^{-1}, ont été effectués en triplicat et pour chaque temps d'incubation, l. Les résultats sont représentés dans la Figure 42 et la Figure 43. Les CI_{50} obtenues étaient de $(3,8 \pm 1,0).10^{-5}$, $(1,2 \pm 1,4).10^{-5}$ et de $(5,1 \pm 4,2).10^{-6}$ mol.L^{-1} à 24 h, 48 h et 168 h, respectivement. Les CC_{50} étaient de $(5,5 \pm 2,0).10^{-5}$, $(2,0 \pm 2,4).10^{-5}$ et de $(4,3 \pm 2,2).10^{-6}$ mol.L^{-1} à 24 h, 48 h et 168 h (Tableau 18).

		CI_{50}			CC_{50}		
		24 h	48 h	168 h	24 h	48 h	168 h
HXM (n = 3)		$3,8.10^{-5}$	$1,2.10^{-5}$	$5,1.10^{-6}$	$5,5.10^{-5}$	$2,0.10^{-5}$	$4,3.10^{-6}$
Concentration en HXM avant filtration sur Séphadex™ G-10							
10^{-3}	Test n°1	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$
	Test n°2	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$5,4.10^{-5}$	$5,5.10^{-5}$
	Test n°3	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$
10^{-2} (n= 3)		$6,9.10^{-5}$	$1,7.10^{-5}$	$8,7.10^{-6}$	$4,4.10^{-5}$	$4,4.10^{-5}$	$5,7.10^{-6}$

Tableau 18 : Moyennes des CI_{50} et des CC_{50} obtenues pour l'HXM non filtrée et après filtration sur les cellules L-132

Les moyennes des CI_{50} et des CC_{50} obtenues pour l'HXM non filtrée sont représentées ci-dessus. Les moyennes des CI_{50} et des CC_{50} obtenues avec les solutions d'HXM à 10^{-2} et 10^{-3} mol.L^{-1} après filtration sur les colonnes de Séphadex™ G-10 sont également représentées. Pour les solutions à 10^{-3} mol.L^{-1}, les CI_{50} et les CC_{50} obtenues sont détaillées pour plus de précision.

2.3.1.2 Cytotoxicité de l'HXM sur les cellules L-132 après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-10

Suite à ces résultats, la rétention de solutions d'HXM à différentes concentrations, i.e. 10^{-3} et 10^{-2} mol.L^{-1}, a été estimée par des tests de cytotoxicité sur les cellules L-132 après ajout des filtrats des solutions d'HXM.

La toxicité des filtrats de solutions d'HXM à 10^{-3} mol.L^{-1} a été alors évaluée. Les résultats sont représentés dans la Figure 42 et la Figure 43 et montrent une disparition de la toxicité. Le calcul des CI_{50} et des CC_{50} ont confirmé ce résultat et étaient pratiquement toutes supérieures à 10^{-4} mol.L^{-1} sauf dans la deuxième série de tests au RN où l'on a déterminé des CC_{50} à $5{,}4.10^{-5}$ et $5{,}5.10^{-5}$ mol.L^{-1} à 48 h et 168 h, respectivement (Tableau 18). Afin de mieux comprendre ces résultats, ils seront confrontés à ceux obtenus lors des mesures spectrophotométriques. Cependant, l'HXM à 10^{-3} mol.L^{-1} peut être considérée comme majoritairement retenue par les colonnes de Séphadex™ G-10.

Les tests de cytotoxicité sur les filtrats d'HXM à 10^{-4} mol.L^{-1} n'ont, par suite, pas été réalisés. De plus, l'activité ATS sur le HCoV 229E de l'HXM à 10^{-3} mol.L^{-1} étant négligeable (Résultats, 2.3.3, p.174), son activité à 10^{-4} mol.L^{-1} n'a pas été examinée.

Les résultats obtenus avec les filtrats d'HXM à 10^{-2} mol.L^{-1} sont représentés dans la Figure 42 et dans la Figure 43. La toxicité observable dans les graphiques ainsi que les CI_{50} et les CC_{50} obtenues corroboraient les résultats obtenus avec la CHX à 10^{-2} mol.L^{-1}, soit une rétention incomplète des solutions à concentrations élevées. En effet, les CI_{50} obtenues étaient de $(6{,}9 \pm 1{,}5).10^{-5}$, $(1{,}7 \pm 1{,}7).10^{-5}$ et de $(8{,}7 \pm 4{,}7).10^{-6}$ mol.L^{-1} à 24 h, 48 h et 168 h, respectivement. Les CC_{50} des filtrats d'HXM à 10^{-2} mol.L^{-1} étaient de $(4{,}4 \pm 3{,}7).10^{-5}$, $(4{,}4 \pm 0{,}7).10^{-5}$ et de $(5{,}7 \pm 0{,}3).10^{-6}$ à 24 h, 48 h et 168 h, respectivement (Tableau 18). Les valeurs obtenues n'étaient donc pas significativement différentes de celles obtenues avec l'HXM sans filtration. A 10^{-2} mol.L^{-1}, l'HXM n'avait ainsi pas été retenue par les colonnes de Séphadex™ G-10. La capacité de rétention semblait alors indépendante de la nature du gel de Séphadex™ constituant les colonnes.

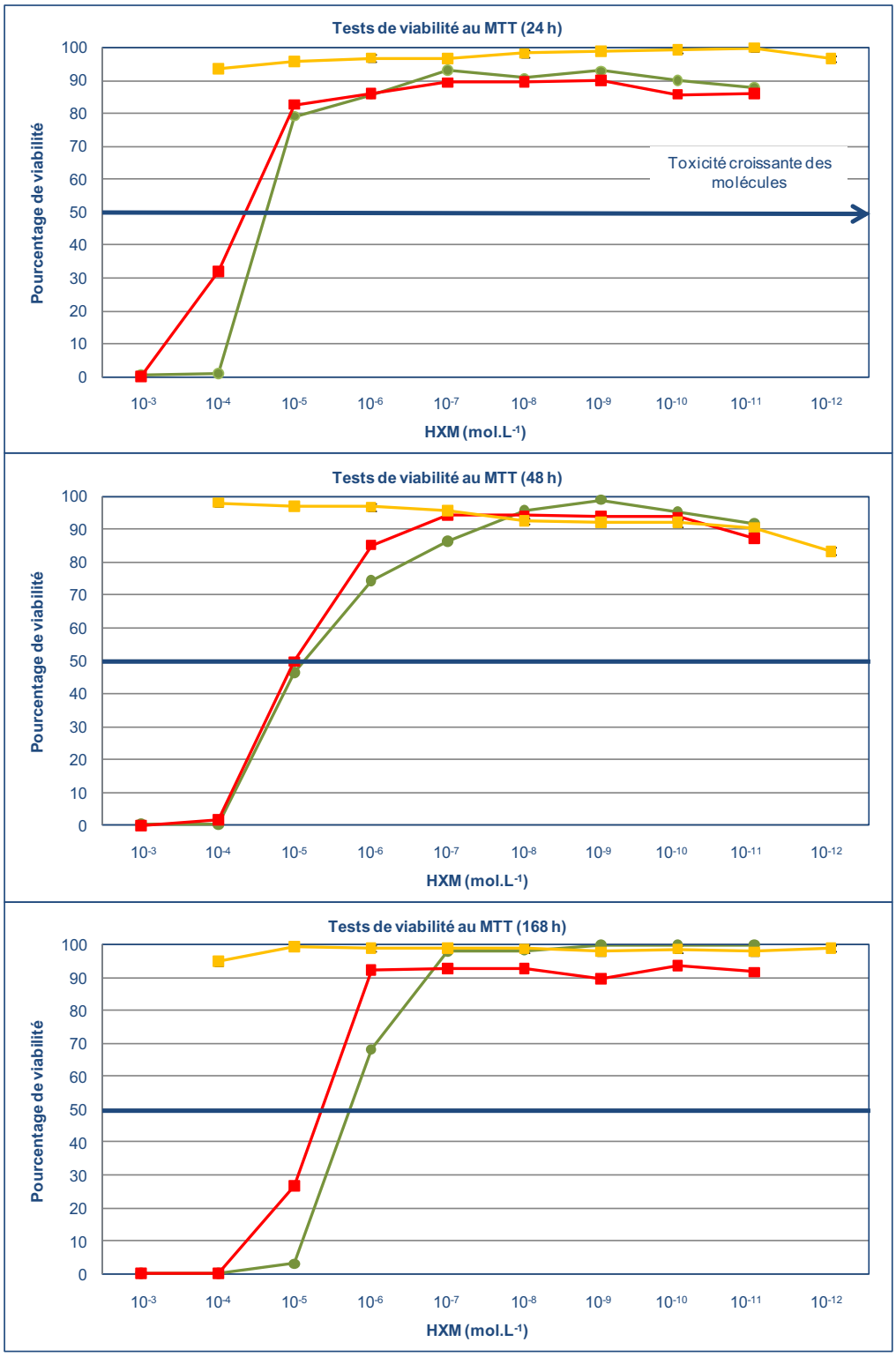


Figure 42 : Evaluation de la viabilité cellulaire en présence d'HXM non filtrée et après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-10

Les graphiques représentent les moyennes des % de viabilité des cellules obtenus, grâce aux tests MTT, en présence de d'HXM non filtrée et filtrée, aux différents temps d'incubation 24 h, 48 h et 168 h. représente les moyennes (n = 3) des % de viabilité obtenus avec l'HXM sans filtration, gamme de 10^{-3} à 10^{-12} mol.L^{-1}. et représentent les moyennes (n = 3) des % de viabilité obtenus avec des solutions d'HXM à 10^{-2} et 10^{-3} mol.L^{-1}, respectivement, après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-10. Les concentrations en abscisse correspondent aux concentrations théoriques si l'HXM n'était absolument pas retenue par les colonnes de Séphadex™ G-10.



Figure 43 : Evaluation de la cytotoxicité induite sur les cellules L-132 par l'HXM non filtrée et après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-10

Les graphiques représentent les moyennes des % de cytotoxicité obtenus, grâce aux tests RN, en présence d'HXM non filtrée et filtrée, aux différents temps d'incubation 24 h, 48 h et 168 h. représente les moyennes (n = 3) des % de cytotoxicité obtenus avec l'HXM sans filtration, gamme de 10^{-2} à 10^{-12} mol.L^{-1}. et représentent les moyennes (n = 3) des % de cytotoxicité obtenus avec des solutions d'HXM à 10^{-2} et 10^{-3} mol.L^{-1}, respectivement, après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-10. Les concentrations en abscisse correspondent aux concentrations théoriques si la CHX n'était absolument pas retenue.

2.3.2 Taux de rétention de l'HXM par les colonnes de Séphadex™ G-10

2.3.2.1 Détermination des paramètres spectrophotométriques de l'HXM

En utilisant la même méthodologie que pour la CHX, la première gamme de dilutions réalisée pour l'HXM, i.e. de 10^{-3} mol.L^{-1} à 10^{-10} mol.L^{-1}, a permis de déterminer les limites inférieures et supérieures de détection de l'HXM par spectrophotométrie UV-visible (Figure 44). Ainsi, en-dessous de 10^{-6} mol.L^{-1}, l'HXM était indétectable alors qu'au-dessus de 10^{-4} mol.L^{-1}, la loi de Beer-Lambert n'était plus respectée (A > 2) et la concentration d'HXM ne pouvait plus être déterminée de façon fiable. De plus, deux pics d'absorption maximum semblaient ressortir, un aux environs de 200 nm et l'autre aux environs de 260 nm (Annexe 3, 2, Tableau III). Une seconde gamme de dilutions, plus précise et respectant les limites définies lors de la gamme précédente, i.e. de 5.10^{-5} à 5.10^{-6} mol.L^{-1} a été mise en œuvre (Figure 45).

L'analyse de cette nouvelle gamme a confirmé dans un premier temps les résultats obtenus grâce à la première gamme de dilutions et deux pics d'absorption maximum ont effectivement été observés. Cependant, les absorptions aux environs de 200 nm coïncident avec des absorptions non spécifiques, notamment celle du PBS (Résultats, 2.2.2.2, p.158). Par conséquent, le pic à 200 nm n'a pas été envisagé comme un pic d'absorbance spécifique de l'HXM. Le second pic, aux environs de 260 nm, a, lui, été considéré quant à lui le pic de référence d'absorption maximum. Les moyennes des longueurs d'onde, où les valeurs d'absorption étaient les plus fortes, ont été calculées (Annexe 3, Tableau IV). La valeur définitive de la longueur d'onde de ce pic (λ_{max}) est de 262 nm. Cette valeur était cohérente avec les données de la Pharmacopée Européenne.

Une analyse de régression simple a été ensuite réalisée grâce au logiciel Statview® pour déterminer le coefficient d'absorption spécifique de l'HXM à 262 nm (Matériels et méthodes, 2.7.2, p.129). La relation A = f(C) montrait une très bonne linéarité pour les concentrations testées (R^2 = 0,998) et a ainsi permis de définir la valeur du coefficient d'absorption molaire spécifique ε de l'HXM à 262 nm, i.e. $2{,}5.10^4$ L.cm^{-1}.mol^{-1} (Annexe 4, 2).

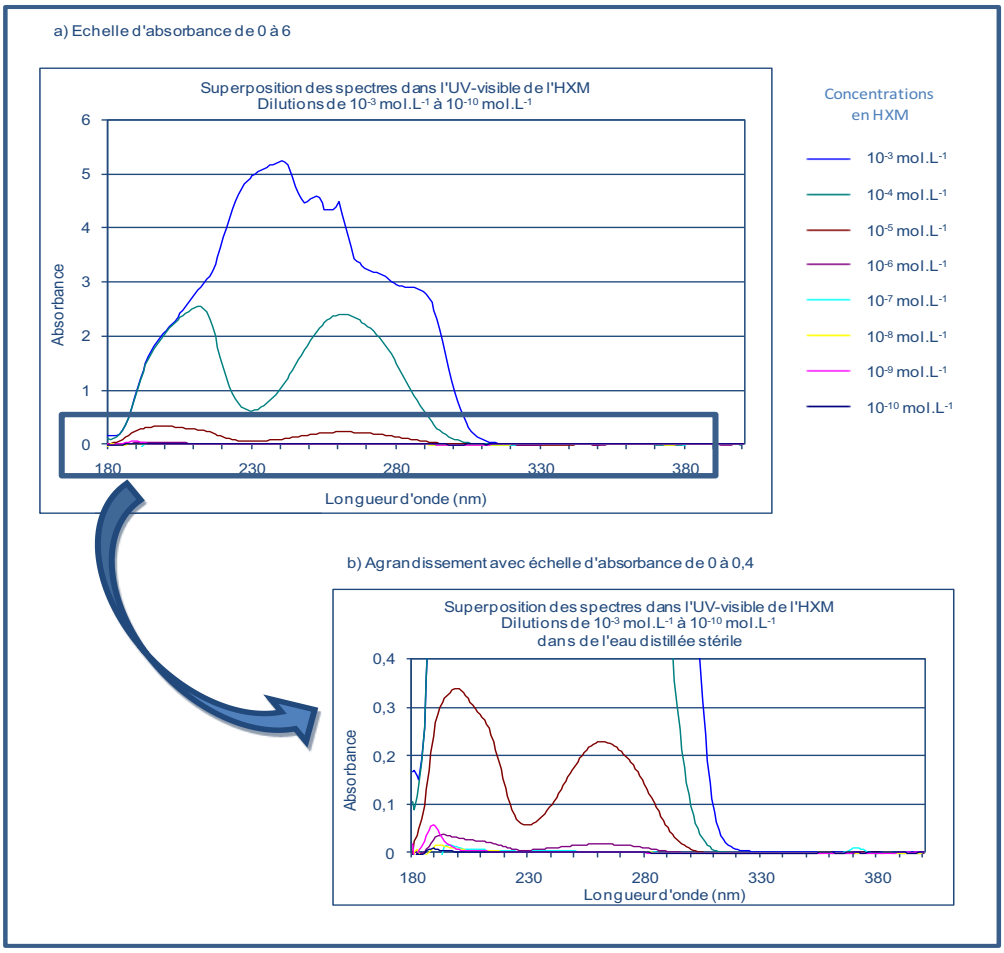


Figure 44 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible de dilutions d'HXM de 10^{-3} à 10^{-10} mol.L^{-1}

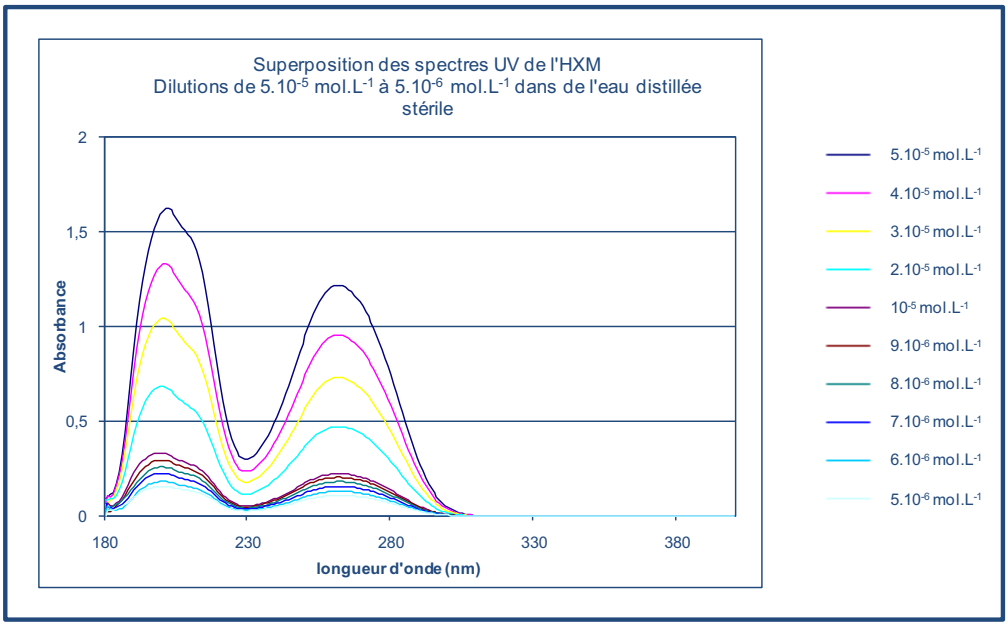


Figure 45 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible de dilutions de l'HXM de 5.10^{-5} à 5.10^{-6} mol.L^{-1}

Concentration des solutions d'HXM filtrées	A à 262 nm	C estimée	TR (%)
10^{-2} mol.L^{-1}			
lot 1, colonne 1	3,683	$1,50.10^{-4}$	NC
lot 1, colonne 2	3,540	$1,44.10^{-4}$	NC
lot 2, colonne 1	3,042	$1,24.10^{-4}$	NC
lot 2, colonne 2	3,085	$1,25.10^{-4}$	NC
lot 3, colonne 1	3,696	$1,50.10^{-4}$	NC
lot 3, colonne 2	3,458	$1,41.10^{-4}$	NC
Moyenne		**$1,39.10^{-4}$**	**NC**
Ecart-type		**$1,18.10^{-5}$**	**NC**
10^{-2} mol.L^{-1}[(a)]	*3,071*	*$1,25.10^{-4}$*	*X*
10^{-3} mol.L^{-1}			
lot 1, colonne 1	0,055	$2,22.10^{-6}$	99,78
lot 1, colonne 2	0,056	$2,26.10^{-6}$	99,77
lot 2, colonne 1	0,059	$2,40.10^{-6}$	99,76
lot 2, colonne 2	0,041	$1,67.10^{-6}$	99,83
lot 3, colonne 1	0,073	$2,96.10^{-6}$	99,70
lot 3, colonne 2	0,077	$3,13.10^{-6}$	99,69
Moyenne		**$2,44.10^{-6}$**	**99,76**
Ecart-type		**$5,33.10^{-7}$**	**0,05**
10^{-4} mol.L^{-1}			
lot 1, colonne 1	0,052	$2,12.10^{-6}$	97,88
lot 1, colonne 2	0,070	$2,85.10^{-6}$	97,15
lot 2, colonne 1	0,048	$1,94.10^{-6}$	98,06
lot 2, colonne 2	0,059	$2,38.10^{-6}$	97,62
lot 3, colonne 1	0,041	$1,69.10^{-6}$	98,31
lot 3, colonne 2	0,051	$2,08.10^{-6}$	97,92
Moyenne		**$2,18.10^{-6}$**	**97,82**
Ecart-type		**$5,33.10^{-7}$**	**0,05**

Tableau 19 : Analyse des spectres UV-visibles obtenus lors de la filtration de solutions d'HXM à 10^{-2}, 10^{-3} et 10^{-4} mol.L^{-1} sur les colonnes de Séphadex™ G-10

Les absorbances à 262 nm sont mentionnées ainsi que les concentrations estimées et enfin figurent également les taux de rétention calculés avec les concentrations estimées et selon l'Équation 4.
[(a)] L'absorbance à 262 nm d'une solution d'HXM à 10^{-2} mol.L^{-1} sans filtration est donnée à titre indicatif.
NC : Non calculable

2.3.2.2 Taux de rétention par les colonnes de Séphadex™ G-10

Suite à l'identification des paramètres spécifiques de l'HXM, la rétention de solutions à différentes concentrations d'HXM sur les colonnes de Séphadex™ G-10 a pu être évaluée.

A la lecture des graphiques de la Figure 46, les solutions d'HXM à 10^{-2} mol.L^{-1} ne semblaient pas retenues par les colonnes. Ceci renforçait l'hypothèse de la saturation des colonnes aux concentrations élevées, déjà évoquée avec la CHX (Résultats, 2.2.2.2, p.158) et confirmait également les résultats de cytotoxicité de l'HXM (Résultats, 2.3.1, p.166).

Par ailleurs, la concentration estimée, à l'aide de la loi de Beer-Lambert (Équation 3) et de la mesure d'absorbance de la solution à 10^{-2} mol.L^{-1} sans filtration, était de $1,25.10^{-4}$ mol.L^{-1} (Tableau 19). Ce

résultat prouvait la perte de linéarité de la relation A = f(c) au-delà de certaines concentrations, i.e. 10^{-4} mol.L^{-1}, et ainsi l'impossibilité d'estimer des concentrations à partir des absorbances observées. Les solutions à 10^{-3} mol.L^{-1} et à 10^{-4} mol.L^{-1} semblaient quant à elles, être complètement retenues par les colonnes de Séphadex™ G-10 (Figure 46).

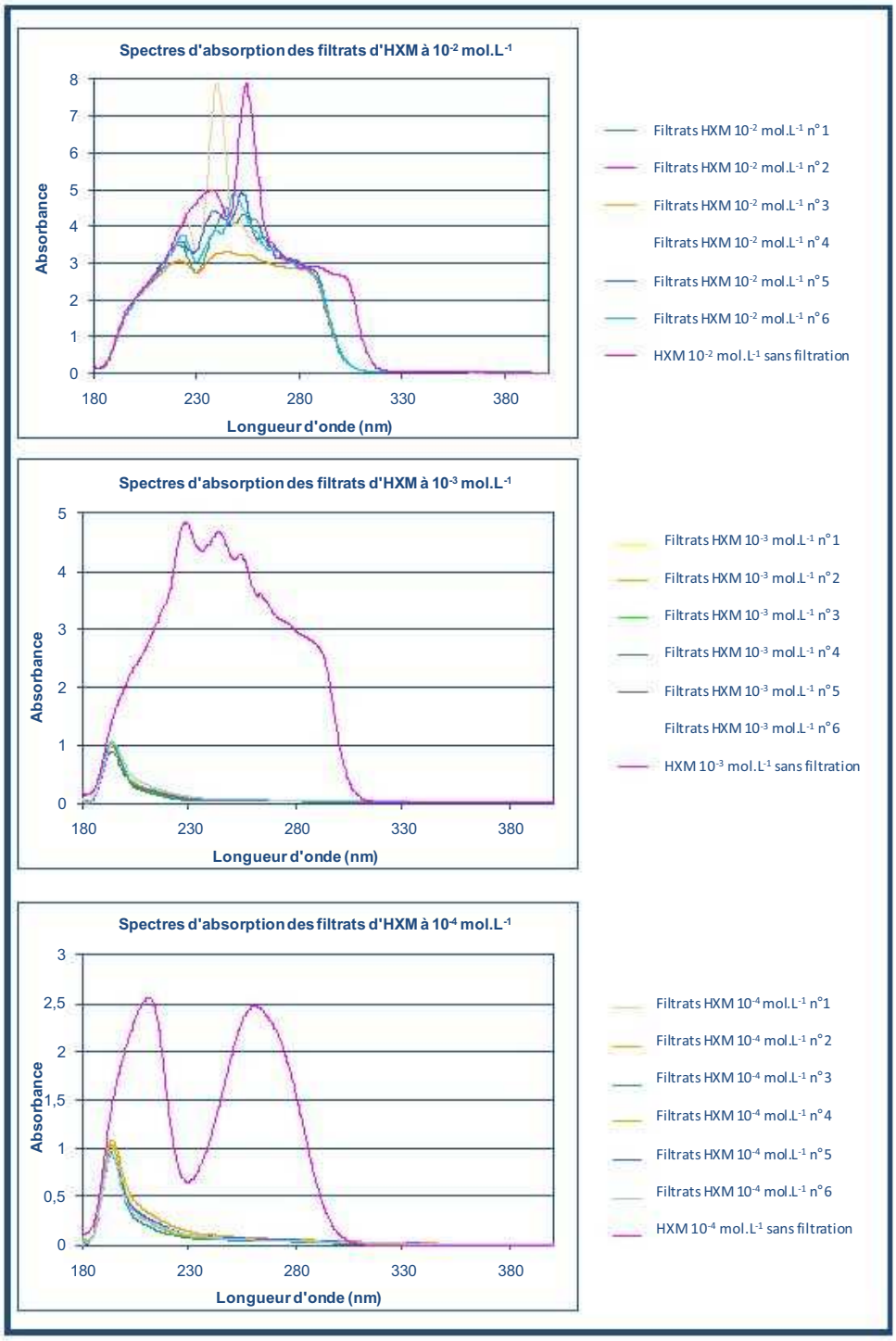


Figure 46 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible de filtrats des solutions d'HXM à 10^{-2}, 10^{-3} et 10^{-4} mol.L^{-1}

Solutions d'HXM filtrées sur colonnes de Séphadex™ G-10 et comparaison aux spectres d'HXM obtenus sans filtration

A la lecture des spectres obtenus, le pic, non spécifique, aux environs de 200 nm, était toujours présent. Un taux de rétention supérieur à 99% pour des solutions d'HXM à 10^{-3} mol.L^{-1} a été mis en évidence. Ces résultats, comparables à ceux obtenus avec la CHX, ont conduit à confirmer la rétention des solutions à 10^{-3} mol.L^{-1} malgré l'apparition d'une certaine toxicité dans une série des tests au RN.

Le taux de rétention des solutions à 10^{-4} mol.L^{-1} était de (97,82 ± 0,05)% et donc plus faible que pour les solutions à 10^{-3} mol.L^{-1}. Ce phénomène était, à l'évidence, plutôt dû aux limites de la technique qu'à une moins bonne rétention de la solution. En effet, les concentrations estimées grâce aux valeurs d'absorbance, étaient de l'ordre de 10^{-6} mol.L^{-1} et donc proches de la limite de détection. De plus, l'absence de pic spécifique à 262 nm laissait penser que la concentration résiduelle d'HXM était inférieure à 10^{-6} mol.L^{-1}. Ainsi, en prenant comme concentration finale 10^{-6} mol.L^{-1} et en utilisant l'Équation 4, le taux de rétention des solutions à 10^{-4} mol.L^{-1} était supérieur à 99% et celui des solutions à 10^{-3} mol.L^{-1}, supérieur à 99,9%.

Des filtrats de solutions d'HXM à 10^{-3} ou à 10^{-4} mol.L^{-1} pouvaient être déposés sur des tapis cellulaires sans craindre la présence d'HXM pour les expériences ultérieures.

2.3.3 Activité ATS-D de l'HXM sur le HCoV 229E

De même que pour la CHX et la Séphadex™ G-25, il a été démontré : (i) la rétention de solution d'HXM à 10^{-3} mol.L^{-1} et l'élimination de la cytotoxicité de cette molécule et (ii) la non rétention du HCoV 229E par les colonnes de Séphadex™ G-10 et (iii) l'absence d'interférence de la technique elle-même sur le pouvoir infectieux du virus. L'évaluation de l'activité anti-coronavirus de l'HXM a donc pu être mise en œuvre.

L'HXM a tout d'abord été testée à une concentration de 10^{-3} mol.L^{-1} et des temps de contact de 30 et 60 min. Chaque expérience a été réalisée en triplicat. Les contrôles de non rétention, de neutralisation et d'élimination de la toxicité de l'HXM ont été mis en œuvre lors de chaque expérience (Matériels et méthodes, 2.6.3, p.123 et 2.6.4, p.127).

Les différences entre les titres viraux obtenus lors des tests de non rétention du HCoV 229E par les colonnes de Séphadex™ G-10 étaient de 0,4 et de 0,2 $\log_{10}$ pour les temps de contact de 30 et 60 min, respectivement, et donc inférieures à 0,5 $\log_{10}$. De la même façon, les contrôles de neutralisation de l'éventuelle activité de l'HXM à 10^{-3} mol.L^{-1} ont montré une différence de 0,2 $\log_{10}$ en moyenne, également inférieure à 0,5 $\log_{10}$ (Tableau 20).

Contrôle de la non rétention du HCoV par les colonnes de Séphadex™ G-10 lors des tests effectués avec l'HXM aux différents temps de contact			
Temps de contact (min)	Titre viral sans filtration (log_{10})	Titre viral sans filtration (log_{10})	Différence (log_{10})
30	6,7 ± 0,9	6,4 ± 0,8	**0,4 ± 0,2**
60	6,7 ± 0,9	6,4± 0,7	**0,2 ± 0,2**
Contrôle de la neutralisation de l'activité antivirale potentielle de l'HXM par filtration sur colonne de Séphadex™ G-10			
Concentrations d'HXM testées	Titre viral sans filtration (log_{10})	Titre viral sans filtration (log_{10})	Différence (log_{10})
HXM à 10^{-3} mol.L^{-1}	6,9 ± 0,9	5,8 ± 0,5	**0,2 ± 0,2**

Tableau 20 : Résultats des contrôles effectués lors des tests de l'évaluation de l'activité ATS-D anti-coronavirus de l'HXM

Les résultats correspondent à la moyenne des résultats obtenus lors de chaque expérience validée.

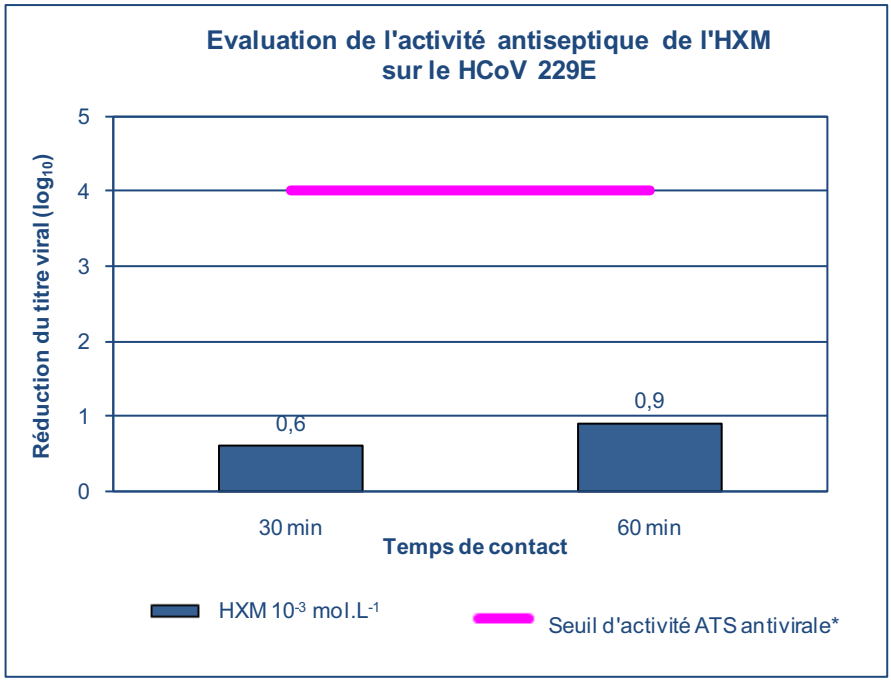


Figure 47 : Evaluation de l'activité ATS-D de l'HXM sur le HCoV 229E

(*Seuil défini par la norme Européenne NF EN 14476+A1)

L'évaluation de l'activité virucide de l'HXM à l'égard du HCoV 229E pouvait alors être réalisée de façon fiable. Il a été évalué une diminution de 0,6 et de 0,9 log_{10} dans les titres viraux après contact avec l'HXM à 10^{-3} mol.L^{-1} pendant 30 min et 60 min, respectivement (Figure 47). Ainsi, l'HXM à 10^{-3} mol.L^{-1} ne montre qu'une très faible activité anti-HCoV 229E en regard du seuil fixé par la norme NF EN 14476+A1. Pour cette raison, l'investigation de l'activité virucide de cette molécule n'a pas été poursuivie. Ainsi, ni les temps de contact 5 min et 15 min, ni la concentration 10^{-4} mol.L^{-1} n'ont été testés.

3 Evaluation de l'activité ATS-D anti-coronavirus de deux calixarènes

Nous avons, au cours des étapes précédentes, répondu à notre premier objectif, i.e. développer une méthodologie pour évaluer l'activité ATS-D antivirale en faisant appel à une méthode neutralisation par filtration sur colonnes de Séphadex™. Après nous être assurés de la reproductibilité et de la fonctionnalité de ces colonnes nouvellement conçues, nous nous sommes intéressés au pouvoir ATS-D sur le HCoV 229E de deux molécules largement utilisées en médecine Humaine, la CHX et l'HXM. Notre deuxième objectif découlait notamment des résultats obtenus. En effet, même si la CHX montrait une certaine activité ATS-D anti-coronavirus, elle n'atteignait pas le seuil fixé par la norme Européenne. De plus, l'activité de l'HXM sur le HCoV 229E s'était révélée très faible voire inexistante. En outre, ces deux molécules se sont avérées toxiques pour les cellules L-132.
La vocation principale de notre équipe de recherche étant le développement de molécules à visée anti-infectieuse, nous nous sommes naturellement tournés vers les calixarènes, un des sujets d'étude du versant Chimie de notre équipe.

Nous avons ainsi procédé à l'évaluation de l'activité ATS-D du *tetra-para*-sulfonato-calix[4]arène ou C[4]S et du 1,3-bis(bithiazolyl)-*tetra-para*-sulfonato-calix[4]arène ou C[4]S-BTZ. Dans ce but, la même méthodologie a été suivie : (i) confirmation de la rétention des calixarènes testés par les colonnes de Séphadex™ de façon biologique et physico-chimique, (ii) neutralisation de leur activité potentielle ATS-D antivirale et de leur éventuelle cytotoxicité, (iii) vérification de la non rétention du HCoV 229E lors des tests effectués sur les calixarènes et enfin (iv) évaluation de leur éventuelle propriété ATS sur le HCoV 229E.

3.1 Evaluation de l'activité ATS-D anti-coronavirus du C[4]S

3.1.1 Cytotoxicité du C[4] sur les cellules L-132

La toxicité du C[4]S sur les cellules L-132 a été évaluée par les tests MTT et RN décrits précédemment (Matériels et Méthodes, 2.4, p.116). Une gamme de concentrations de 10^{-4} à 10^{-12} mol.L^{-1} a été effectuée par dépôt de 10 µL de solution à 10^{-3} mol.L^{-1} dans chaque puits de la colonne 3 des plaques 96 puits, contenant des cellules L-132 à 40% de confluence environ, suivi d'une dilution sériée au dixième. Chaque test a été réalisé en triplicat et les résultats sont représentés dans la Figure 48 et dans la Figure 49.

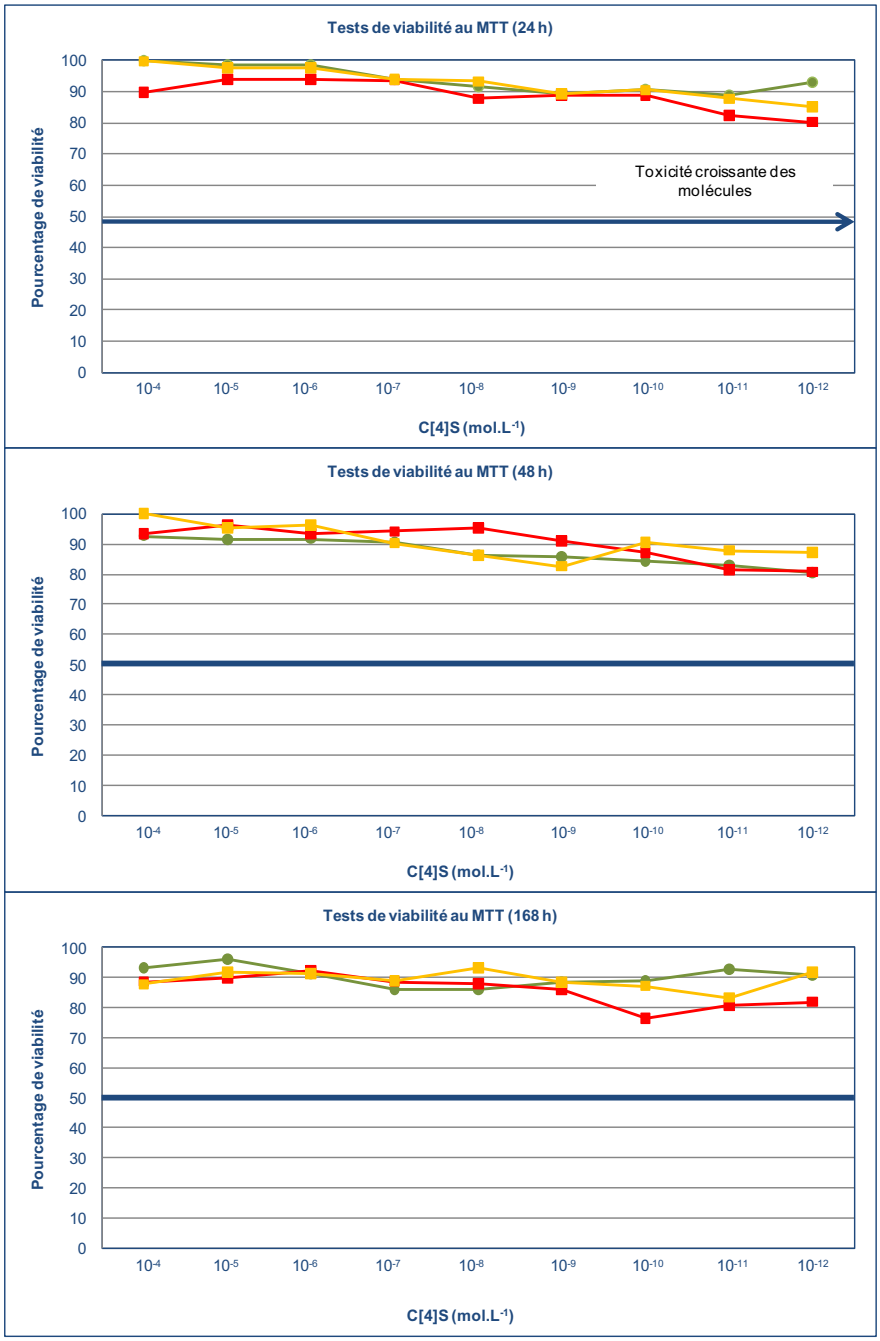


Figure 48 : Evaluation de la viabilité cellulaire en présence de C[4]S non filtré et après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-10 et G-25

Les graphiques représentent les moyennes des % de viabilité des cellules obtenus, grâce aux tests MTT, en présence de C[4]S non filtré et filtré, aux différents temps d'incubation 24 h, 48 h et 168 h. représente les moyennes (n = 3) des % de viabilité obtenus avec le C[4]S sans filtration, gamme de 10^{-4} à 10^{-12} mol.L^{-1}. et représentent les moyennes (n = 3) des % de viabilité obtenus avec des solutions de C[4]S à 10^{-3} mol.L^{-1} après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-10 et G-25, respectivement. Les concentrations en abscisse correspondent aux concentrations théoriques si le C[4]S n'était absolument pas retenu par les colonnes de Séphadex™ G-10.

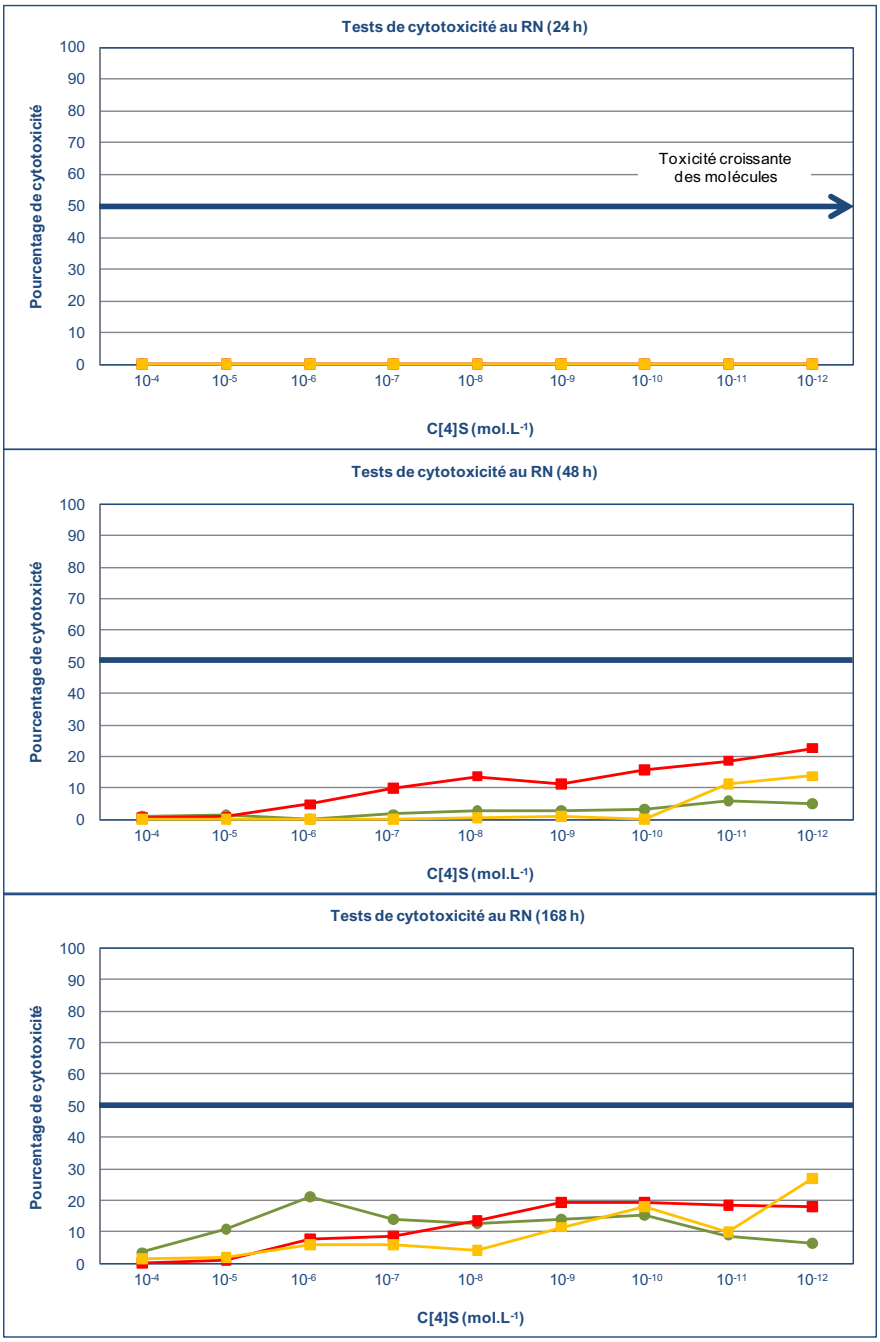


Figure 49 : Evaluation de la cytotoxicité induite sur les cellules L-132 par le C[4]S non filtré et après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-10 et G-25

Les graphiques représentent les moyennes des % de cytotoxicité obtenus, grâce aux tests RN, en présence de C[4]S non filtré et filtré, aux différents temps d'incubation 24 h, 48 h et 168 h. représente les moyennes (n = 3) des % de cytotoxicité obtenus avec le C[4]S sans filtration, gamme de 10^{-4} à 10^{-12} mol.L^{-1}. et représentent les moyennes (n = 3) des % de cytotoxicité obtenus avec des solutions de C[4]S à 10^{-3} mol.L^{-1} après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-10 et G-25, respectivement. Les concentrations en abscisse correspondent aux concentrations théoriques si le C[4]S n'était absolument pas retenu.

L'absence de différence entre l'absorbance du témoin cellule et celle des puits contenant les cellules avec du C[4]S signait l'absence de toxicité du C[4]S sur les cellules L-132 aux concentrations testées. Les CI_{50} et les CC_{50} étaient, par conséquent supérieures, à 10^{-4} mol.L^{-1}, ce qui fait du C[4]S une molécule potentiellement intéressante (Tableau 21).

Des tests d'évaluation de la toxicité du C[4]S après filtration sur colonnes de Séphadex™ ont tout de même été menés. La masse moléculaire du C[4]S étant de 1069,80 g.mol^{-1}, soit à la limite supérieure de la capacité de rétention de la Séphadex™ G-10 et à la limite inférieure de celle de la Séphadex™ G-25, l'évaluation biologique de la rétention d'une solution de C[4]S à 10^{-3} mol.L^{-1} a été effectuée sur les deux types de colonnes de Séphadex™, G-10 et G-25 (Figure 48 et Figure 49). Les CI_{50} et les CC_{50}, étaient toutes supérieures à 10^{-4} mol.L^{-1} (Tableau 21).

	CI_{50}			CC_{50}		
	24 h	48 h	168 h	24 h	48 h	168 h
C[4]S (n = 3)	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$
C[4]S à 10^{-3} mol.L^{-1} après filtration sur Séphadex™ :						
G-10 (n = 3)	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$
G-25 (n = 3)	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$

Tableau 21 : Moyennes des CI_{50} et des CC_{50} obtenues pour le C[4]S non filtré et après filtration sur les cellules L-132

Les moyennes des CI_{50} et des CC_{50} obtenues pour le C[4]S non filtré sont représentées ci-dessus. Les moyennes des CI_{50} et des CC_{50} obtenues avec les solutions de C[4]S à 10^{-3} mol.L^{-1} après filtration sur nos colonnes de Séphadex™ G-10 et G-25 sont également représentées.

Comme nous pouvions le présumer, le C[4]S n'étant pas toxique pour les cellules L-132, il ne l'était pas non plus après filtration sur colonnes de Séphadex™. Une méthode physico-chimique de quantification de la rétention de cette molécule, et plus généralement de molécules non toxiques, trouve ici tout son intérêt.

3.1.2 Taux de rétention du C[4]S

3.1.2.1 Détermination des paramètres spectrophotométriques du C[4]S

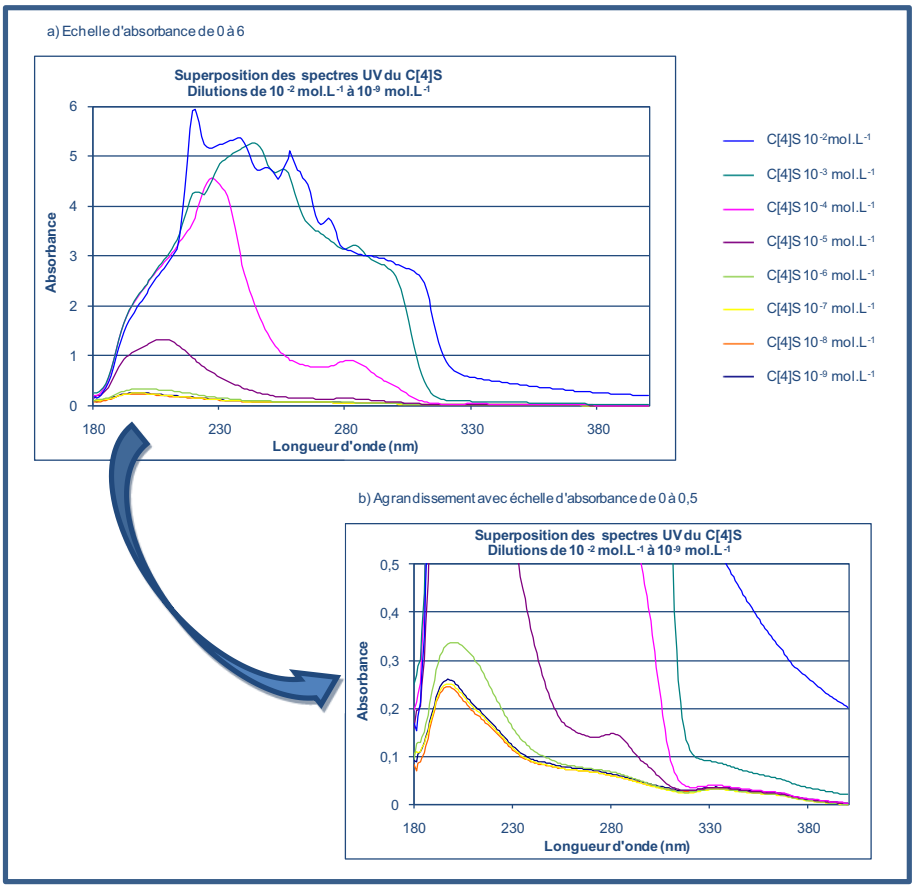


Figure 50 : Spectres d'absorption de dilutions du C[4]S, lot dialysé, de 10^{-2} à 10^{-9} mol.L^{-1}

Une première gamme assez large, i.e. de 10^{-2} à 10^{-9} mol.L^{-1}, a été établie pour définir les limites supérieures et inférieures de détection du C[4]S (Figure 50). Ainsi, il a été mis en évidence qu'au-dessus de 10^{-4} mol.L^{-1}, la loi de Beer-Lambert n'était plus respectée (perte de linéarité) et donc que le dosage de solutions à des concentrations supérieures n'était pas acceptable par spectrophotométrie UV-visible. Par ailleurs, la limite inférieure de détection apparaissait être de 10^{-6} mol.L^{-1}. De cette première gamme, ressortaient également deux pics d'absorption maximale, l'un aux environs de 200 nm, non spécifique, et l'autre aux environs de 280 nm (Figure 50 et Annexe 3, 3, Tableau V). Pour préciser la longueur d'onde exacte du pic caractéristique, aux environs de 280 nm, ainsi que le coefficient d'absorption molaire spécifique lui correspondant, une deuxième gamme, plus précise de 10^{-4} à 10^{-6} mol.L^{-1} a été réalisée (Figure 51).

Cette gamme a confirmé les résultats précédents. La longueur d'onde d'absorption maximale a été calculée en faisant la moyenne des longueurs d'onde observées pour les absorptions maximales et a

alors été définie à 282 nm (Annexe 3, 3, Tableau VI). L'analyse de régression (Annexe 4, 3.1) a permis d'établir la valeur du coefficient d'absorption molaire spécifique, soit $\varepsilon_{dialysé} = 8{,}22.10^{3}$ $L.cm^{-1}.mol^{-1}$, avec un coefficient de détermination R^2 de 1.

Deux lots de C[4]S différents, l'un dialysé et l'autre non, ayant été utilisés au cours de ce travail, ces expériences ont été réitérées sur le lot non dialysé. Ceci permettait de s'assurer de la reproductibilité des expériences, malgré la différence de purification des échantillons. Ces résultats sont représentés dans la Figure 52 et les valeurs obtenues sont indiquées dans l'Annexe 3, 3, Tableau VII. L'analyse statistique a également été réalisée (Annexe 4, 3.2). Elle a permis de définir, avec un coefficient de détermination R^2 de 0,0997, la valeur du coefficient d'absorption molaire spécifique de ce lot, soit $\varepsilon_{non\ \ dialysé} = 9{,}29.10^{3}$ $L.cm^{-1}.mol^{-1}$ à 282 nm, qui s'est révélée être toujours la longueur d'onde d'absorption maximale. Dans un souci de précision, ce coefficient sera pris comme valeur d'ε pour les expériences suivantes utilisant le lot non dialysé.

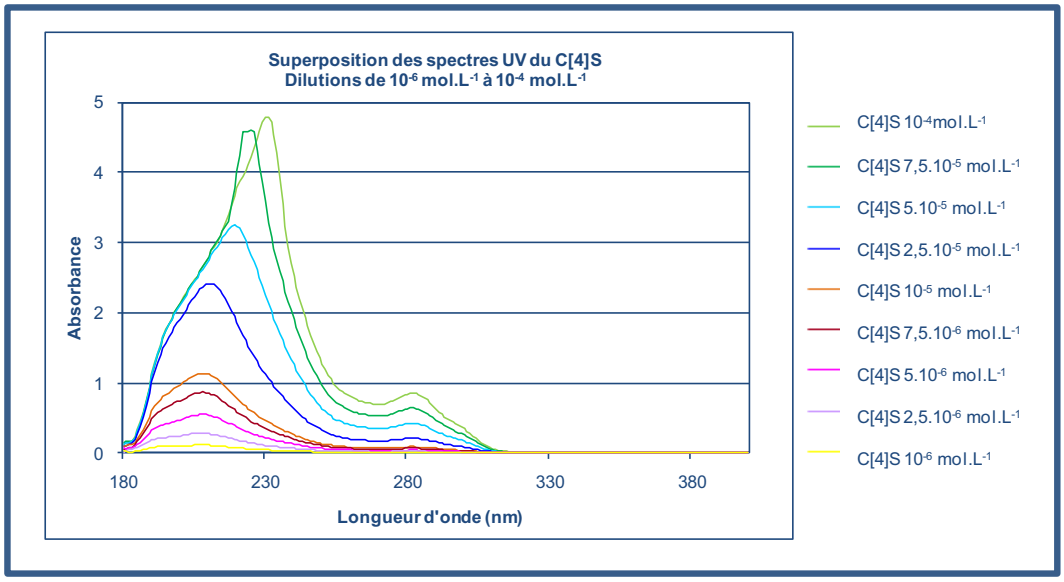


Figure 51 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible de dilutions de C[4]S, lot dialysé, de 10^{-4} à 10^{-6} $mol.L^{-1}$

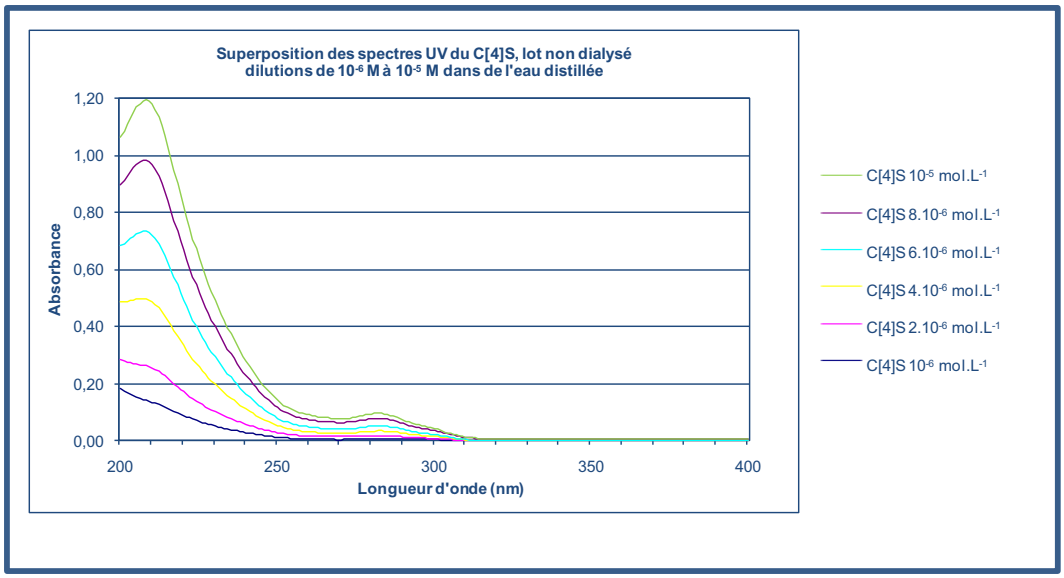


Figure 52 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible de dilutions de C[4]S, lot non dialysé, de 10^{-5} à 10^{-6} mol.L^{-1}

3.1.2.2 Taux de rétention par les colonnes de Séphadex™ G-25

Suite à l'obtention de ces résultats, le taux de rétention du C[4]S a été estimé, en commençant par celui des colonnes de Séphadex™ G-25. Les résultats sont représentés dans la Figure 53. Il est apparu, comme pour la CHX et l'HXM, que la solution à 10^{-2} mol.L^{-1} ne semblait pas retenue. Ceci a été confirmé par les valeurs d'absorbance observées très proches, avec et sans filtration sur colonnes de Séphadex™ G-25 (Tableau 22). De plus, la concentration estimée par la valeur d'absorbance obtenue pour la concentration 10^{-2} mol.L^{-1} sans filtration, était de $3{,}68.10^{4}$ mol.L^{-1} et, a confirmé la non-linéarité de la relation A = f(c) au-delà de 10^{-4} mol.L^{-1}. Pour les concentrations en C[4]S de 10^{-3} mol.L^{-1} et de 10^{-4} mol.L^{-1}, les taux de rétention par les colonnes de Séphadex™ G-25 étaient de (93,89 ± 0,47)% et de (88,52 ± 0,73)%, respectivement (Tableau 22).

Devant ces résultats, deux constats pouvaient être faits. D'une part, les limitations de la technique, déjà évoquées plus haut (Résultats, 2.3.2.2, p. 158 et Résultats, 2.3.2.2, p.172), ont induit le calcul d'un taux de rétention plus faible pour la concentration 10^{-4} mol.L^{-1} que pour la concentration 10^{-3} mol.L^{-1}. Le taux de rétention de la solution à 10^{-3} mol.L^{-1} a donc été retenu comme taux de rétention représentatif. D'autre part, même si ces taux de rétention étaient satisfaisants, notamment grâce à la faible, voire nulle, cytotoxicité du C[4]S (Résultats, 3.1.1, p.176), il étaient légèrement plus faibles que ceux obtenus pour la CHX ou l'HXM, sur les colonnes de Séphadex™ G-25 et G-10, respectivement. Or les masses moléculaires du C[4]S, i.e. 1016,24 g.mol^{-1} et 1069,80 g.mol^{-1} pour les lots non dialysés et dialysés respectivement, étaient très proches des limites de rétention des gels de

Séphadex™ G-10 et G-25. La même expérience a donc été répétée sur les colonnes de Séphadex™ G-10 pour comparaison.

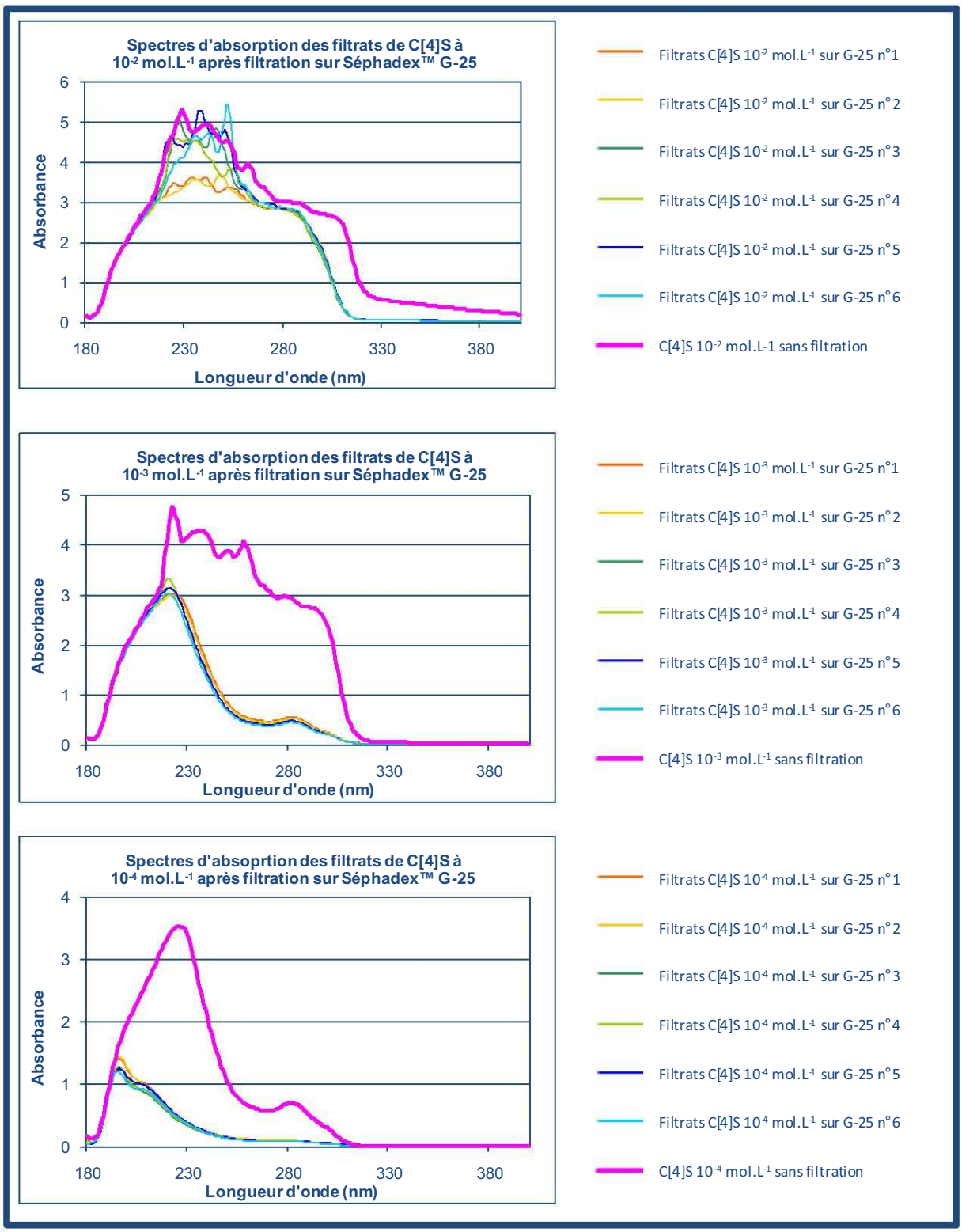


Figure 53 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible de filtrats (sur Séphadex™ G-25) de solutions de C[4]S, lot dialysé, à 10^{-2}, 10^{-3} et 10^{-4} mol.L^{-1}

Solutions de C[4]S filtrées sur colonnes de Séphadex™ G-25 et comparaison aux spectres de C[4]S obtenus sans filtration

Concentration des solutions de C[4]S, dialysé, filtrées sur Séphadex™ G-25	A à 282 nm	C estimée	TR (%)
10^{-2} mol.L^{-1}			
lot 1, colonne 1	2,8121	3,42.10^{-4}	NC
lot 1, colonne 2	2,8028	3,41.10^{-4}	NC
lot 2, colonne 1	2,8212	3,43.10^{-4}	NC
lot 2, colonne 2	2,8597	3,48.10^{-4}	NC
lot 3, colonne 1	2,8454	3,46.10^{-4}	NC
lot 3, colonne 2	2,8646	3,48.10^{-4}	NC
Moyenne		**3,45.10^{-4}**	**NC**
Ecart-type		**3,08.10^{-6}**	**NC**
10^{-2} mol.L^{-1} [a]	*3,0307*	*3,68.10^{-4}*	*X*
10^{-3} mol.L^{-1}			
lot 1, colonne 1	0,5624	6,83.10^{-5}	93,17
lot 1, colonne 2	0,5354	6,51.10^{-5}	93,50
lot 2, colonne 1	0,486	5,91.10^{-5}	94,09
lot 2, colonne 2	0,4925	5,99.10^{-5}	94,02
lot 3, colonne 1	0,4862	5,91.10^{-5}	94,09
lot 3, colonne 2	0,4549	5,53.10^{-5}	94,47
Moyenne		**6,11.10^{-5}**	**93,89**
Ecart-type		**4,73.10^{-6}**	**0,47**
10^{-4} mol.L^{-1}			
lot 1, colonne 1	0,0964	1,17.10^{-5}	88,28
lot 1, colonne 2	0,1042	1,27.10^{-5}	87,34
lot 2, colonne 1	0,0901	1,10.10^{-5}	89,05
lot 2, colonne 2	0,0892	1,08.10^{-5}	89,16
lot 3, colonne 1	0,0975	1,18.10^{-5}	88,16
lot 3, colonne 2	0,0893	1,09.10^{-5}	89,15
Moyenne		**1,15.10^{-5}**	**88,52**
Ecart-type		**7,30.10^{-7}**	**0,73**

Tableau 22 : Analyse des spectres UV-visibles obtenus lors de la filtration sur colonnes Séphadex™ G-25, de solutions de C[4]S, lot dialysé, à 10^{-2}, 10^{-3} et 10^{-4} mol.L^{-1}

Les absorbances à 282 nm sont mentionnées ainsi que les concentrations estimées et enfin figurent les taux de rétention des différentes dilutions testées, calculées selon l'Équation 4.
[a] L'absorbance à 282 nm d'une solution de C[4]S à 10^{-2} mol.L^{-1} sans filtration est donnée à titre indicatif.
NC : Non calculable

3.1.2.3 Taux de rétention par les colonnes de Séphadex™ G-10

Le taux de rétention du C[4]S par les colonnes de Séphadex™ G-10 a donc également été évalué. Les spectres sont représentés dans la Figure 54 et les valeurs obtenues dans le Tableau 23. Ces expériences ont été menées conjointement avec les deux lots de travail de C[4]S, le lot dialysé et le lot non dialysé. Il est d'ailleurs précisé, chaque fois que nécessaire, de quel lot il s'agit.

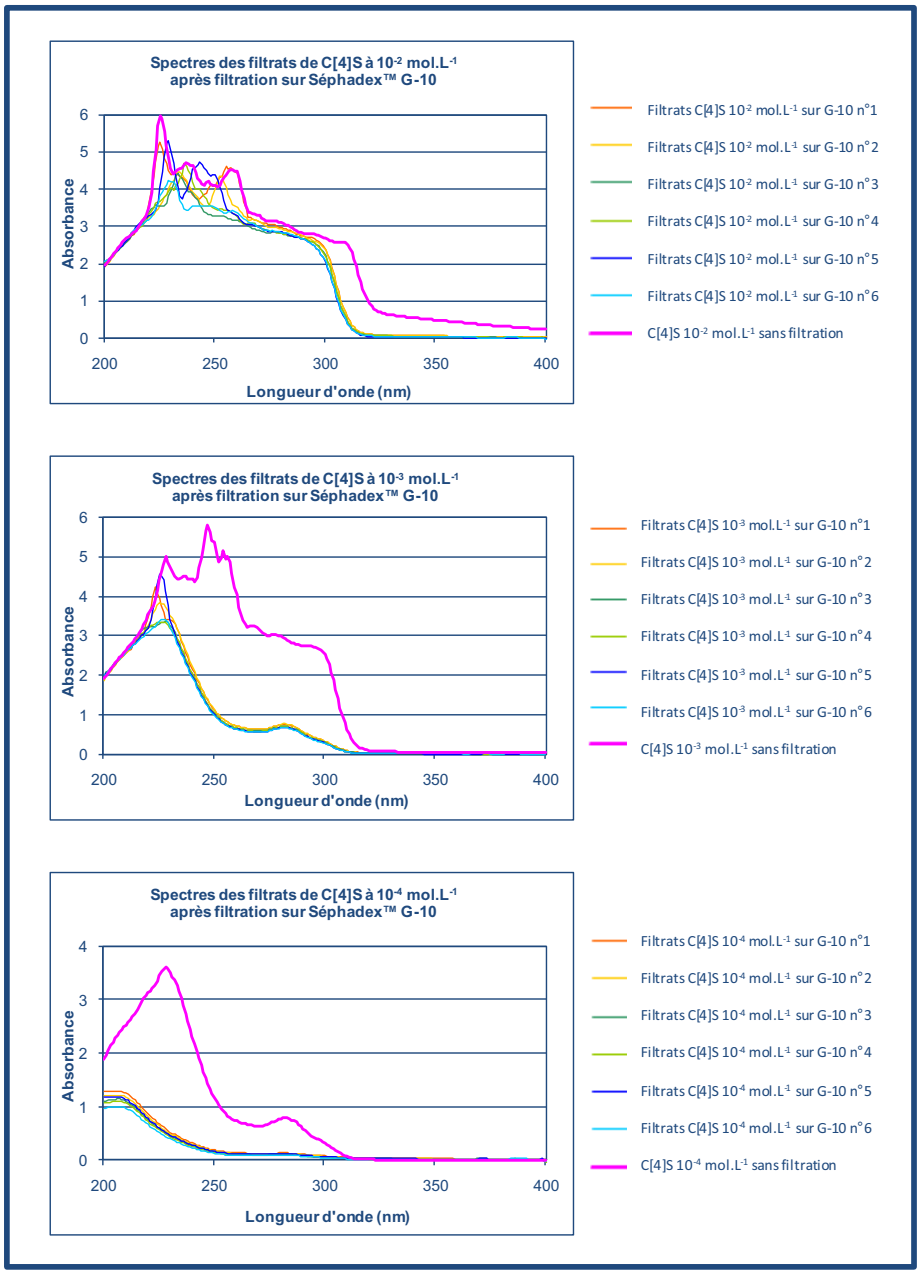


Figure 54 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible de filtrats (sur Séphadex™ G-10) de solutions de C[4]S à 10^{-2}, 10^{-3} et 10^{-4} mol.L^{-1}

Solutions de C[4]S filtrées sur colonnes de Séphadex™ G-10 et comparaison aux spectres de C[4]S obtenus sans filtration. Les filtrats n°1 et n°2 pour chaque concentration appartiennent au même lot et correspondent à l'échantillon de C[4]S dialysé. Les filtrats n°3 et 4 (lot 2) ainsi que les filtrats n°5 et 6 (lot 3) correspondent à l'échantillon non dialysé.

Les concentrations ont été estimées grâce aux analyses de régression propres à chaque lot et l'analyse UV a révélé des comportements similaires entre les deux lots. Les résultats obtenus étaient très proches de ceux obtenus avec les colonnes de Séphadex™ G-25. La solution à 10^{-2} mol.L^{-1} n'était pas retenue et les taux de rétention des solutions à 10^{-3} mol.L^{-1} et à 10^{-4} mol.L^{-1} étaient, respectivement, de (91,98 ± 0,97)% et de (87,68 ± 2,38)%.

L'écart entre les taux de rétention du C[4]S par les deux types de colonnes étant très faible, le modèle de colonne de Séphadex™ G-25 a été choisi, pour la suite des expériences, de façon arbitraire.

Concentration des solutions de C[4]S filtrées sur Séphadex™ G-10	A à 282 nm	C estimée	TR (%)
10^{-2} mol.L^{-1}			
lot 1, dialysé, colonne 1	2,9305	$3,56.10^{-4}$	NC
lot 1, dialysé, colonne 2	2,0858	$2,53.10^{-4}$	NC
lot 2, non dialysé, colonne 1	2,7807	$2,99.10^{-4}$	NC
lot 2, non dialysé, colonne 2	2,7806	$2,99.10^{-4}$	NC
lot 3, non dialysé, colonne 1	2,8129	$3,02.10^{-4}$	NC
lot 3, non dialysé, colonne 2	2,8105	$3,02.10^{-4}$	NC
Moyenne		**$3,02.10^{-4}$**	**NC**
Ecart-type		**$3,27.10^{-5}$**	**NC**
10^{-2} mol.L^{-1} dialysé[(a)]	*3,0505*	*$3,71.10^{-4}$*	*X*
10^{-2} mol.L^{-1} non dialysé[(a)]	*2,9191*	*$3,14.10^{-4}$*	*X*
10^{-3} mol.L^{-1}			
lot 1, dialysé, colonne 1	0,7570	$9,20.10^{-5}$	90,80
lot 1, dialysé, colonne 2	0,7675	$9,33.10^{-5}$	90,67
lot 2, non dialysé, colonne 1	0,7076	$7,60.10^{-5}$	92,4
lot 2, non dialysé, colonne 2	0,7022	$7,54.10^{-5}$	92,46
lot 3, non dialysé, colonne 1	0,6791	$7,30.10^{-5}$	92,7
lot 3, non dialysé, colonne 2	0,6682	$7,18.10^{-5}$	92,82
Moyenne		**$8,03.10^{-5}$**	**91,98**
Ecart-type		**$9,74.10^{-6}$**	**0,97**
10^{-4} mol.L^{-1}			
lot 1, dialysé, colonne 1	0,1291	$1,57.10^{-5}$	84,30
lot 1, dialysé, colonne 2	0,1195	$1,45.10^{-5}$	85,50
lot 2, non dialysé, colonne 1	0,1075	$1,15.10^{-5}$	88,50
lot 2, non dialysé, colonne 2	0,1003	$1,08.10^{-5}$	89,20
lot 3, non dialysé, colonne 1	0,1126	$1,21.10^{-5}$	87,90
lot 3, non dialysé, colonne 2	0,0867	$9,31.10^{-5}$	90,69
Moyenne		**$1,23.10^{-5}$**	**87,68**
Ecart-type		**$2,38.10^{-6}$**	**2,38**

Tableau 23 : Analyse des spectres UV-visibles obtenus lors de la filtration sur colonnes de Séphadex™ G-10, de solutions de C[4]S à 10^{-2}, 10^{-3} et 10^{-4} mol.L^{-1}

Les absorbances à 282 nm sont mentionnées ainsi que les concentrations estimées et enfin figurent les taux de rétention des différentes dilutions testées, calculées selon l'Équation 4.
Le lot 1 correspond au lot dialysé et les lots 2 et 3 correspondent aux lots non dialysés.
[(a)] L'absorbance à 282 nm d'une solution de C[4]S à 10^{-2} mol.L^{-1} sans filtration est donnée à titre indicatif.
NC : Non Calculable

3.1.3 Activité ATS-D du C[4]S sur le HCoV 229E

Après avoir montré d'une part la non toxicité du C[4]S sur les cellules L-132 (Résultats, 3.1.1, p.176) et un taux de rétention de 93% par les colonnes de Séphadex™ G-25 pour les solutions à 10^{-3} mol.L^{-1}, les tests de virucidie proprement dits ont été mis en œuvre. L'activité virucide du C[4]S sur le HCoV 229E a tout d'abord été évaluée pour la concentration 10^{-3} mol.L^{-1} et après des temps de contact de 30 et 60 min. Chaque expérience a été réalisée en triplicat.

Les contrôles de non rétention du HCoV 229E ont été validés, i.e. 0,3 $\log_{10}$ de différence entre les titres viraux que ce soit pour les temps de contact 30 min et 60 min. Les contrôles de neutralisation de la solution à 10^{-3} mol.L^{-1} de C[4]S ont quant eux montré une différence de 0,3 $\log_{10}$ et ont également été validés (Tableau 24). Les contrôles de cytotoxicité n'ont montré aucun signe d'altération du tapis cellulaire.

L'activité virucide du C[4]S sur le HCoV 229E à 10^{-3} mol.L^{-1} a alors été évaluée. Il n'a cependant montré qu'un faible pouvoir virucide, très loin du seuil de la réduction de 4 $\log_{10}$ imposé. Le C[4]S n'a, en effet, induit qu'une diminution de 0,5 $\log_{10}$ après 30 min de contact et de 0,6 $\log_{10}$ après 60 min (Figure 55). De la même façon que pour l'HXM, l'investigation des propriétés ATS de l'HXM sur le HCoV 229E n'a donc pas été poursuivie plus avant.

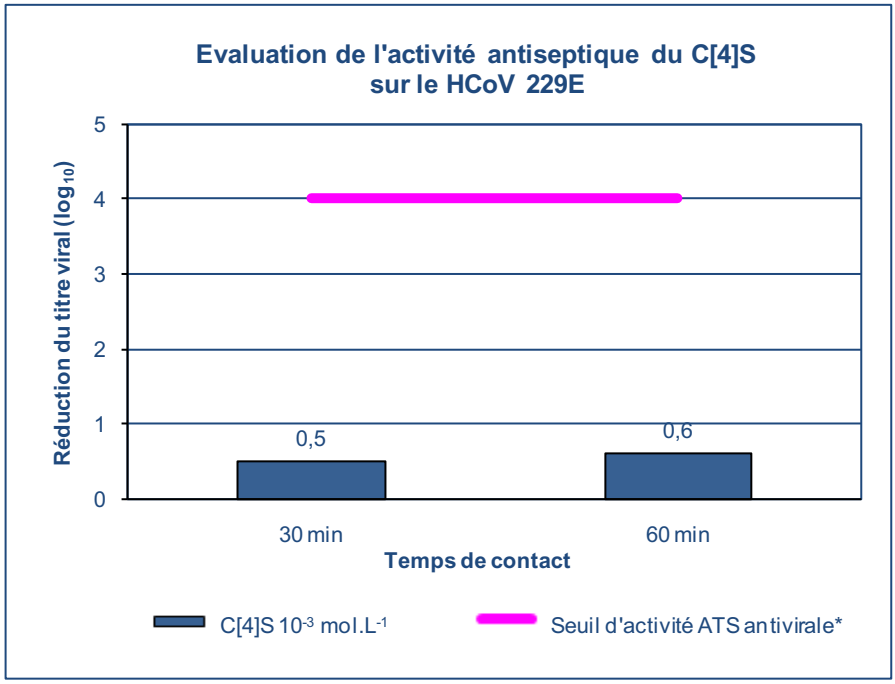


Figure 55 : Evaluation de l'activité ATS-D du C[4]S sur le HCoV 229E

(*Seuil défini par la norme Européenne NF EN 14476+A1)

Contrôle de la non rétention du HCoV par les colonnes de Séphadex™ G-25 lors des tests effectué avec le C[4]S aux différents temps de contact			
Temps de contact (min)	Titre viral sans filtration (log_{10})	Titre viral sans filtration (log_{10})	Différence (log_{10})
30	5,6 ± 0,1	5,2 ± 0,0	**0,3 ± 0,2**
60	5,6 ± 0,1	5,4 ± 0,1	**0,3 ± 0,1**
Contrôle de la neutralisation de l'activité antivirale potentielle de du C[4]S par filtration sur colonne de Séphadex™ G-25			
Concentrations du C[4]S testées	Titre viral sans filtration (log_{10})	Titre viral sans filtration (log_{10})	Différence (log_{10})
C[4]S à 10^{-3} mol.L^{-1}	5,6 ± 0,1	5,7 ± 0,4	**0,3 ± 0,2**

Tableau 24 : Résultats des contrôles effectués lors des tests de l'évaluation de l'activité ATS-D anti-coronavirus du C[4]S

Les résultats correspondent à la moyenne des résultats obtenus lors de chaque expérience validée.

3.2 Evaluation de l'activité ATS-D anti-coronavirus du C[4]S-BTZ

La même méthodologie que pour les molécules précédentes, a été appliquée. La masse moléculaire du C[4]S-BTZ étant de 1436,31 g.mol^{-1}, le modèle de colonne de Séphadex™ G-25 a été retenu pour les expériences menées avec cette molécule.

3.2.1 Cytotoxicité du C[4]S-BTZ sur les cellules L-132

Des tests de viabilité et de cytotoxicité (Matériels et Méthodes, 2.4, p.116) ont été réalisés pour une gamme de concentrations de 10^{-4} à 10^{-12} mol.L^{-1}. Les résultats sont représentés dans la Figure 56 et la Figure 57. Le C[4]S-BTZ ne présentait pas non plus de cytotoxicité sur les cellules L-132, i.e il n'existait pas de différence entre les absorbances obtenues pour le témoin cellule et les cellules en présence de C[4]S-BTZ, que ce soit dans les tests MTT ou dans les tests au RN. Les CI_{50} et les CC_{50} étaient toutes supérieures à 10^{-4} mol.L^{-1} (Tableau 25).

Par la suite, ces tests ont été répétés sur une solution de C[4]S-BTZ à 10^{-3} mol.L^{-1} après filtration sur Séphadex™ G-25 (Figure 56 et Figure 57) et la non toxicité des filtrats a pu être confirmée, avec des CI_{50} et des CC_{50} supérieures à 10^{-4} mol.L^{-1}.
L'évaluation physico-chimique par spectrophotométrie UV-visible permettra de définir plus précisément les taux de rétention du C[4]S-BTZ par les colonnes de Séphadex™ G-25.

	CI_{50}			CC_{50}		
	24 h	48 h	168 h	24 h	48 h	168 h
C[4]S-BTZ (n = 3)	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$
C[4]S-BTZ après filtration sur Séphadex™ G-25 (n = 3)	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$

Tableau 25 : Moyennes des CI_{50} et des CC_{50} obtenues pour le C[4]S-BTZ non filtré et après filtration sur les cellules L-132

Les moyennes des CI_{50} et des CC_{50} obtenues pour le C[4]S-BTZ non filtré sont représentées ci-dessus. Les moyennes des CI_{50} et des CC_{50} obtenues avec les solutions de C[4]S-BTZ à 10^{-3} mol.L^{-1} après filtration sur nos colonnes de Séphadex™ G-25 sont également représentées.

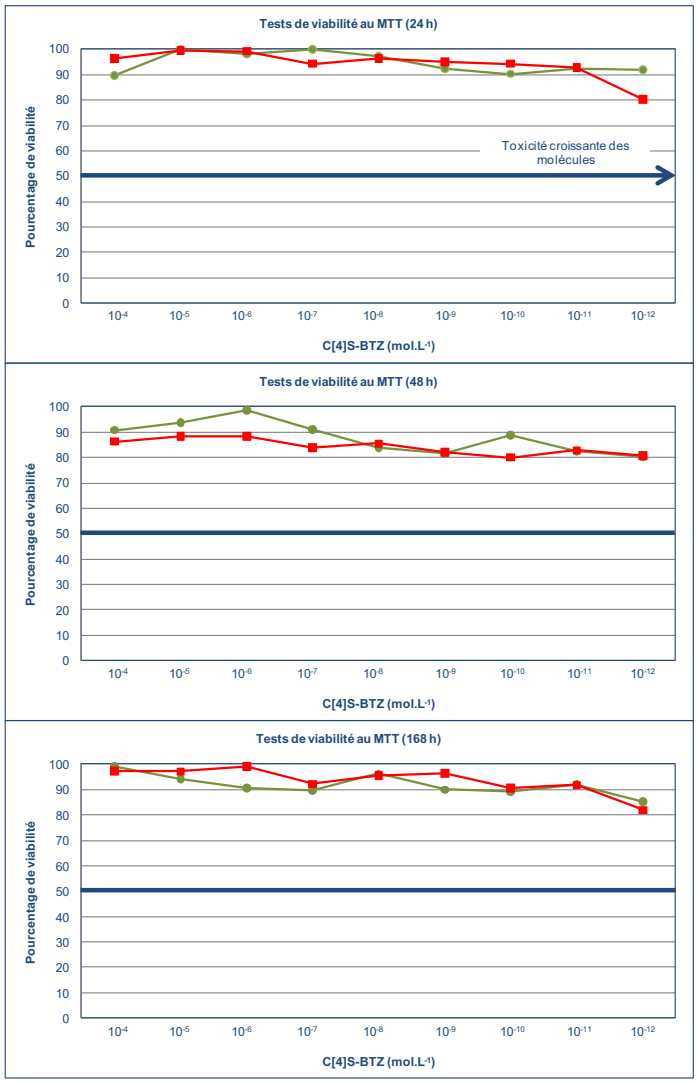


Figure 56 : Evaluation de la viabilité cellulaire en présence de C[4]S-BTZ non filtré et après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-25

Les graphiques représentent les moyennes des % de viabilité des cellules obtenus, grâce aux tests MTT, en présence de C[4]S-BTZ non filtré et filtré, aux différents temps d'incubation 24 h, 48 h et 168 h. représente les moyennes (n = 3) des % de viabilité obtenus avec le C[4]S-BTZ sans filtration, gamme de 10^{-4} à 10^{-12} mol.L^{-1}. représentent les moyennes (n = 3) des % de viabilité obtenus avec des solutions de C[4]S-BTZ à 10^{-3} mol.L^{-1} après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-25. Les concentrations en abscisse correspondent aux concentrations théoriques si le C[4]S-BTZ n'était absolument pas retenu par les colonnes de Séphadex™ G-25.

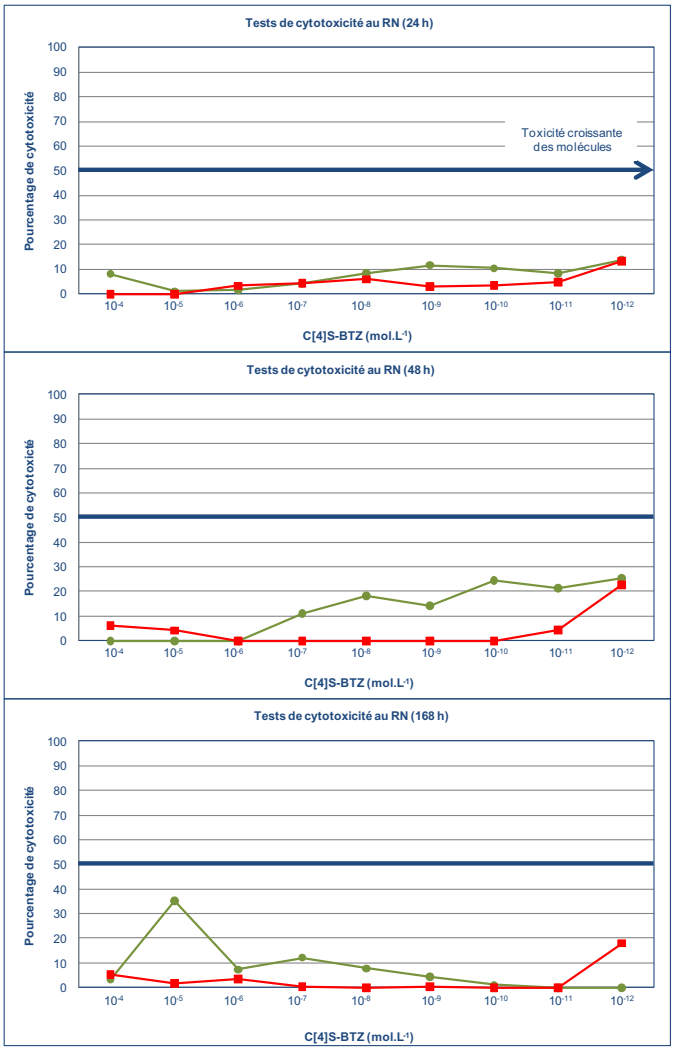


Figure 57 : Evaluation de la cytotoxicité induite sur les cellules L-132 par le C[4]S-BTZ non filtré et après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-25

Les graphiques représentent les moyennes des % de cytotoxicité obtenus, grâce aux tests RN, en présence de C[4]S-BTZ non filtré et filtré, aux différents temps d'incubation 24 h, 48 h et 168 h. représente les moyennes (n = 3) des % de cytotoxicité obtenus avec le C[4]S-BTZ sans filtration, gamme de 10^{-4} à 10^{-12} mol.L^{-1}. représente les moyennes (n = 3) des % de cytotoxicité obtenus avec des solutions de C[4]S-BTZ à 10^{-3} mol.L^{-1} après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-25. Les concentrations en abscisse correspondent aux concentrations théoriques si le C[4]S-BTZ n'était absolument pas retenu par les colonnes.

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

3.2.2.1 Détermination des paramètres spectrophotométriques du C[4]S-BTZ

Comme pour les autres molécules, les mesures spectrophotométriques pour le C[4]S-BTZ ont tout d'abord été effectuées sur une première gamme large, de 10^{-2} à 10^{-9} mol.L^{-1}. Ces résultats préliminaires montraient, qu'au-dessus de 10^{-3} mol.L^{-1}, les valeurs d'absorbance sortaient des limites d'acceptation de la loi de Beer-Lambert. La limite inférieure de détection, à 10^{-4} mol.L^{-1}, semblait plus haute que pour les molécules précédentes. De plus, deux pics d'absorbance maximale ont été observés dont un aux environs de 200 nm, n'ayant pas été considéré comme un pic caractéristique du C[4]S-BTZ. Le second pic, aux environs de 330 nm, a été défini plus précisément sur la seconde gamme, ainsi que le coefficient d'absorption molaire caractéristique associé.

Cette deuxième gamme (Figure 58) a confirmé le pic d'absorption maximale à 330 nm et la relation semblait linéaire jusqu'à 10^{-4} mol.L^{-1} (Annexe 3, 4, Tableau VIII). L'analyse de régression (Annexe 4, 4) a alors montré que la relation était en fait linéaire jusqu'à 10^{-6} mol.L^{-1}. Le coefficient d'absorption molaire ε était de $2{,}07.10^{4}$ L.cm^{-1}.mol^{-1}.

3.2.2.2 Taux de rétention par les colonnes de Séphadex™ G-25

Comme pour les autres molécules, la solution à 10^{-2} mol.L^{-1} n'était pas retenue par les colonnes de Séphadex™ G-25 (Figure 59 et Tableau 26).

Par ailleurs, pour les solutions à 10^{-3} mol.L^{-1} et à 10^{-4} mol.L^{-1}, les taux de rétention étaient de (94,90 ± 1,04)% et de (99,40 ± 0,05)%, respectivement. L'activité ATS-D sur le HCoV 229E a donc pu être évaluée.

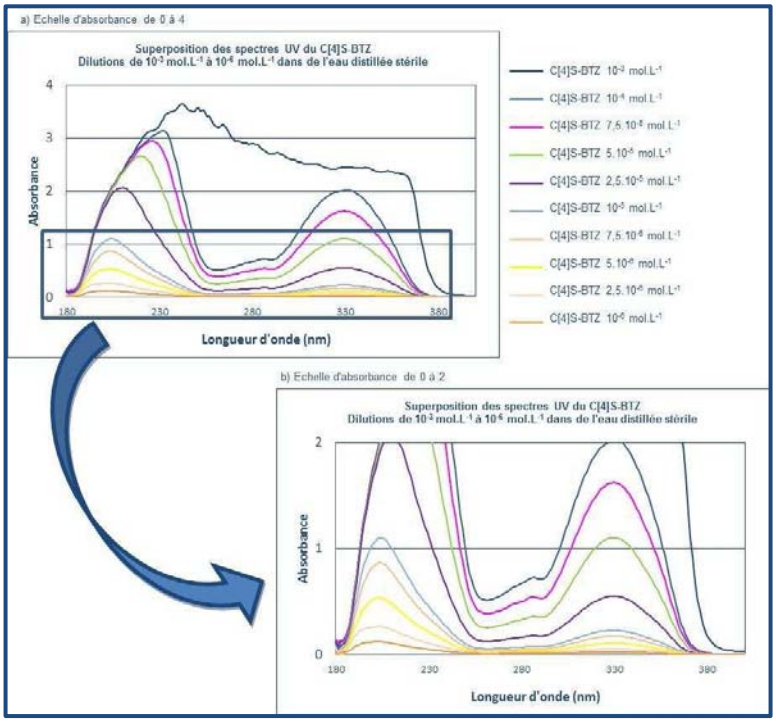


Figure 58 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible de dilutions de C[4]S-BTZ de 10^{-3} à 10^{-6} mol.L^{-1}

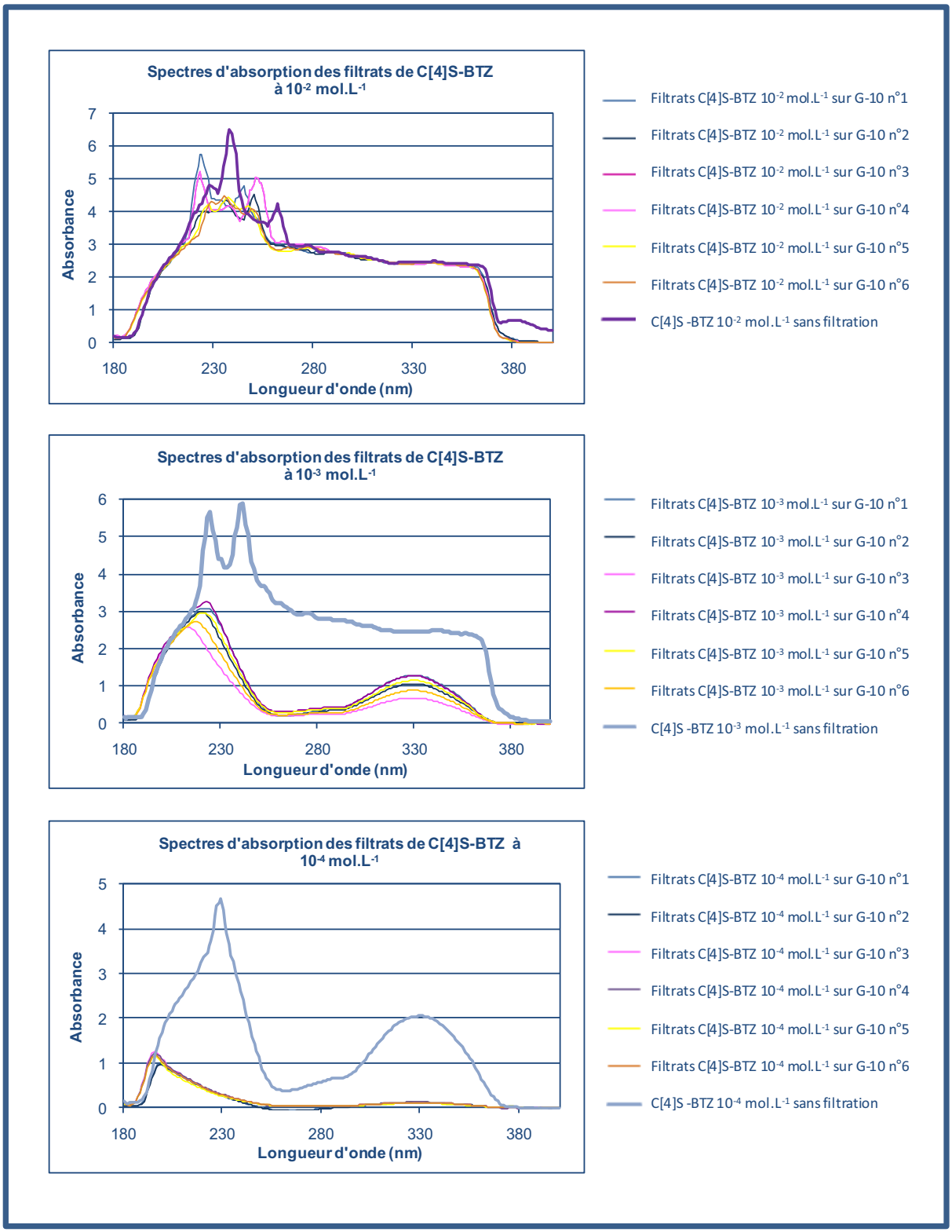


Figure 59 : Spectres d'absorption dans l'UV-visible de filtrats (sur Séphadex™ G-25) de solutions de C[4]S-BTZ à 10^{-2}, 10^{-3} et 10^{-4} mol.L^{-1}

Solutions de C[4]S-BTZ après filtration sur colonnes de Séphadex™ G-25 et comparaison aux spectres de C[4]S-BTZ obtenus sans filtration

Concentration des solutions de C[4]-BTZS filtrées sur Séphadex™ G-25	A à 330 nm	C estimée	TR (%)
10^{-2} mol.L^{-1}			
lot 1 colonne 1	2,4513	$1,19.10^{-4}$	NC
lot 1 colonne 2	2,4322	$1,18.10^{-4}$	NC
lot 2 colonne 1	2,4269	$1,17.10^{-4}$	NC
lot 2 colonne 2	2,4269	$1,17.10^{-4}$	NC
lot 3 colonne 1	2,4281	$1,17.10^{-4}$	NC
lot 3 colonne 2	2,4281	$1,17.10^{-4}$	NC
Moyenne		**$1,18.10^{-4}$**	**NC**
Ecart-type		**$4,22.10^{-7}$**	**NC**
10^{-2} mol.L^{-1}[(a)]	*2,4648*	*$1,19.10^{-4}$*	*X*
10^{-3} mol.L^{-1}			
lot 1 colonne 1	1,2862	$6,22.10^{-5}$	93,8
lot 1 colonne 2	1,0588	$5,12.10^{-5}$	94,9
lot 2 colonne 1	0,6815	$3,30.10^{-5}$	96,7
lot 2 colonne 2	1,2697	$6,14.10^{-5}$	93,9
lot 3 colonne 1	1,1465	$5,55.10^{-5}$	94,5
lot 3 colonne 2	0,8813	$4,26.10^{-5}$	95,7
Moyenne		**$5,10.10^{-5}$**	**94,9**
Ecart-type		**$1,04.10^{-5}$**	**1,0**
10^{-4} mol.L^{-1}			
lot 1 colonne 1	0,1126	$5,45.10^{-6}$	99,5
lot 1 colonne 2	0,1272	$6,15.10^{-6}$	99,4
lot 2 colonne 1	0,1256	$6,08.10^{-6}$	99,4
lot 2 colonne 2	0,1293	$6,25.10^{-6}$	99,4
lot 3 colonne 1	0,1050	$5,08.10^{-6}$	99,5
lot 3 colonne 2	0,1247	$6,03.10^{-6}$	99,4
Moyenne		**$5,84.10^{-6}$**	**99,4**
Ecart-type		**$4,67.10^{-7}$**	**0,0**

Tableau 26 : Analyse des spectres UV-visibles obtenus lors de la filtration sur les colonnes Séphadex™ G-25, de solutions de C[4]S-BTZ à 10^{-2}, 10^{-3} et 10^{-4} mol.L^{-1}

Les absorbances à 330 nm sont mentionnées ainsi que les concentrations estimées et enfin figurent les taux de rétention des différentes dilutions testées, calculées selon l'Équation 4.
[(a)] L'absorbance à 330 nm de solutions de C[4]S-BTZ à 10^{-2} et à 10^{-3} mol.L^{-1} sans filtration est donnée à titre indicatif.
NC : Non Calculable

3.2.3 Activité ATS-D du C[4]S-BTZ sur le HCoV 229E

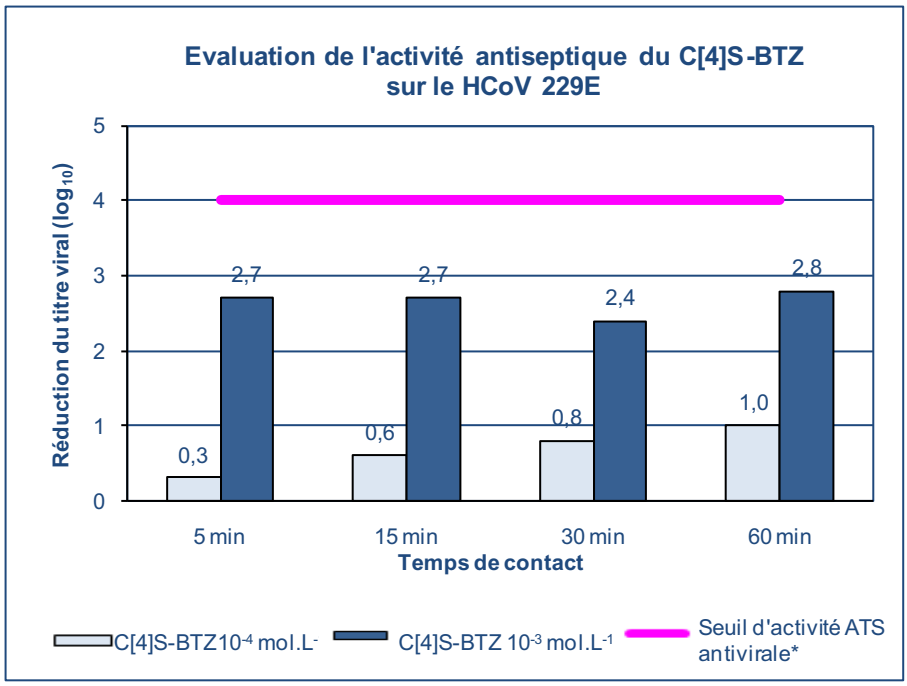


Figure 60 : Evaluation de l'activité ATS-D du C[4]S-BTZ sur le HCoV 229E

(*Seuil défini par la norme Européenne NF EN 14476+A1)

Le C[4]S-BTZ n'avait montré, dans les expériences préalables, aucune toxicité sur les cellules L-132 (Résultats, 3.2.1, p.188). Les contrôles de neutralisation ont par la suite montré que l'activité potentielle du C[4]S-BTZ à 10^{-3} mol.L^{-1} a été neutralisée : en effet, la différence entre les titres viraux était de 0,4 $\log_{10}$. Pour la solution à 10^{-4} mol.L^{-1}, la différence était de 0,2 $\log_{10}$ et donc tous les contrôles de neutralisation ont été validés (Tableau 27). L'efficacité de la neutralisation était d'autant plus visible à la lecture des résultats concernant l'activité virucide du C[4]S-BTZ.

Le C[4]S-BTZ a été testé à 10^{-4} mol.L^{-1} et 10^{-3} mol.L^{-1} et pour des temps de contact de 5 min, 15 min, 30 min et 60 min. Chaque expérience a été réalisée en triplicat. Les contrôles de non rétention du HCoV 229E ont été validés, i.e. 0,3 ; 0,3 ; 0,3 et 0,2 $\log_{10}$ de différence entre les titres viraux pour les temps de contact de 5 min, 15 min, 30 min et 60 min, respectivement (Tableau 27). De même, 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 prometteurs. En effet, à 10^{-3} mol.L^{-1}, le C[4]S-BTZ a induit une réduction de 0,3 ; 0,6 ; 0,8 et 1 $\log_{10}$ pour les temps 5 min, 15 min, 30 min et 60 min, respectivement.

A 10^{-4} mol.L^{-1}, il a induit une réduction de 2,7 ; 2,7 ; 2,4 et 2,8 log_{10} pour les mêmes temps de contact (Figure 60).

L'activité du C[4]S-BTZ s'est révélée être temps-dépendante à 10^{-4} mol.L^{-1}, alors qu'à 10^{-3} mol.L^{-1}, l'activité virucide atteint son maximum dès cinq minutes de contact.

Ainsi, même si le seuil de 4 log_{10} n'a pas été atteint, l'activité virucide du C[4]S-BTZ est équivalente à celle de la CHX, induisant une diminution de 3 log_{10} à 10^{-3} mol.L^{-1} et 60 min de temps de contact (Résultats, 2.2.3, p.163), mais avec une action plus rapide. En effet, la CHX n'induit qu'une réduction de 1,4 log_{10} à 10^{-3} mol.L^{-1} et 5 min de contact.

Le C[4]S-BTZ nous a alors paru être une molécule potentiellement très intéressante de par son activité antivirale mais aussi par sa non cytotoxicité.

Contrôles de la non rétention du HCoV par les colonnes de Séphadex™ G-25 lors des tests effectué avec le C[4]S-BTZ aux différents temps de contact			
Temps de contact (min)	Titre viral sans filtration (log_{10})	Titre viral sans filtration (log_{10})	Différence (log_{10})
5	6,1 ± 0,5	6,0 ± 0,4	0,3 ± 0,2
15	6,1 ± 0,5	5,9 ± 0,4	0,3 ± 0,2
30	6,0 ± 0,5	5,9 ± 0,5	0,3 ± 0,2
60	6,0 ± 0,5	6,0 ± 0,3	0,2 ± 0,1
Contrôles de la neutralisation de l'activité antivirale potentielle du C[4]S-BTZ par filtration sur colonne de Séphadex™ G-25			
Concentrations du C[4]S-BTZ testées	Titre viral sans filtration (log_{10})	Titre viral sans filtration (log_{10})	Différence (log_{10})
C[4]S-BTZ à 10^{-4} mol.L^{-1}	6,2 ± 0,3	6,1 ± 0,2	0,2 ± 0,2
C[4]S-BTZ à 10^{-3} mol.L^{-1}	5,9 ± 0,6	5,8 ± 0,7	0,4 ± 0,1

Tableau 27 : Résultats des contrôles effectués lors des tests de l'évaluation de l'activité ATS-D anti-coronavirus du C[4]S-BTZ

Les résultats correspondent à la moyenne des résultats obtenus lors de chaque expérience validée.

DISCUSSION

Deux constats fondamentaux ont amené à initier ce projet :

- (i) la nécessité d'une ATS antivirale efficace et adaptée, devant le nombre croissant d'ILS virales, l'émergence inévitable de nouveaux virus et la carence persistante en traitements antiviraux spécifiques,
- (ii) le besoin de méthodes d'évaluation de cette activité ATS antivirale, fiables, standardisées et répondant aux réalités d'utilisation.

L'étude du versant normatif de cette problématique est inéluctable. Ce dernier permet de définir le cadre de l'évaluation de l'activité des ATS-D, mais n'est, en ce qui concerne l'activité virucide, qu'insuffisant.

Notre premier objectif était donc de développer une méthode se proposant d'apporter des améliorations à la seule norme Européenne existante dans ce domaine. Nous avons ainsi mis au point et validé une méthodologie, en prenant comme virus modèle le HCoV 229E, choix qui sera commenté au cours de ce chapitre.

Le deuxième objectif découlait de l'apport, encore relativement pauvre, de la littérature sur l'activité antivirale des ATS-D. Ainsi, afin de participer à l'accroissement des connaissances dans ce domaine, nous avons estimé l'activité de la CHX et de l'HXM à l'encontre du HCoV 229E. Ceci nous a également permis de vérifier la fonctionnalité du protocole développé.

Enfin, bien que nombreux et variés, les ATS-D commercialisés présentent des inconvénients notables, dont la toxicité. Certains d'entre eux, malgré une efficacité démontrée, sont, ou sont en voie, d'être écartés d'une utilisation courante de part les risques qu'ils engendrent. Le développement de nouvelles molécules anti-infectieuses étant l'un des objectifs de notre équipe, nous avons mis à l'essai deux calixarènes, tant au niveau de leur cytotoxicité que de leur potentiel virucide.

Ce dernier chapitre a pour vocation de permettre une meilleure compréhension des enjeux et difficultés inhérentes à l'ATS antivirale ainsi que des différents choix ayant guidé ce travail.

Nous opterons pour un abord chronologique des étapes cruciales lors de la mise en œuvre de tests virucides à visée ATS-D. Ainsi, nous exposerons les critères de choix, de même que les avantages et inconvénients selon les options choisies, des paramètres suivants : (i) type de test, (ii) modèle viral, (iii) méthode de neutralisation et contrôles à effectuer et enfin (iv) environnement physico-chimique. Les différentes recommandations normatives seront également examinées.

Suite à cette discussion, nous aborderons l'apport de cette étude dans l'amélioration et/ou le renouvellement de l'arsenal thérapeutique préventif à notre disposition.

1 L'évaluation de l'activité ATS antivirale : Enjeux et difficultés

1.1 Finalité du produit testé : *Comment choisir le type de test* ?

Les différents types de tests (Bibliographie, 1.3, p.13), qu'ils soient en suspension, sur support ou encore sur les mains de volontaires sains n'apportent pas les mêmes niveaux de preuve quant à l'activité virucide des ATS-D chimiques.

Les tests en suspension sont faciles à mettre en œuvre mais ne sont pas assez représentatifs de l'activité réelle du produit. En effet, les virus étant trouvés, à l'état naturel, prisonniers dans des matières organiques et/ou adsorbés sur des surfaces, les résultats apportés par les tests sur support sont plus pertinents pour prédire l'activité des germicides en conditions réelles d'utilisation. Des études comparatives ont en effet montré que les virus sont effectivement plus facilement inactivés dans les tests en suspension que dans les tests sur support (Sattar S.A. et Springthorpe V.S., 2001). Ainsi, les tests en suspension conviennent très bien pour des études de criblage de molécules en développement mais doivent être suivis de tests sur support pour définir plus précisément l'activité du produit dans les conditions d'usage prévues.

Du côté Européen, la seule norme existante propose un test en suspension. L'évolution de ces normes doit aller dans le sens de développement de tests sur support pour représenter de façon plus précise les conditions d'usage. Chez les Américains, une norme précisant les conditions d'un test sur support existe depuis 1996. Ils ont également publié en 2002 un protocole utilisant la pulpe des doigts de volontaires sains pour tester l'activité des ATS destinés à l'hygiène des mains.

Dans les tests sur support, la nature de ce dernier devra bien évidemment être précisée. En effet, les temps de survie varient d'un virus à l'autre, d'un type de support à un autre et également en fonction des conditions environnementales. De plus, dans ce genre de test, il est crucial de connaître les taux de survie après séchage et de faire des contrôles appropriés pour ne pas surestimer l'activité du produit testé à cause d'une perte de pouvoir infectieux induite par le séchage. Il pourrait être intéressant, par exemple, de savoir quelle est l'efficacité d'un ATS-D si on l'applique sur un tissu, comme par exemple un masque chirurgical. Or, il a été montré que dans la plupart des cas, les virus survivent très mal sur ce genre de support et la perte de pouvoir infectieux induite uniquement par le produit testé peut difficilement être évaluée.

Au cours de ce projet, la méthode de filtration sur colonnes de Séphadex™ G-25 et G-10 a été développée et optimisée en faisant appel à une méthode en suspension. Cette méthode de

neutralisation a cependant la vocation d'être "universelle", i.e. d'être applicable aux autres formes de tests comme les tests sur support ou les tests sur les mains.

Quel que soit le test choisi, un critère d'efficacité doit être défini, et ce pour un type de microorganisme donné. Par exemple, en ce qui concerne l'activité ATS antivirale, le critère d'efficacité est une réduction de 3 $\log_{10}$ chez les Américains et de 4 $\log_{10}$ chez les Européens.
Ce critère d'efficacité permet non seulement de fixer le seuil à partir duquel un produit peut prétendre à une activité ATS-D mais également d'uniformiser l'expression des résultats, nécessaire à leur comparaison. En effet, comme cela est illustré dans le Tableau 29, ceux-ci peuvent être exprimés en pourcentage de perte de pouvoir infectieux, en différence de $\log_{10}$ ou encore en nombre de plaques selon les auteurs.
Ce critère doit, de toute façon, être cohérent avec les doses infectieuses virales rencontrées en pratique. Ces dernières peuvent assez largement variées selon la souche virale et son mode de propagation. En général, les inocula viraux, contaminant les surfaces et/ou les mains, d'un virus ayant un mode de transmission féco-orale, sont en général plus importants que ceux d'un virus à transmission plus étroite, comme une transmission respiratoire. Cependant, peu de données sont encore disponibles à ce sujet.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que, quel que soit le type de test, il est impossible de déterminer l'activité virucide d'un produit non dilué. En effet, une dilution est toujours pratiquée par addition de l'inoculum et/ou de la substance interférente. Cependant, selon les recommandations de la norme NF EN 14476+A1, un ATS-D utilisé sous forme non diluée est soumis à essai en concentration de 80% et doit passer cet essai avant toute évaluation supplémentaire.

1.2 Problème de la représentativité : *Comment choisir le modèle viral* ?

1.2.1 Critères de choix et inoculum

L'évaluation de l'activité ATS, 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.

Critères de choix

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 en titrage par plages de lyse, (iii) pouvoir survivre dans différentes conditions environnementales, comme sur les surfaces inertes ou les mains, et que cela soit prouvé et enfin (iv) ne pas nécessiter de niveau de confinement élevé et ne pas engendrer de risques pour le manipulateur (Sattar S.A*., et al.*, 2003, Sattar S.A*., et al.*, 1989). Le choix des souches testées doit également répondre à la finalité du test : est-ce que ces souches doivent 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, comme cela vient d'être évoqué, 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 toutefois 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^{-1}. Les normes Américaines recommandent, quant à elles, des titres d'environ 10^6 particules infectieuses.mL^{-1} pour les tests en suspension (norme E1052-96) et des titres de 10^7 à 10^8 particules infectieuses.mL^{-1} pour les tests sur support. (norme E1053-97).

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 limite, la limite de détection du HCoV 229E obtenue au cours de notre étude est de 5.10^2 particules infectieuses.mL^{-1}, soit 2,7 $\log_{10}$. Il est donc nécessaire que les titres viraux soit au moins égaux à 6,7 $\log_{10}$, soit 5.10^6 particules infectieuses.mL^{-1}. Ceci correspond quasiment aux titres que nous obtenions avec le HCoV 229E, bien que la moyenne générale soit très légèrement inférieure, i.e $4{,}2.10^6$ particules infectieuses.mL^{-1}.

1.2.2 Avantages et inconvénients des différents modèles viraux

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, un *Picornavirus* - le *poliovirus de* type 1, souche LSc-2ab – et un *Adenovirus* – l'*adenovirus* de type 5, souche adenoïde 75 (ATCC VR-5). Pour la désinfection chimiothermique, il est recommandé d'utiliser le *parvovirus bovin*, souche Haden (ATCC VR-767). Cependant, cette norme propose, en annexe, une liste de virus, non exhaustive, pouvant contaminer les instruments utilisés en médecine Humaine, les mains ou les surfaces et classés selon les tissus et fluides biologiques dans lesquels on peut les retrouver. Cette liste comporte également des virus enveloppés.

Les normes Américaines, que ce soit celle pour l'évaluation de l'activité ATS 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 poliovirus de type 1 pour représenter les virus les plus résistants, un herpesvirus, pour les plus facilement inactivés et un adénovirus, de résistance intermédiaire. Elles proposent également d'autres types viraux, en suggérant les lignées cellulaires pour les cultiver. Il s'agit du virus de l'hépatite A, de l'HSV-1, du cytomégalovirus Humain, de l'adénovirus de type 2, de l'influenzavirus de type A, du RSV, du vaccinia virus (*Poxviridae*), du rhinovirus et enfin du rotavirus. 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.

Ci-dessous sont décrits les principales caractéristiques, avantages et inconvénients, des différents modèles viraux, à prendre en compte pour guider le choix de la souche virale à tester.

1.2.2.1 Virus nus

Les virus nus sont connus pour être plus résistants, que ce soit dans l'environnement ou sous l'action d'ATS-D chimiques, que les virus enveloppés. Une étude de Lloyd-Evans et coll. a montré que, sur 27 formulations, dont l'activité était évaluée par des tests sur support, seules 9 (33,3%) étaient efficaces sur le rotavirus Humain (critère d'efficacité de 3 $\log_{10}$ de réduction). En comparant leur résultats à ceux obtenus par Springthorpe et coll. lors de tests en suspension, certaines formulations montrant une très bonne activité en suspension sur le rotavirus, même en présence de substances organiques en forte quantité, se sont révélées inactives lors des tests réalisés sur support, comme par exemple l'éthanol à 95% et à 70% (Lloyd-Evans N. *et al.*, 1986, Springthorpe V.S*., et al.*, 1986).

Ainsi, les virus nus nécessiteront pour leur inactivation des produits plus actifs et/ou des concentrations plus élevées de produits pour leur inactivation que des virus enveloppés.

Parmi les virus nus, le poliovirus a été très largement utilisé dans les tests d'ATS-D antivirale, notamment pour sa résistance élevée aux produits chimiques, sa stabilité par rapport aux acides, aux solvants des lipides et à la plupart des détergents.
Cependant, il est très probablement appelé à être abandonné malgré l'intérêt dû à cette résistance. En effet, ce n'est plus un virus couramment rencontré en pathologie Humaine, et ce grâce au programme d'éradication de la poliomyélite lancé par l'OMS depuis 1988. Sa manipulation en laboratoire n'apparaît alors pas des plus judicieuses, bien qu'il s'agisse de la souche vaccinale.

Un autre virus nu potentiellement intéressant et cité par les normes, qu'elles soient Américaines ou Européennes, est l'adénovirus. Les nombreux sérotypes d'adénovirus infectant l'Homme sont responsables de maladies respiratoires, oculaires et entériques. Ils sont également à l'origine d'ILS notamment chez les patients immunodéprimés. Ils sont considérés comme de résistance intermédiaire aux ATS-D. Ils sont relativement sensibles à la dessiccation.

D'autres virus nus ne sont pas non plus dénués d'intérêt et répondent aux critères précédemment cités.
Le virus de l'hépatite A par exemple 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. Ils est plutôt résistant à l'action des ATS-D et sa survie dans l'environnement a été démontrée (Mbithi J.N*., et al.*, 1992, Mbithi J.N*., et al.*, 1990)
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 virus de l'hépatite A, à ce qui est appelé le "péril fécal". Sa survie dans l'environnement 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).
Les rhinovirus, enfin, sont de petits virus nus responsables d'infections respiratoires hautes en général bénignes mais qui peuvent se compliquer sur un terrain fragilisé. Ils ont également été imputés 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).

1.2.2.2 Virus enveloppés

Il est avéré, depuis longtemps, que les virus enveloppés sont plus facilement inactivés que les virus nus. Par exemple l'hypochlorite de sodium à 0,1% ou la PVP-I à 10%, soit 1% d'iode disponible, permettent d'inactiver des virus enveloppés comme le PIV-3 et le HCoV 229E mais pas des virus nus tels qu'un coxsackievirus ou un adénovirus de type 5 (Sattar S.A*., et al.*, 1989).

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. En effet, 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 classe de virus lors de l'évaluation de l'activité ATS-D antivirale, ce qu'a fait la norme Américaine avec un 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'épidémie. Cependant, leur contagiosité importante implique qu'ils sont fréquemment rencontrés en pathologie Humaine. Ils sont ainsi responsables d'infections variées, selon les souches. L'HSV-1 est le virus de l'herpès oral, oculaire et des atteintes cérébrales alors que le HSV-2 est responsables des herpes génitaux et des herpes du nouveau-né, pouvant être gravissime.

Un autre *Herpesviridae*, le cytomégalovirus Humain 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.

Les virus grippaux, bien qu'assez fragiles, sont également des virus intéressants à inclure dans ce genre de tests. Cela permettrait d'avoir, en cas de pandémie comme cela a été le cas récemment avec le virus (H1N1)v, des moyens efficaces pour limiter la propagation virale. L'inclusion de tels virus peut permettre le développement de produit à action ciblée et moins toxique.

Par ailleurs, un virus doit être évincé de ce genre d'évaluation : le HIV. En effet, ainsi que la norme NF EN 14476+A1 le préconise, le HIV n'est pas considéré comme un virus qui requiert d'être soumis à essai car il est extrêmement fragile. Malgré cela, un certain nombre de fabricants, pour des raisons de marketing évidentes, continuent de revendiquer des activités ATS-D à l'encontre de ce virus.

1.2.2.3 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.

Virus modèles animaux

Certains auteurs ont ainsi utilisés des virus modèles animaux. Par exemple, Sattar et coll. ont utilisé une souche de calicivirus félin, très proche du virus de Norwalk responsable de gastroentérites mais non cultivable en culture cellulaire (Sattar S.A*., et al.*, 2003). Un autre exemple avait été donné dans l'analyse bibliographique avec l'utilisation d'hepadnavirus de canard pour remplacer le virus de l'hépatite B (Bibliographie, 1.3.3, p.14). La norme NF EN 14476+A1 fait elle-même appel à un parvovirus bovin lors de l'évaluation de la désinfection chimiothermique.

Bactériophages

Certaines études et certaines normes, notamment la norme NF EN 13610 (AFNOR, 2003), font appel à des bactériophages comme virus modèles. Bien qu'il existe 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 cela relève plus des étapes préliminaires à de telles études.

L'utilisation de bactériophages a d'ailleurs donné lieu à des polémiques, comme la controverse existant entre Steinmann et Sickbert-Bennett. Steinmann (Steinmann J., 2005) a en effet assez sévèrement critiqué l'étude de Sickbert-Bennett réalisée sur l'efficacité virucide des solutions hydro-

alcooliques, en prenant comme modèle viral le bactériophage MS2. Sickbert-Bennett avait alors conclut que l'eau et le savon étaient finalement plus efficaces que les solutions hydro-alcooliques à l'encontre des virus nus (Sickbert-Bennett E.E. *et al.*, 2005). Steinmann a alors opposé différents arguments à ces résultats. Il avait été montré par le passé que le phage MS2 était résistant à l'éthanol à 70% à l'instar du poliovirus. A l'époque, il avait donc été suggéré que ce phage puisse être pris comme modèle de virus dans les tests d'ATS-D antivirale (Davies J.G. *et al.*, 1993, Jones M.V. *et al.*, 1991). Cependant, d'autres études ont largement prouvé l'efficacité des solutions hydroalcooliques sur les virus nus (rotavirus, poliovirus, virus de l'hépatite A), responsables d'infections, entre autres, nosocomiales en faisant appel aux protocoles sur la main entière ou sur la pulpe des doigts (Ansari S.A*., et al.*, 1989, Mbithi J.N*., et al.*, 1993, Steinmann J., 2005).

Cette controverse souligne l'importance de la représentativité des souches lors de l'établissement de l'activité virucide des ATS-D pour ne pas aboutir à des conclusions erronées, qui peuvent s'avérer extrêmement dangereuses.

1.2.3 Pourquoi le HCoV 229E ?

Le choix des souches, suscite, comme nous venons de le voir, un vif débat parmi les spécialistes. Il doit résulter d'une balance délicate entre les objectifs de l'ATS-D et les différents critères de choix que nous avons énoncés plus haut. Il nous a paru intéressant de tester la souche HCoV 229E, répondant à ces différents critères. Le coronavirus fait d'ailleurs partie de la liste en annexe de la norme NF EN 14476+A1 (voies respiratoires et gastro-intestinales).

Tout d'abord, il est impliqué dans des infections respiratoires hautes et basses, en générale bénignes mais qui peuvent se compliquer chez les personnes fragilisées (jeunes enfants, personnes âgées, patients immunodéprimés) ainsi que dans des infections nosocomiales (Bibliographie, 3.7, p.78).

Bien qu'enveloppé, sa survie dans différentes conditions et notamment sur des surfaces a été démontrée. Ainsi, nous avons vu que le HCoV 229E survivait, plus ou moins longtemps selon les conditions de température et d'humidité relative, avec une certaine préférence pour une humidité relative moyenne de l'ordre de 50% ou supérieure et des températures fraîches (Tableau 9, p.91). Cependant, sa résistance à la dessiccation est réelle mais plutôt faible, de l'ordre de trois heures (Bibliographie, 3.8, p.91).

Sa manipulation n'implique, de plus, pas de risque particulier pour l'usager et/ou l'environnement. Cependant, un désavantage de ce virus est que l'on ne peut pas obtenir de titres beaucoup plus élevés que 5.10^6 particules virales infectieuses.mL^{-1}.

Outre le fait de répondre à ces différents critères, le pouvoir évolutif des coronavirus (Bibliographie, 3.5, p.71) renforce l'intérêt d'inclure un tel virus dans les tests d'ATS-D antivirale. En effet, la possibilité non négligeable, et déjà vérifiée, de l'émergence de nouveaux coronavirus avec des pouvoirs pathogènes variés, et l'absence de traitement à leur encontre, engendre la nécessité de disposer de moyens de prévention efficaces. Or les données de la littérature sur la sensibilité des coronavirus aux ATS-D sont encore peu abondantes.
De plus, le SARS-CoV, dont la pathogénicité n'est plus à démontrer, requiert un niveau de confinement de niveau 3 et engendre des risques réels pour le manipulateur, illustrés par sa propagation nosocomiale et les contaminations de laboratoire (Bibliographie, 3.7.2, p.85). Il ne peut donc pas être pris comme virus de référence dans les tests d'ATS-D antivirale.
Le HCoV 229E s'est alors imposé comme un virus modèle très intéressant.

1.3 Garantie d'un test fiable et opérationnel : *Comment choisir la méthode de neutralisation et les contrôles incontournables* ?

Un des paramètres fondamentaux des tests d'ATS-D est le temps de contact, qui se doit précis et en général court. En effet, l'activité d'un ATS-D chimique doit être rapide. De plus, dans le cas particulier de l'ATS-D à visée virucide, non seulement l'activité du produit testé doit être stoppée à la fin du temps de contact désiré mais la cytotoxicité doit être éliminée afin de pouvoir mener une évaluation correcte de la réduction des titres viraux. L'étape cruciale est alors la neutralisation.

1.3.1 Temps de contact

Les temps de contact ne peuvent pas être établis de façon universelle. Ils doivent répondre à l'objectif final de l'ATS-D et refléter au plus près les conditions réelles d'utilisation.

La norme NF EN 14476+A1 propose différents temps de contact selon les conditions d'essai choisies. Pour la désinfection des surfaces, les temps de contact sont de 60 min, temps obligatoire imposé, et 5 min, 15 min et 30 min, temps facultatifs. Ainsi, au cours de ce travail, ces quatre temps de contact ont été testés. Cependant, un temps de contact de 60 min reflète assez peu les réelles pratiques

mises en œuvre pour la désinfection des surfaces. Les temps 5 min et 15 min, voire 30 min, semblent quant à eux, beaucoup mieux appropriés.
Pour le lavage et l'imprégnation hygiénique des mains, les temps obligatoires sont de 30 s ou 1 min avec un temps facultatif de 3 min. Ces temps sont tout à fait représentatifs des recommandations quant au lavage hygiénique et chirurgical des mains.
Enfin pour la désinfection chimiothermique, les temps de contact ne sont pas précisés et la norme propose de suivre les indications du fabriquant du produit testé.
Cependant, comme nous allons le voir au cours des paragraphes suivants, les méthodes de neutralisation suggérées par la norme ne peuvent garantir tous ces temps de contact, de par leur propre durée d'exécution.

Les normes Américaines ne proposent quant à elles aucun temps de contact particulier et conseillent de choisir un temps représentatif des conditions d'usage ou de suivre les recommandations du fabriquant. Ceci n'est sans doute pas assez précis pour une standardisation des essais et ces temps de contact doivent être précisés selon la finalité du produit.

De ce fait, le choix et les qualités intrinsèques de la méthode de neutralisation sont capitaux pour répondre à l'objectif souhaité.

1.3.2 Avantages et inconvénients des différentes méthodes

Selon les normes et les publications, différentes méthodes de neutralisation ont été décrites. Après une brève description, les avantages et inconvénients de chacune seront discutés en comparaison avec la méthode développée au cours de notre étude.

1.3.2.1 Neutralisation par dilution

La norme NF EN 14476+A1 recommande en méthode de neutralisation de première intention une dilution par transfert d'un échantillon dans neuf volumes de milieu de culture cellulaire, placé dans la glace fondante, pendant 30 min.

Comme nous l'avions évoqué dans la première partie de cet exposé (Bibliographie, 1.4.1, p.18), la dilution au 1/10ème (voire au 1/100ème comme la norme le conseille en cas d'inefficacité de la première dilution) n'est pas efficace dans un certain nombre de cas, notamment en cas de toxicité importante des composés testés. Une étude de Sizun et coll. illustre l'efficacité très partielle de la

méthode par dilution. En effet, les pouvoirs ATS-D de l'éthanol à 70%, d'une solution nettoyante pour les mains et de l'eau de javel à 5% n'avaient pas pu être testés à cause de la cytotoxicité de ces derniers, malgré les dilutions pratiquées, d'où une mésestimation de leur pouvoir ATS-D (Sizun J.*, et al.*, 2000).

Par ailleurs, il est nécessaire de laisser le mélange dilué dans de la glace fondante pendant 30 min, ce qui pose un problème évident quant au respect du temps de contact.

Enfin, un autre inconvénient non négligeable de la technique de neutralisation par dilution est la nécessité d'avoir des titres viraux très élevés, ce qui, comme dans le cas du HCoV 229E, est très difficile, voire impossible à obtenir. Certains procédés comme l'ultracentrifugation peuvent permettre d'augmenter les titres viraux mais ils peuvent aussi fragiliser les particules virales et provoquer leur agrégation.

1.3.2.2 Neutralisation chimique

Cette méthode présente des avantages pratiques indéniables, notamment l'arrêt immédiat de l'activité du produit, garantissant ainsi le temps de contact de façon précise. Elle a été utilisée par différents auteurs tels que Kariwa et coll. qui, lors d'une étude sur la survie du SARS-CoV et sa sensibilité à différents agents chimiques, ont neutralisé l'activité de produits contenant de la PVP-I par une solution de thiosulfate de sodium à 0,5% (Kariwa H.*, et al.*, 2006).

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 l'emploi de la méthode par neutralisation chimique.

Un des inconvénients majeurs de cette méthode de neutralisation réside dans la diversité chimique des ATS-D pouvant être testés. Il ne peut en effet exister un neutralisant idéal et universel. De plus, l'activité de nombreux ATS-D ne peut être stoppée de façon chimique. 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.

1.3.2.3 Neutralisation par filtration

La méthode par filtration, méthode que nous avons choisie d'explorer au cours de ce travail, présente de nombreuses variantes, développées dans les normes et autres publications.

La filtration sur gel peut être utilisée d'une façon générale avec deux objectifs principaux : (i) la séparation de groupes, où les composants d'un échantillon sont séparés en deux groupes majeurs, selon leur différence de taille moléculaire et (ii) le fractionnement de biomolécules, à haute résolution, qui permet l'isolement d'un ou plusieurs composants de l'échantillon. Lors de l'étape de neutralisation, l'objectif est bien la séparation en deux groupes, i.e. les virus d'un côté et l'ATS-D de l'autre. La première étape vers une séparation réussie est le choix adapté du gel. La résolution finale (c'est-à-dire la distance séparant les deux pics d'élution) résulte de différents facteurs notamment le volume de l'échantillon, le rapport entre le volume de l'échantillon et le volume de la colonne, les dimensions de la colonne, la taille des particules. Le choix du gel doit aussi dépendre de sa sélectivité c'est-à-dire de la gamme de masses moléculaires que le gel peut séparer (Figure 61).

La norme NF EN 14476+A1 propose ainsi, en cas d'échec de la neutralisation par dilution, deux autres méthodes : (i) le tamisage moléculaire ou filtration sur gel avec des colonnes de Séphadex™ LH-20 ou des colonnes prêtes à l'emploi MicroSpin™ S-400 HR ; (ii) l'ultrafiltration avec des systèmes comme Minicon®. Les produits cités dans la norme sont suggérés mais non imposés.

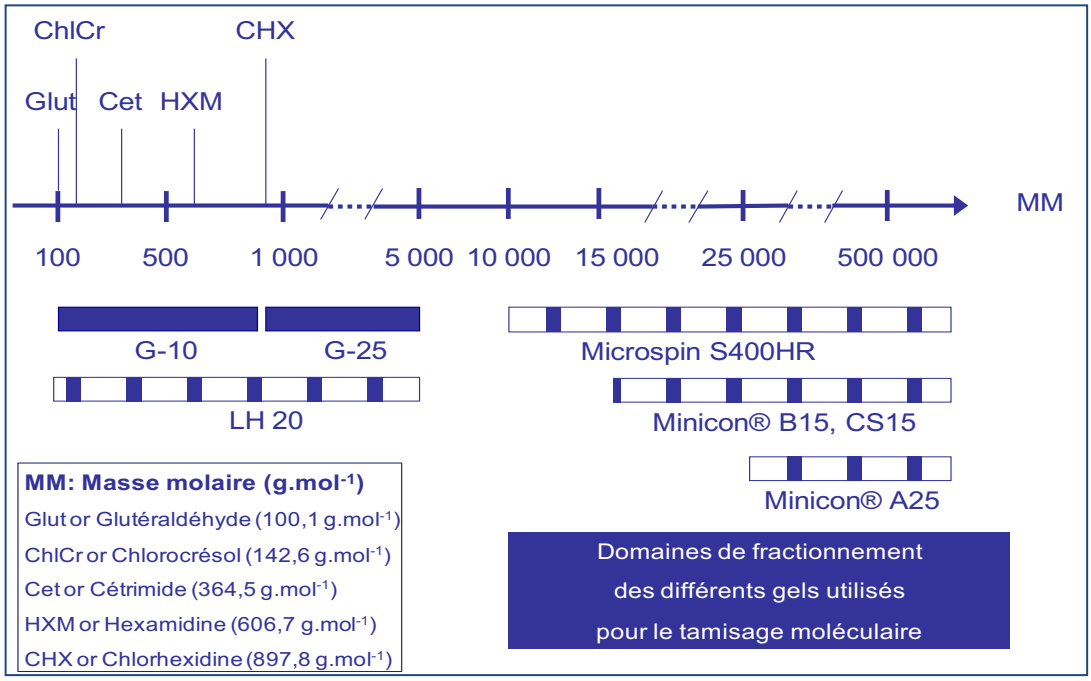


Figure 61 : Comparaison des différents domaines de fractionnement des gels utilisés dans la technique de neutralisation par tamisage moléculaire

Domaines de fractionnement des gels utilisés pour la neutralisation, en rapport avec la masse moléculaire d'ATS-D couramment utilisés.

Séphadex™ LH-20

La première méthode proposée par la norme NF EN 14476+A1 consiste en une filtration sur des colonnes de Séphadex™ LH-20.

Les modalités de préparation de la suspension de Séphadex™ et des colonnes sont précisées. Les gels de Séphadex™ sont préparés par mise en suspension de 22 g de Séphadex™ dans 100 mL de PBS puis autoclavage. Les colonnes sont ensuite obtenues par dépôt de 25 mL ou de 20 mL de la suspension de Séphadex™ obtenue précédemment dans des seringues stériles, suivi d'une centrifugation à 10000*xg* pendant 10 min. Les colonnes sont alors prêtes à l'emploi pour réaliser l'étape de neutralisation. Cette dernière consiste à déposer 1 mL de l'échantillon, i.e. suspension virale/ATS-D testé, en haut de la colonne, puis à soumettre l'ensemble à une centrifugation de 1000*xg* pendant 10 min.

Colonnes Microspin®

Les colonnes Microspin® permettent également une séparation basée sur le principe d'exclusion-diffusion. Elles sont constituées de résine Séphacryl™, qui peuvent avoir des pores de taille différentes selon le type de colonnes. Les colonnes Microspin® ont l'intérêt non négligeable, en terme de gain de temps de préparation, d'être des colonnes prêtes à l'emploi, mais ceci se répercute largement sur le coût, et multiplie environ par 10 le prix de revient des colonnes (Tableau 28). De plus, elles sont prévues pour recevoir des échantillons de 25 µL à 100 µL, ce qui est très faible et leur domaine de fractionnement semble moins adapté que les Séphadex™ présentées auparavant (Figure 61). Par ailleurs, l'étape de neutralisation à proprement parler, résultant également d'une centrifugation, nécessite 2 min.

Système Minicon®

La norme NF EN 14476+A1 évoque l'emploi de système Minicon® (Millipore) qui sont des systèmes prêts-à-l'emploi, très coûteux, permettant la concentration de solutés par une méthode, dans ce cas, d'ultrafiltration.

Ces systèmes, dont les modalités d'utilisation ne sont pas définies par la norme présentent des inconvénients majeurs : (i) ils sont non stériles et (ii) il n'y a pas de maîtrise du temps de neutralisation puisqu'il faut attendre la diffusion des molécules.

Enfin, certaines publications relatent l'utilisation d'une méthode de filtration sur membrane où, dans ce cas, ce sont les virus qui sont retenus par la membrane et l'ATS-D est éliminé. Des investigations complémentaires restent cependant à réaliser (Papageorgiou G.T.*, et al.*, 2001, Valot S. *et al.*, 2000).

1.3.2.4 Et Outre Atlantique ?

La méthode recommandée par les normes Américaines (ASTM, 1996, ASTM, 1997) en première intention est également une méthode par dilution au 1/10ème dans du milieu de culture ou un autre diluant (neutralisation chimique). En cas d'inefficacité de ces techniques, elles renvoient à une autre norme spécifique présentant une méthode par filtration sur gel comme moyen de neutralisation (ASTM, 2004). Cette norme soumet l'utilisation de Séphadex® LH-60-120 qui peut être substituée par de la Séphacryl® S-1000.

La méthode générale pour l'obtention des colonnes et la filtration du mélange virus/ATS-D suit les mêmes étapes que celles décrites ci-dessus, si ce n'est que le temps de centrifugation pour la séparation du mélange est de 3 min.

1.3.3 Pourquoi développer une nouvelle méthode de filtration sur gel ?

Optimisation du temps de l'étape de neutralisation

La méthode par filtration sur gel offre une alternative intéressante aux méthodes de dilution ou de neutralisation chimique. Cependant, celles proposées par la norme Européenne présentent des inconvénients majeurs, surtout quant à la garantie du temps de contact. En effet, les temps de neutralisation induits par : (i) la dilution à froid (30 min), (ii) la filtration sur gel de Séphadex™ LH-20 (10 min) ou (iii) l'ultrafiltration sur colonnes Microspin® (2 min) rendent difficile, voire impossible, de garantir des temps de contact inférieurs à 5 min, comme ceux indiqués pour l'évaluation de l'activité ATS de produits destinés au lavage des mains (30 s, 1 min ou 3 min). De la même façon, la technique de filtration sur gel développée dans les normes Américaines requiert une étape de centrifugation de 3 min (Tableau 28).

Ainsi, la méthode développée au cours de notre étude, même si l'étape de neutralisation à proprement parler nécessite 1 min, reste plus performante que les autres méthodes préconisées.

Sélectivité des gels choisis

En ce qui concerne les pouvoirs de séparation, il a déjà été évoqué que les capacités de fractionnement des colonnes microspin® semblent assez peu adaptées à la masse moléculaire de la majorité des ATS-D.

Cependant, la limite d'exclusion du gel de Séphadex™ LH-20, de 4000-5000 $g.mol^{-1}$ (Figure 61), n'est quant à elle, pas dénuée d'intérêt car elle doit théoriquement exclure les molécules dont la masse moléculaire est supérieure à 5000 $g.mol^{-1}$ et *a fortiori* les virus.

Nous avons choisi les gels de Séphadex™ G-10 et G-25, dont les capacités de rétention sont respectivement 100 – 1000 $g.mol^{-1}$ et 900 – 5000 $g.mol^{-1}$, pour améliorer la résolution de la séparation.

Des études comparatives sur les capacités de rétention de ces différents gels pourraient être intéressantes, notamment pour les molécules non ou peu retenues par le modèle de colonnes développé au cours de notre étude.

Coût

Les méthodes proposées par la norme NF EN 14476+A1 sont beaucoup plus coûteuses que celle développée au cours de notre étude.

En effet, la préparation des colonnes de Séphadex™ LH-20 nécessite tout d'abord 22 g pour 100 mL de PBS puis les colonnes sont préparées avec 25 mL ou 20 mL de gel. Ceci est beaucoup plus consommateur que le protocole proposé au cours de ce travail. Les gels sont en effet préparés avec 3 g de poudre de Séphadex™ dans 100 mL de PBS et les colonnes résultent du dépôt de seulement 1 mL de la suspension, ce qui diminue considérablement les coûts (Tableau 28).

Des obstacles subsistent…

Ainsi, même si notre méthode apporte des améliorations, non négligeables, en matière de rapidité, de diversité des molécules retenues et de coût, des inconvénients persistent toujours.

Tout d'abord, l'étape de neutralisation nécessite quand même 1 min, ce qui implique que pour des tests relatifs à l'ATS des mains et des temps de contact de 30 s, elle n'est pas applicable.

Méthodes de neutralisation	Temps nécessaire pour la neutralisation	Coût estimé
Dilution dans du milieu glacé[a]	30 min	
Séphadex™ LH-20[a]	10 min	300 €/100 g[b]
Microspin™ S400HR[a]	2 min	160 €/50 colonnes[b]
Minicon® (Millipore)[a]		
Minicon® B15	Non défini. L'étape de concentration doit être répétée jusqu'à complète élimination du produit testé. Peut durer plusieurs heures.	269 €/50 filtres[b]
Minicon® CS15		334 €/50 filtres[b]
Minicon® A25		334 €/50 filtres[b]
Séphadex™ LH-60[c]	3 min	X
Séphacryl S-1000 dans de l'eau osmosée avec 20% d'éthanol	3 min	420 €/750 mL
Séphadex™ G-25	1 min	169 €/100 g[b] (environ 700 colonnes)
Séphadex™ G-10	1 min	193 €/100 g[b] (environ 700 colonnes)

Tableau 28 : Comparaison des temps de neutralisation et du coût des différentes méthodes de neutralisation

[a] Méthodes proposes dans la norme Européenne NF EN 14476+A1
[b] Prix indicatifs donnés par les fournisseurs en 2008
[c] n'est plus disponible actuellement

Par ailleurs, il s'est avéré que les colonnes n'étaient pas capables de retenir toutes les molécules, notamment les toutes petites comme le glutaraldéhyde (Résultats, 2.1.3, p.147) 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.

De plus, les formulations d'ATS-D sont souvent complexes et il paraît difficile de retenir un mélange de molécules par les colonnes développées au cours de notre étude, bien que théoriquement ce ne soit pas impossible. Ces formulations complexes occasionnent d'ailleurs des difficultés quelle que soit la méthode de neutralisation choisie.

Enfin, il se produit un phénomène de saturation des colonnes de Séphadex™, indépendamment de la nature du gel, aux concentrations élevées ($\geq 10^{-2}$ mol.L^{-1}), phénomène que nous avons démontré pour les différentes molécules testées. Cependant, cela peut ne pas s'avérer trop handicapant car les ATS-D sont rarement utilisés à de telles concentrations. Peut-être que l'augmentation du volume des colonnes pourrait résoudre ce problème, si nécessaire.

1.3.4 De l'intérêt du couplage des méthodes

Suite aux précisions apportées ci-dessus, un constat s'impose, il ne peut exister de technique de neutralisation universelle. 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 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).
Dellanno et coll. ont, quant à eux, testé des agents ATS-D sur le MHV. Pour les produits trop toxiques pour être inoculés aux cellules après une dilution au 1/10ème, ils ont complété cette dernière avec une filtration sur gel, ce qui évitait une nouvelle dilution mais allongeait aussi le temps de contact (Dellanno C*., et al.*, 2009). D'autres auteurs encore ont couplé la méthode par dilution avec une méthode de filtration sur membrane pour réduire cette cytotoxicité et avoir ainsi accès aux activités ATS-D antivirales des composés testés (Rabenau H.F*., et al.*, 2005a)

Il faut ainsi selon les produits testés, et le modèle cellules/virus, trouver la meilleure combinaison possible.

1.3.5 Garantie de résultats fiables : *Quels sont les contrôles incontournables?*

En ce qui concerne les contrôles, la norme NF EN 14476+A1 recommande trois contrôles : (i) le contrôle de cytotoxicité par observation microscopique, (ii) le contrôle de sensibilité des cellules aux virus après action de l'ATS-D, c'est-à-dire le contrôle d'interférence, et (iii) le contrôle de neutralisation. Elle ne fait pas état d'étapes préliminaires. Or ces dernières sont très importantes notamment en cas de neutralisation par filtration. Elles permettent en premier lieu d'établir la gamme de toxicité de l'agent testé pour la lignée cellulaire choisie, qui peut varier largement selon le type cellulaire, par exemple lignée cellulaire de type continu ou non.

En cas de neutralisation par filtration, notre étude a montré la complémentarité des techniques biologiques et physico-chimiques préliminaires pour vérifier la rétention des molécules testées, notamment pour les molécules non toxiques, comme dans le cas des calixarènes. En effet, ces derniers n'étant pas toxiques pour la lignée cellulaire L-132 aux concentrations testées, la méthode par spectrophotométrie UV-visible nous a permis de mesurer le taux de rétention et d'éprouver les limites de nos colonnes alors qu'aucune cytotoxicité n'était visible.

Les contrôles inhérents aux tests d'ATS-D antivirale sont bien évidemment fondamentaux et ne peuvent pas être remplacés par ces tests préliminaires. Un exemple est donné lors des essais réalisés sur le C[4]S-BTZ où le contrôle de neutralisation a permis de s'assurer que l'activité du produit à 10^{-3} mol.L^{-1} était bien stoppée alors que le taux de rétention n'était que de 53% et qu'il ne présentait pas de cytotoxicité.

Nous n'avons pas inclus le contrôle positif, prévu par la norme NF EN 14476+A1, permettant de valider le système. En effet, la norme recommande l'utilisation du formaldéhyde ou de toute autre molécule ayant démontré son activité sur le virus testé. Or les produits ayant montré une activité anti-coronavirus (Bibliographie, 3.9, p.96) ont soit une masse moléculaire trop faible pour être retenus par nos colonnes de Séphadex™ (hypochlorite de sodium, masse moléculaire = 74,4 g.mol^{-1} ; éthanol, masse moléculaire = 46,1 g.mol^{-1}) soit il s'agissait de formulations plus complexes. Nous l'avons montré en testant le glutaraldéhyde (masse moléculaire = 100,1 g.mol^{-1}), dont la masse molaire se trouve à la limite de rétention de la Séphadex™ G-10. Cependant, ce dernier s'est avéré ne pas être retenu par nos colonnes (Résultats, 2.1.3, p.147), et n'a pas pu être utilisé comme molécule de référence. Cependant, les informations recueillies au sein de la littérature sur l'activité ATS-D de la CHX sur le HCoV 229E autorisent d'une certaine façon à considérer cette dernière comme molécule de référence.

De plus, pour s'assurer que les cellules traitées ou non par le désinfectant testé ne présentent pas une réduction de la sensibilité aux virus (contrôle d'interférence), la norme NF EN 14476+A1 recommande l'ajout de dilutions du produit à tester, en parallèle avec du PBS, sur les tapis cellulaires et les plaques de culture sont incubées pendant 1 h avant élimination du surnageant et remplacement par du milieu de culture et ajout de la suspension virale.
Le contrôle de neutralisation mise en œuvre dans le protocole que nous avons développé, permet d'inoculer les filtrats des agents chimiques testés, donc neutralisés, sur les cellules avant l'ajout du virus, sans étape ultérieure d'élimination du surnageant. Ceci permet d'une part, d'un point de vue pratique, de réduire les étapes et d'autre part, d'avoir une vision à plus long terme de l'effet de ces filtrats sur les cellules et sur leur sensibilité à l'infection virale. Une cytotoxicité résiduelle peut en effet conduire à une sous-estimation de l'activité réelle d'un produit. En effet, si la première dilution inoculée aux cellules, contenant, dans notre cas, le filtrat du mélange suspension virale/ATS-D, présente une certaine cytotoxicité, les cellules et le tapis cellulaire peuvent être altérés. Cette perte cellulaire pourrait alors être faussement imputée à l'action du virus.

1.4 Standardisation et conditions réelles d'utilisation : *Choix des critères physico-chimiques*

1.4.1 Paramètres physico-chimiques

Les conditions physico-chimiques sont très importantes à préciser dans le cadre de l'évaluation des ATS-D, car elles peuvent interférer aussi bien sur le virus lui-même et sa réplication (température, humidité relative, pH) que sur l'activité intrinsèque des ATS-D.

Le pH a, notamment, une influence très importante.
En effet, la réplication des HCoV est plus efficace à pH légèrement acide (6 - 6,5) et est fortement diminuée à pH 8 à cause des phénomènes d'agrégation. En outre, les activités de la CHX et de l'HXM sont également sensibles au pH. La stabilité des solutions de CHX est maximale entre pH 5 et 8 mais son activité microbicide semble maximale entre pH 5,5 et 7. L'activité de l'HXM est quant à elle meilleure à pH alcalins (Bibliographie, 1.6.1, p.27 et 1.6.2, p.30).
Le pH dépend, dans notre protocole, de deux paramètres principaux : l'eau qui sert de solvant et les gels de Séphadex™.
La norme NF EN 14476+A1 préconise d'une façon générale, l'utilisation d'eau exempte de substances toxiques pour les cellules et bi-distillée ou déminéralisée puis stérilisée par autoclave. Si de l'eau dure doit être utilisée, la norme donne la composition de cette dernière en substances minérales. L'eau utilisée au cours des expériences de cette étude était de l'eau osmosée donc déminéralisée. Néanmoins, l'autoclavage induisait une acidification que nous avons neutralisée par ajout de bicarbonate de sodium. En effet, les variations de pH dû à l'autoclavage nous donnaient des résultats très aléatoires en matière de titres viraux.
De la même façon, le pH des gels de Séphadex™ a été contrôlé pour être à pH neutre. Ces conditions nous ont permis d'avoir des résultats reproductibles.

La température extérieure était contrôlée par un système de climatisation et était d'environ (20 ± 2)°C. Cependant, l'humidité relative n'a pas pu être ni maîtrisée ni surveillée.

1.4.2 Substances interférentes

Comme cela l'a déjà été signalé à plusieurs reprises, les virus sont retrouvés à l'état naturel incorporés dans des matrices organiques. Ainsi, même sur une surface pré-nettoyée, il subsiste toujours des reliquats de matières organiques et/ou inorganiques pouvant interférer avec l'activité microbicide des produits ATS-D et dissimuler les virus à leur action. Il est donc important, pour un test d'évaluation de l'activité ATS antivirale, de simuler la présence de telles substances par l'incorporation de matériel organique. La plupart des textes normatifs l'ont d'ailleurs intégré dans leurs recommandations (Sattar S.A.*, et al.*, 2003).

La norme NF EN 14476+A1 recommande de travailler soit en conditions de propreté, définies comme "les conditions représentatives de surfaces qui ont fait l'objet d'un programme de nettoyage satisfaisant et/ou contenant des niveaux minimaux de substances organiques et/ou inorganiques" ; soit en conditions dites de saleté, définies comme les "conditions représentatives de surfaces qui sont réputées (ou peuvent) contenir des substances organiques et/ou inorganiques". La norme recommande comme substances interférentes, des solutions de protéines (sérum albumine bovine à 0,3 $g.L^{-1}$) et d'érythrocytes de moutons, préparés à partir de sang défibriné stérile de mouton, ajoutées à la suspension de virus d'essai avant d'ajouter la solution d'essai du produit. Ces substances ont alors pour but de démontrer l'éventuelle influence de protéines et des érythrocytes sur l'activité virucide de la solution d'essai du produit (Tableau 3, p.25).

Les normes Américaines (ASTM, 1996, ASTM, 1997), quant à elles, proposent d'ajouter à la suspension virale du SVF ou un autre sérum, pour lequel il faut vérifier au préalable l'absence d'inhibiteurs antiviraux. En effet, certains lots de sérum de veau peuvent présenter des inhibiteurs pour certains virus comme le rotavirus. Si un sérum ne peut pas être utilisé, elles indiquent que l'on peut le remplacer par d'autres solutions contenant un titre protéique équivalent à celui du SVF, soit environ 2 $g.L^{-1}$.

Il existe en pratique une grande diversité de souillures possibles, tant au niveau de leur nature que de leur quantité. Ainsi, selon la finalité visée par l'ATS-D testé, il ne peut exister de substances interférentes universelles. Dans de nombreuses études, le SVF à 5 ou 10% est utilisé dans ce but, cependant, il reste relativement cher, il doit être inactivé et comme nous venons de le voir, il peut contenir des inhibiteurs viraux. D'autres substances, comme les matières fécales ont été utilisées mais elles posent de par leur nature intrinsèque le problème de reproductibilité et de standardisation. De plus, elles peuvent aussi contenir des substances inhibitrices voire toxiques pour les virus. Sattar et coll. ont développé un mélange contenant de la mucine bovine, de la tryptone et une protéine de masse moléculaire élevée, l'albumine bovine. Les concentrations de ces trois

éléments ont été calculées pour avoir un niveau protéique globalement équivalent à celui existant dans 5% de sérum (Mbithi J.N.*, et al.*, 1990, Sattar S.A.*, et al.*, 2003).

1.5 De la difficulté d'unifier les tests : l'exemple d'une controverse…

Suite à l'édition des différentes normes, un certain nombre de polémiques quant aux choix des souches virales sont apparues au cours des dernières années, notamment entre Ijaz et Morace, représentant respectivement les versants Américain et Européen (Ijaz M.K. et Rubino J., 2008, Morace G. *et al.*, 2009). Cette discussion est fondée sur une critique Américaine portant (i) sur le choix de tests en suspension et (ii) sur le choix des souches virales.

Ijaz souligne que les autorités normatives Américaine, Canadienne et Australienne, recommandent l'usage de tests sur support pour établir l'activité virucide d'un produit désinfectant, alors qu'en Europe, seul un test en suspension est préconisé. De plus, il critique le fait que les essais soient menés uniquement sur des virus nus dans la norme NF EN 14476+A1 et sur des bactériophages dans la norme NF EN 13610. Il oppose à ces choix d'une part qu'ils ne sont pas représentatifs des conditions d'usage et d'autre part que les virus nus étant beaucoup plus résistants que les virus enveloppés, ce choix va entraîner l'élimination d'un certain nombre de produits. Or ces derniers pourraient être efficaces contre des virus émergents ou réémergents tels que le SARS-CoV ou les différents virus grippaux (grippe aviaire, (H1N1)v). En s'appuyant sur la littérature, il juge les virus tels que les coronavirus, les rotavirus, les influenzavirus ou encore les rhinovirus, comme des virus pertinents à inclure dans les essais.

En réponse, Morace précise que la norme NF EN 14476+A1, seule norme en vigueur actuellement en Europe dans le domaine de la médecine Humaine, est une norme de phase 2, étape 1, c'est-à-dire des tests en suspension quantitatifs permettant d'établir l'activité d'un produit vis-à-vis de microorganismes particuliers en conditions de laboratoire, et que des normes de phase 2, étape 2 sont en cours de préparation dans le domaine de la médecine Humaine et Vétérinaire (AFNOR, 2010). En outre, Morace adresse également une critique à la norme Américaine quant au rapport utilisé dans les volumes de suspension virale (0,2 mL) et d'ATS-D (2 mL) en arguant que ces conditions sont finalement plus proches d'un test en suspension que d'un réel test sur support ; ce qu'Ijaz contredira en soulignant l'état sec et emprisonné dans la matière organique des virus. Morace reconnaît l'importance d'utiliser des virus vertébrés dans les tests. Cependant, il soulève le problème suivant : effectivement, dans certaines situations, telles que dans les salles d'opération, il existe des virus pathogènes transmis par le sang et dans la plupart des cas enveloppés, mais que dans la

majorité des autres situations que ce soit dans les services de médecine ou dans un environnement domestique, la présence de virus entériques, nus et résistants, est plus fréquente que celle des virus enveloppés. Il est donc nécessaire, pour Morace, que dans le cas d'une contamination d'origine inconnue, les ATS-D utilisés soient actifs sur la plupart des virus et donc sur les virus nus. Cependant, il admet que dans certaines situations épidémiques particulières, comme celle du SARS-CoV ou de l'influenzavirus (H1N1)v, les autorités compétentes pourraient recommander l'usage de produits actifs contre ces virus, moins agressifs.

Ainsi, même si les futures normes Européennes pour la désinfection des surfaces et des instruments sont appelées à conserver uniquement des virus nus, il est envisagé que celle concernant l'antisepsie des mains inclue des virus enveloppés pour permettre le développement de produits moins agressifs pour la peau. Enfin, Morace justifie le choix des bactériophages dans la norme NF EN 13610, par la perte économique induite par la contamination de cultures bactériennes, parfois nécessaires, dans l'industrie alimentaire. Finalement, en dernière réponse, Ijaz insiste sur le fait que seuls certains biocides, en général assez toxiques, et selon leur concentration, sont actifs sur les virus nus, et que les usagers devraient avoir accès à des ATS-D soit à large spectre, soit à spectre plus réduit mais clairement défini.

Comme nous venons de le voir au cours des paragraphes précédents, la standardisation des tests pour l'évaluation de l'activité ATS, et notamment antivirale, bien que fondamentale est d'une très grande complexité. Elle est nécessaire pour l'homogénéité des résultats et pour la comparaison des différentes activités d'un produit à l'encontre de différents virus et inversement de plusieurs produits vis à vis d'un virus. Ces données permettront alors un choix judicieux et approprié de l'ATS-D. Ainsi, pour que les résultats aient une réelle valeur pratique, il est fondamental de préciser les conditions des tests : modèle virus/cellules, concentration de l'ATS-D testée, type de test (suspension/support), temps de contact, présence ou non de substances interférentes, température et critère d'efficacité ; ces paramètres variant selon les normes et les publications. Ainsi, lorsque l'on compare différentes études examinant l'activité ATS d'un produit à l'encontre d'un virus les résultats peuvent très largement varier d'une étude à l'autre.

L'inconvénient majeur résultant de la diversité des situations (désinfection des surfaces, des mains, du matériel médico-chirurgical thermosensible comme les endoscopes etc.) et de la nature des ATS-D est qu'il ne peut exister une méthode universelle. Il est en effet nécessaire que les organisations normatives élaborent des normes propres à chaque situation en tenant compte des risques et conditions particulières que l'on peut rencontrer (micro-organismes susceptibles d'être présents,

service hospitalier avec risque particulier etc.). Les ATS-D alors développés ou réévalués pourront être affiliés à un usage, général ou particulier, mais adapté. Un des problèmes résultant d'une "sur-normalisation" est que l'usager s'y perde. De ce fait, si une méthode unique n'est pas envisageable, la standardisation des différentes étapes et paramètres, quel que soit le type de test, est fondamentale.

2 Quel arsenal thérapeutique préventif pour demain?

2.1 Des ATS-D connus depuis la nuit des temps ou presque…

2.1.1 La CHX et l'HXM

La CHX et l'HXM, molécules choisies comme molécules de référence, sont des ATS largement utilisés en médecine Humaine que ce soit pour l'ATS de la peau saine et lésée, ou encore, en ce qui concerne la CHX, pour l'ATS pré-opératoire. La CHX présente en effet un spectre d'action assez large, ce qui n'est cependant pas le cas de l'HXM.

2.1.1.1 HXM

Concernant l'HXM, à notre connaissance, aucune publication ne relate d'évaluation de sa possible activité antivirale. Cependant, d'après nos résultats, son activité antivirale est très faible voire nulle sachant que, les tests ont été réalisés en suspension et en l'absence de matière interférente. Elle n'a induit en effet qu'une diminution de 0,9 $\log_{10}$ du titre du HCoV 229E, virus qui plus est enveloppé, en 60 min (Résultats, 2.3.3, p.174).

De plus, elle s'est avérée toxique pour les cellules L-132 avec des CI_{50} et CC_{50} de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-5} mol.L^{-1} selon les temps de contact (Résultats, 2.3.1, p.166).

En considérant par ailleurs son spectre antibactérien étroit (Bibliographie, 1.6.2, p.30), l'intérêt de l'HXM, pourtant encore largement utilisée, s'avère assez limité et pourrait être remis en question.

2.1.1.2 CHX

Activité ATS antivirale (Tableau 29)

La CHX en solution aqueuse montre en général une activité virucide faible. Bien qu'elle soit active sur des virus enveloppés comme les herpesvirus, elle s'est avérée complètement inefficace sur les virus nus comme le poliovirus ou l'adénovirus (Bailey A. et Longson M., 1972, Bernstein D*., et al.*, 1990).

Cependant, son association à différents composés comme le cétrimide ou l'éthanol permet une amélioration de cette activité.

Son association avec le cétrimide permet d'accroître légèrement son activité sur les virus nus mais cette dernière reste néanmoins loin du seuil d'efficacité ATS-D. Un point intéressant à soulever est qu'associée à du cétrimide à 0,1125% (m/v), la CHX à 0,01125% (m/v), ne montre pas d'activité sur le HCoV OC43 en 10 min (Wood A. et Payne D., 1998).
Or nos résultats ont montré que pour une concentration de 10^{-4} mol.L^{-1} soit 0,009% (m/v), la CHX, seule, induit une réduction de 0,5 $\log_{10}$ en 15 min mais sans substance interférente et à 10^{-3} mol.L^{-1} soit 0,09% (m/v), elle induit une réduction de 2,1 $\log_{10}$, ce qui n'est pas négligeable, même si cela reste nettement insuffisant. Cependant, comme nous l'avions vu dans le paragraphe de la Bibliographie, 3.9, p.96, ces virus, bien qu'appartenant à la même famille, peuvent présenter des comportements différents vis-à-vis des ATS-D. De plus, la CHX montre certes une activité sur le HCoV 229E mais à une concentration plus forte que celle testée sur le HCoV OC43, un temps de contact de 15 min au lieu de 10 min et, en absence de substance interférente. Cependant, l'absence de cétrimide est notable et permet d'affirmer une activité antivirale, au moins partielle, de la CHX seule. Ces différents résultats confirment, une fois de plus, l'importance de préciser les différentes conditions des tests (type de test, temps de contact) et la nature des souches.

Les solutions alcooliques de CHX à 0,05%, soit à la concentration recommandée pour la désinfection de la peau en pré-opératoire, ont montré le même spectre d'activité antivirale - i.e réduction supérieure à 3 $\log_{10}$ des titres viraux du HCoV 229E, du PIV-3, de l'adénovirus de type 5 et du rotavirus mais pas d'activité ATS antivirale sur le coxsackievirus - que les solutions alcooliques seules (Lloyd-Evans N*., et al.*, 1986, Sattar S.A*., et al.*, 1989, Springthorpe V.S*., et al.*, 1986). Ces résultats laissaient à penser que l'activité de ces formulations était due à l'action unique de l'éthanol, c'est d'ailleurs une des raisons qui nous ont amenés à choisir la CHX comme molécule de référence et évaluer son activité propre à l'encontre du HCoV 229E.

Références	Types de test	Neutralisation	Substances interférentes	Concentrations en CHX[a]	Association[a]	Virus testés	Temps de contact	Perte de pouvoir infectieux[b]	Critère d'efficacité
(Bailey A. et Longson M., 1972)	Suspension	Dilution	X	0,02%	X	HSV-1 et 2	90 min	>6 log_{10}	X
						Poliovirus-2		0	
						Adénovirus-2		0	
(Bernstein D., *et al.*, 1990)	Suspension	Dilution	X	0,12%	X	HSV-1	30 s	97%	X
						Poliovirus-1		0%	
						HSV-1	5 min	99,9%	
						Poliovirus-1		3%	
						HSV-1	15 min	>99;9%	
						Poliovirus-1		0%	
(Wood A. et Payne D., 1998)	Suspension	Chimique[c]	Albumine bovine (10% m/v) Extrait de levure (10% m/v)	0,01125%	Cétrimide 0,1125%	HSV-1	1 min	>4,37 log_{10}	4 log_{10}
						HCoV OC43	10 min	0 log_{10}	
						Poliovirus-1	10 min	0,12 log_{10}	
						HIV-1	1 min	>0,5 log_{10}	
							5 min	0,8 log_{10}	
							10 min	>3,35 log_{10}	
						Adénovirus-25	10 min	1,5 log_{10}	
						Coxsackievirus-A11	10 min	0,37 log_{10}	
(Ansari S.A., *et al.*, 1989)	Sur pulpe des doigts	Dilution	Matières fécales (10%)	0,05%	Cétrimide 0,5% Isopropanol 70%	Rotavirus	10 s	99,4%	X
				0,05%	Cétrimide 0,5% Ethanol 70%			99,1%	
				0,05%	Cétrimide 0,5%			86,4%	
				0,0075%	Cétrimide 0,075%			78,3%	
				0,5%	Isopropanol 70%			95,3%	
				2%	Isopropanol 4%			80%	
	Sur la main entière			0,05%	Cétrimide 0,5% Ethanol 70%			98,9%	
				0,0075%	Cétrimide 0,075%			84,8%	

Tableau 29 : Activité antivirale de la CHX dans différentes conditions

[a] concentrations finales testées en % (m/v), [b] : les résultats sont exprimés conformément aux publications, [c] : bouillon de neutralisation contenant de la lécithine, du polysorbate 80, du thiosulfate de sodium, de l'histidine et de l'acide phosphorique.

Toutefois, l'association avec un alcool semble potentialiser l'activité de la CHX et de son association avec le cétrimide, ce qui est également confirmé par l'étude de Ansari et coll. (Ansari S.A*., et al.*, 1989).

Toxicité de la CHX

La toxicité de la CHX a été montrée dans diverses études, néanmoins elle dépend également des conditions d'expérience.

Il a par exemple été montré que la CHX était toxique sur les cellules HEP-2 (cellules cancéreuses issues de carcinome laryngé humain) après 7 jours d'incubation, dès 0,04 µg/mL soit $4{,}5.10^{-8}$ $mol.L^{-1}$. Cependant, si le dépôt de la CHX pendant un temps de contact de 90 min était suivi d'un lavage avec du PBS puis remplacé par du milieu de culture, la toxicité disparaissait pour des concentrations allant jusqu'à 4000 µg/mL soit $4{,}5.10^{-3}$ $mol.L^{-1}$ (Bailey A. et Longson M., 1972).

De la même façon, les solutions aqueuses de CHX à 0,12% ($1{,}3.10^{-3}$ $mol.L^{-1}$) se sont révélées cytotoxiques après 2 h de contact avec différentes cellules de lignée continue (fibroblastes Humains, cellules issues d'un rhabdomyosarcome, cellules de rein de singe vert et des cellules de reins de chien). Cette toxicité a pu être éliminée en ne laissant qu'une heure de temps de contact suivie d'un lavage au PBS et du remplacement par du milieu de culture (Bernstein D*., et al.*, 1990).

Une solution à 0,05% diluée au $1/10^{ème}$ (soit une concentration finale de $5{,}6.10^{-5}$ $mol.L^{-1}$) a tué 100% des cellules (cellules HEP-2) après cinq jours d'incubation, et ce n'est qu'à une dilution au $1/1000^{ème}$ (soit $5{,}6.10^{-7}$ $mol.L^{-1}$) que cette cytotoxicité disparaissait complètement (Platt J. et Bucknall R.A., 1985).

Ces résultats corroborent ceux que nous avons obtenus, c'est-à-dire que la CHX s'est avérée toxique pour les cellules L-132, cellules de lignée continue, avec des CI_{50} et des CC_{50} proches de 10^{-6} $mol.L^{-1}$ dès 24 h.

2.1.2 Autres molécules à activité ATS antivirale

A l'instar de la CHX, les ATS-D ne sont pas sans danger et leurs spectres d'action sont parfois étroits. De plus, certains sont reconnus pour être responsables de maladies professionnelles.

Les alcools ou la PVP-I font preuve d'un spectre d'action large et sont actifs tant sur les virus nus que sur les virus enveloppés. Cependant, les alcools, et plus particulièrement l'éthanol, utilisé fréquemment seul notamment dans les solutions hydro-alcooliques, sont synergiques avec de

nombreux autres ATS-D comme la CHX. Cependant, la nature volatile de l'éthanol ne lui procure qu'une action fugace et il faut qu'il soit associé à d'autres composés pour obtenir une certaine rémanence.
La PVP-I, employée aussi bien pour l'ATS de la peau saine et lésée que dans les procédés pré-opératoires, présente des risques de sensibilisation cutanée et de passage systémique.

D'autres familles, comme les composés phénoliques et les ammoniums quaternaires, ne montrent qu'une faible activité virucide. Ils sont de plus toxiques à différents niveaux. En effet, des études ont montré des manifestations asthmatiques chez les usagers d'ammoniums quaternaires, notamment chez les infirmières (Purohit A. *et al.*, 2000). De la même façon, les dérivés phénoliques, et plus particulièrement le phénol, présentent une toxicité cutanée et systémique non négligeable, amenant à réduire, voire à supprimer dans le cas du phénol, leur utilisation en tant qu'ATS (Bibliographie, 1.6.6, p.40).

Les aldéhydes sont eux aussi de moins en moins employés pour différentes raisons (Bibliographie, 1.6.7, p.42). Un premier point est qu'ils ont une action virucide plutôt lente. Ensuite, Le formaldéhyde, classé comme agent cancérigène, a fait l'objet de recommandations et doit être remplacé par d'autres produits de désinfection. Le glutaraldéhyde, quant à lui, de par ses propriétés de fixation protéique, n'est plus recommandé dans la désinfection du matériel médical thermosensible tel que les endoscopes à cause du "risque prion". Ils ont, de plus, été impliqués dans l'apparition de dermatites de contact chez les personnes travaillant dans le secteur dentaire (Ravis S.M. *et al.*, 2003).

Enfin, il peut exister un impact environnemental. Du triclosan, composé appartenant à la famille des chloro-phénoxy-phénols, a par exemple été retrouvé dans des produits aussi variés que du lait Humain, des eaux usagées municipales et dans de la bile de poisson (Adolfsson-Erici M. *et al.*, 2002). Bien que les quantités soient en général négligeables, leur impact à long-terme doit être envisagé.

Ainsi, les ATS-D disponibles, bien que nombreux et variés, présentent souvent des spectres d'activité antivirale restrictifs et les inconvénients de la toxicité de certains d'entre eux nous incite à chercher de nouvelles molécules.

2.2 Vers de nouvelles molécules : les calixarènes, une nouvelle famille d'ATS-D à visée virucide ?

2.2.1 Les calixarènes : un potentiel microbicide attrayant

Les calixarènes n'ont fait l'objet que d'un nombre restreint d'études quant à leur potentiel microbicide propre. Cependant, ces quelques études ont mis en évidence une activité antivirale intrinsèque intéressante (Bibliographie, 2.2.6, p.52).

Mourer et coll. ont notamment évalué l'activité anti-HIV de neuf calix[4]arènes différents, i.e. calixarènes sulfonés, carboxylés et phosphonés, dont le C[4]S et le C[4]S-BTZ (Mourer M*., et al.*, 2010).
Le composé ayant montré la meilleure activité anti-HIV-1 s'est révélé être le C[4]S-BTZ, même si dans l'étude de Mourer et coll., cette dernière restait inférieure à celle de la zidovudine, avec des concentrations inhibant 50% de la réplication virale de $1{,}6.10^{-6}$ mol.L^{-1} et de 0,01 10^{-6} mol.L^{-1}, respectivement. L'activité du C[4]S était plutôt faible (activité inhibitrice 50% à 38.10^{-6} mol.L^{-1}). Cependant, l'activité la plus médiocre était détenue par le calix[4]arène phosphoné non substitué, qui même à des concentrations supérieures à 100.10^{-6} mol.L^{-1}, n'a pas permis la réduction de 50% de la réplication virale.

Ces résultats associés à ceux de Psychogios et coll., ayant montré une activité anti-herpétique du C[4]S-BTZ (Psychogios N., 2003), nous ont incités à évaluer son activité à l'encontre du HCoV 229E, dans des conditions de tests d'ATS. Nous avons aussi testé le C[4]S non substitué pour avoir un point de référence et juger de l'importance de la substitution dans l'activité antivirale.

2.2.2 Le C[4]S-BTZ : Rapidité, Rémanence et Non toxicité

L'activité ATS anti-HCoV 229E du C[4]S s'est révélée très décevante, bien que similaire à celle de l'HXM. En effet, même à 10^{-3} mol.L^{-1} et après un temps de contact de 60 min, seule une réduction de 0,6 $\log_{10}$ a été atteinte (Résultats, 3.1.3, p.187).

L'activité du C[4]S-BTZ présentait quant à elle des attraits non négligeables.
A 10^{-4} mol.L^{-1}, son activité est faible (1 $\log_{10}$ de réduction après 60 min de temps de contact) et semble temps-dépendante.
Cependant, à 10^{-3} mol.L^{-1}, son activité atteint 2,7 $\log_{10}$ de réduction dès 5 min de temps de contact et reste globalement stable jusqu'à au moins 60 min. Certes, le seuil fixé par la norme Européenne de

4 log_{10} n'est pas atteint, néanmoins cette activité se rapproche fortement du seuil proposé par les normes Américaines de 3 log_{10}.

Rapidité et rémanence

Lorsque l'on compare cette activité à celle de la CHX, nous pouvons noter que si leurs activités à 10^{-3} mol.L^{-1} et 60 min de contact sont similaires, le C[4]S-BTZ a une rapidité d'action beaucoup plus grande, i.e. 2,7 log_{10} de réduction à 5 min contre 1,4 log_{10} pour la CHX.

En outre, cette activité est conservée au temps de contact 60 min, ce qui indique que ce composé est, d'une part actif rapidement lorsque la concentration nécessaire est atteinte (10^{-3} mol.L^{-1}), mais que cette activité est maintenue pendant un certain temps (contrairement aux alcools par exemple).

Cette qualité peut présenter une grande importance dans les processus d'ATS-D où une activité rapide est un avantage certain.

Son activité pourrait être liée à un phénomène de saturation et/ou d'altération de récepteurs, peut-être irréversible (rémanence).

Non toxicité

Les études antérieures de Mourer et coll. et de Psychogios et coll. ont tout d'abord montré que ces différents composés ne présentaient pas de cytotoxicité ($CC_{50} \geq 10^{-4}$ mol.L^{-1}) et ce, sur différents types cellulaires, i.e. cellules MT4 (cellules humaines d'origine lymphoïde transformées par le virus T-lymphotropique Humain), cellules CEM-SS (cellules leucémiques lymphoblastiques T Humaines) et cellules mononuclées du sang.

Ces premiers résultats corroborent ceux obtenus au cours de cette étude, où les CI_{50} et les CC_{50} étaient également supérieures à 10^{-4} mol.L^{-1}.

2.2.3 Quel avenir pour le C[4]S-BTZ ?

Ces qualités font du C[4]S-BTZ une molécule à fort potentiel thérapeutique.

Pour envisager des nouvelles applications et/ou développement, il est nécessaire de noter ici la différence d'activité avec le composé C[4]S, non substitué, qui permet de conclure au rôle fondamental des groupements bithiazolés dans l'activité virucide. L'évaluation de l'activité du monomère, i.e. un phénol thiazolé, pourrait également être fructueuse pour apprécier l'importance

de la structure tridimensionnelle de ce calix[4]arène. Par ailleurs, pour obtenir une activité sur le HCoV 229E, il faut atteindre une concentration de 10^{-3} mol.L^{-1}.
Ces résultats sont donc extrêmement encourageants et ouvrent la porte à d'autres perspectives. Il serait notamment intéressant, considérant la cinétique d'action du C[4]S-BTZ, de le coupler à l'éthanol à 70%. En effet, nous avons vu que ce dernier possède une assez bonne activité antivirale, surtout sur les virus enveloppés et un mode d'action rapide. Cependant, l'éthanol étant très volatil, l'association avec le C[4]S-BTZ, dont la rémanence vient d'être démontrée, apparaît très avantageuse. De plus, il pourrait se produire une synergie d'action entre ces deux composés agissant sur les membranes lipidiques. 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).

Ainsi, pour mieux comprendre le mécanisme d'action du C[4]S-BTZ, il faudrait par la suite tester son activité sur d'autres virus, notamment un virus nu, pour établir son spectre d'activité antivirale de façon plus large. De plus, cela permettrait en partie l'investigation de son mode d'action et de peut-être mettre en évidence un site d'action privilégié. En effet, en agissant, par exemple, au niveau de protéines situées sur l'enveloppe, il pourrait empêcher la reconnaissance et/ou la fusion membranaire ; l'activité antivirale serait donc complètement différente sur un virus nu ou un virus enveloppé.

Par ailleurs, 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. Des études concernant l'activité antibactérienne des calix[4]arènes ont été menées sur différents composés ; les calix[4]arènes de notre étude, n'ont cependant pas encore fait l'objet d'études spécifiques à ce sujet (Bibliographie, 2.2.6).

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, mais aussi dans le domaine Vétérinaire où les coronavirus infectant les animaux sont nombreux et responsables de pathologies diverses. D'autres types de molécules et/ou extraits végétaux, ont été testés pour leur activité contre les coronavirus comme les saikosaponines ou la glycyrrhizine (Cheng P.W. *et al.*, 2006, Cinatl J. *et al.*, 2003). De l'évaluation de ces nouvelles molécules dépend notre arsenal thérapeutique de demain.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons au cours de ce travail développé une méthode de neutralisation par filtration sur colonnes de Séphadex™ présentant des avantages certains, i.e. amélioration de la garantie du temps de contact, rétention d'une gamme large de molécules selon leur masse moléculaire, non rétention des virus et diminution des coûts par rapport aux autres méthode de filtration sur gel. Après s'être assurés de la reproductibilité de l'élaboration de nos colonnes de Séphadex™ G-10 et G-25, nous avons validé cette méthode de façon biologique et physico-chimique. Nous avons pu ainsi évaluer l'activité ATS potentielle de deux molécules de référence, la CHX et l'HXM, ainsi que de deux nouvelles molécules, le C[4]S et le C[4]S-BTZ.

Pour aller plus loin dans le développement de cette méthode, plusieurs essais sont à inclure dans des projets ultérieurs. Tout d'abord, les tests que nous avons réalisés sont des tests en suspension. Or, comme nous l'avons vu au cours de cet exposé, si les tests en suspension sont des tests faciles à mettre en œuvre, la réalisation de tests sur support est essentielle pour l'extrapolation des résultats. Ces derniers sont en effet plus représentatifs des conditions réelles d'utilisation lorsque les virus sont séchés et piégés dans des amas de débris organiques, qui notamment limitent l'accès aux ATS-D. Ainsi, une des étapes ultérieures est de mettre en œuvre cette nouvelle méthode de neutralisation par filtration sur gel dans le cadre de tests sur support. Cela permettrait en outre de s'assurer, que lors de l'ajout de substances interférentes, il n'y ait pas d'interaction avec le système de colonnes que nous proposons. Il pourrait peut-être se produire un phénomène de saturation, si les substances choisies sont également retenues par les pores des billes de Séphadex™. Le choix des substances interférentes résultera donc en partie de leur masse moléculaire, préférablement élevée et au-dessus de la limite d'exclusion du gel choisi, telles que la BSA, en s'assurant bien sûr que ces substances n'interfèrent pas sur l'infectivité virale.

Par ailleurs, il sera essentiel de tester les colonnes sur d'autres types de virus, notamment des virus nus en général plus petits que les virus enveloppés. Des travaux ont d'ailleurs été initiés sur le poliovirus avec des résultats préliminaires encourageants, puisqu'il ne semble pas exister de rétention du virus. Nous avons choisi le poliovirus car il s'agit du virus encore imposé par la norme Européenne 14476+A1, bien que nous ayons conscience que ce virus ne soit pas le virus de choix pour les futurs tests d'ATS antivirale. En ce sens, le rhinovirus, appartenant également aux *Picornaviridae* et de toute petite taille, pourrait être une alternative judicieuse.

En outre, il pourrait être intéressant de comparer la rétention des calixarènes par les colonnes de Séphadex™ G-10 et G-25 et par des colonnes de Séphadex™ LH-20 car selon les données du fabriquant, ces dernières présentent une affinité pour les composés cycliques et aromatiques, ce qui pourrait augmenter ses capacités de rétention des calixarènes. Enfin, l'évaluation du potentiel ATS-D

du C[4]S-BTZ à l'encontre d'autres virus est bien évidemment nécessaire et attendu avec impatience. L'étude et la compréhension de son mécanisme d'action seront alors capitales.

Au-delà de l'objectif d'améliorer les standards, au moins Européens, de l'évaluation de l'activité ATS-D antivirale, un des buts de notre équipe est la mise en évidence de nouvelles molécules à fort potentiel thérapeutique. Il nous faut en effet élargir notre gamme de moyens de prévention, passant notamment par l'ATS-D, pour pouvoir combattre les infections qu'elles soient émergentes, épidémiques ou nosocomiales, face au manque, encore bien ancré, de traitements spécifiques à l'encontre des maladies virales. Cependant, et comme nous l'avons développé au cours de ce travail, il est nécessaire que ces moyens de prévention répondent à la réalité et aux exigences du terrain. Ils doivent donc subir une évaluation appropriée et standardisée permettant la comparaison des différentes solutions s'offrant à l'usager et ainsi un choix éclairé en fonction des risques.

Effectivement, de nos jours encore, le bénéfice apporté par le contrôle des infections grâce aux biocides n'est démontré que par des preuves indirectes. Cependant, ceci n'est pas vraiment surprenant compte tenu des difficultés inhérentes à la conception et l'exécution de telles investigations, où de nombreuses variables, parfois inattendues, peuvent interférer. De telles preuves ont été apportées par des infections croisées, résultant notamment d'un mauvais usage des ATS-D, qui ont démontré à quel point était importante une ATS-D appropriée dans la maîtrise des infections. Les études menées en laboratoire, avec leurs inhérentes limitations, ont néanmoins pu montrer que l'utilisation appropriée d'ATS-D permettait l'interruption du transfert de microorganismes pathogènes de surfaces contaminées vers les êtres vivants susceptibles de s'infecter. Cependant, l'extrapolation de ces informations vers la pratique réelle reste encore un véritable défi (Dettenkofer M. *et al.*, 2004, Sattar S.A., 2006).

Pour conclure, un dernier, point est important à souligner : l'éducation des différents utilisateurs d'ATS-D, c'est-à-dire l'ensemble de la population mais avec des spécificités et des sensibilisations différentes selon les risques et secteurs d'activité. En effet, de nombreux utilisateurs sont encore sensibles à de longues listes de microorganismes, bien que souvent peu pertinentes, sur les étiquettes commerciales, l'exemple typique étant le HIV. Il est alors extrêmement important d'informer les usagers des risques encourus par une ATS-D inappropriée mais surtout de leur proposer des produits pour lesquels des normes adaptées garantissent leur efficacité et répondent à leurs exigences.

REFERENCES ET ANNEXES

Références

Adolfsson-Erici M., Pettersson M., Parkkonen J. and Sturve J. 2002. Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. Chemosphere. 46: 1485-1489.

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. Antiseptiques et désinfectants chimiques - Essai virucide quantitatif de suspension pour les antiseptiques et désinfectants chimiques utilisés en médecine humaine - Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1). 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.

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.

Almeida J. D. and Tyrrell D. A. 1967. The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture. J. Gen. Virol. 1: 175-178.

Aly R. and 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.

Ansari S. A., Sattar S. A., Springthorpe V. S., Wells G. A. and 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. and 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. and Rahman M. 1991a. 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.

Ansari S. A., Springthorpe V. S., Sattar S. A., Tostowaryk W. and Wells G. A. 1991b. Comparison of cloth, paper, and warm air drying in eliminating viruses and bacteria from washed hands. Am. J. Infect. Control. 19: 243-249.

Arbour N., Cote G., Lachance C., Tardieu M., Cashman N. R. and Talbot P. J. 1999a. Acute and persistent infection of human neural cell lines by human coronavirus OC43. J. Virol. 73: 3338-3350.

Arbour N., Day R., Newcombe J. and Talbot P. J. 2000. Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses. J. Virol. 74: 8913-8921.

Arbour N., Ekande S., Cote G., Lachance C., Chagnon F., Tardieu M., Cashman N. R. and Talbot P. J. 1999b. Persistent infection of human oligodendrocytic and neuroglial cell lines by human coronavirus 229E. J. Virol. 73: 3326-3337.

Arden K. E., Nissen M. D., Sloots T. P. and Mackay I. M. 2005. New human coronavirus, HCoV-NL63, associated with severe lower respiratory tract disease in Australia. J. Med. Virol. 75: 455-462.

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. 2002a. Standard Quantitative Disk Carrier Test Method for Determining the Bactericidal, Virucidal, Fungicidal, Mycobactericidal and Sporicidal Activities of Liquid Chemical Germicides. E2197-02.

ASTM. 2002b. Standard Test Method for Determining the Virus-Eliminating Effectiveness of Liquid Hygienic Handwash and Handrub Agents Using the Fingerpads of Adult Volunteers. E1838-02.

ASTM. 2004. Standard Test Method for Neutralization of Virucidal Agents in Virucidal Efficacy Evaluations. E1482-04.

ASTM. 2009. Standard Test Method for Evaluation of Hygienic Handwash and Handrub Formulations for Virus-Eliminating Activity Using the Entire Hand. E2011-09.

Bailey A. and 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. and 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.

Baric R. S. and Yount B. 2000. Subgenomic negative-strand RNA function during mouse hepatitis virus infection. J. Virol. 74: 4039-4046.

Bastien N., Anderson K., Hart L., Van Caeseele P., Brandt K., Milley D., Hatchette T., Weiss E. C. and Li Y. 2005. Human coronavirus NL63 infection in Canada. J. Infect. Dis. 191: 503-506.

Becker W. B., McIntosh K., Dees J. H. and Chanock R. M. 1967. Morphogenesis of avian infectious bronchitis virus and a related human virus (strain 229E). J. Virol. 1: 1019-1027.

Ben Salem A. and 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. and 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. and Briner W. 1990. In vitro virucidal effectiveness of a 0.12%-chlorhexidine gluconate mouthrinse. J. Dent. Res. 69: 874-876.

Berridge M. V., Tan A. S., Mc Koy K. D. and Wang R. 1996. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. Biochemica. 4: 14-19.

Bihun C. G. and Percy D. H. 1994. Coronavirus infections in the laboratory rat: degree of cross protection following immunization with a heterologous strain. Can. J. Vet. Res. 58: 224-229.

Boivin G., De Serres G., Cote S., Gilca R., Abed Y., Rochette L., Bergeron M. G. and Dery P. 2003. Human metapneumovirus infections in hospitalized children. Emerg. Infect. Dis. 9: 634-640.

Bonavia A., Arbour N., Yong V. W. and Talbot P. J. 1997. Infection of primary cultures of human neural cells by human coronaviruses 229E and OC43. J. Virol. 71: 800-806.

Borenfreund E. and Borrero O. 1984. In vitro cytotoxicity assays. Potential alternatives to the Draize ocular allergy test. Cell. Biol. Toxicol. 1: 55-65.

Borenfreund E. and Puerner J. A. 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicol. Lett. 24: 119-124.

Bradburne A. F. 1972. An investigation of the replication of coronaviruses in suspension cultures of L132 cells. Arch. Gesamte Virusforsch. 37: 297-307.

Bradburne A. F., Bynoe M. L. and Tyrrell D. A. 1967. Effects of a "new" human respiratory virus in volunteers. Br. Med. J. 3: 767-769.

Brierley I., Boursnell M. E., Binns M. M., Bilimoria B., Blok V. C., Brown T. D. and Inglis S. C. 1987. An efficient ribosomal frame-shifting signal in the polymerase-encoding region of the coronavirus IBV. EMBO J. 6: 3779-3785.

Casnati A., Fabbi M., Pelizzi N., Pochini A., Sansone F., Unguro R., Di Modugno E. and Tarzia G. 1996. Synthesis, antimicrobial activity and binding properties of calix[4]arene based vancomycin mimics. Bioorg. Med. Chem. Lett. 6: 2699-2704.

Cavanagh D. 1995. The coronavirus surface glycoprotein. In: The *Coronaviridae*. S. Siddell (Eds). New york.

Chan K. H., Poon L. L., Cheng V. C., Guan Y., Hung I. F., Kong J., Yam L. Y., Seto W. H., Yuen K. Y. and Peiris J. S. 2004. Detection of SARS coronavirus in patients with suspected SARS. Emerg. Infect. Dis. 10: 294-299.

Chany C., Moscovici O., Lebon P. and Rousset S. 1982. Association of coronavirus infection with neonatal necrotizing enterocolitis. Pediatrics. 69: 209-214.

Cheever F. S., Daniels J. B., Pappenheimer A. M. and Bailey O. T. 1949. A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. J. Exp. Med. 90: 181-210.

Cheng P. W., Ng L. T., Chiang L. C. and Lin C. C. 2006. Antiviral effects of saikosaponins on human coronavirus 229E in vitro. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 33: 612-616.

Chiu S. S., Chan K. H., Chu K. W., Kwan S. W., Guan Y., Poon L. L. and Peiris J. S. 2005. Human coronavirus NL63 infection and other coronavirus infections in children hospitalized with acute respiratory disease in Hong Kong, China. Clin. Infect. Dis. 40: 1721-1729.

Cho K. O., Hasoksuz M., Nielsen P. R., Chang K. O., Lathrop S. and Saif L. J. 2001. Cross-protection studies between respiratory and calf diarrhea and winter dysentery coronavirus strains in calves and RT-PCR and nested PCR for their detection. Arch. Virol. 146: 2401-2419.

Christian M. D., Poutanen S. M., Loutfy M. R., Muller M. P. and Low D. E. 2004. Severe acute respiratory syndrome. Clin. Infect. Dis. 38: 1420-1427.

Cinatl J., Morgenstern B., Bauer G., Chandra P., Rabenau H. and Doerr H. W. 2003. Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus. Lancet. 361: 2045-2046.

Colston M. J., Hailes H. C., Stavropoulos E., Herve A. C., Herve G., Goodworth K. J., Hill A. M., Jenner P., Hart P. D. and 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. and 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. and Rees R. J. W. 1973. Preparation of antituberculous polyoxyethylene ethers of homogeneous structure. Tetrahedron. 29: 1659-1667.

Cowley J. A., Dimmock C. M., Spann K. M. and Walker P. J. 2000. Gill-associated virus of Penaeus monodon prawns: an invertebrate virus with ORF1a and ORF1b genes related to arteri- and coronaviruses. J. Gen. Virol. 81: 1473-1484.

Crémieux A., Fleurette J., Fourtillan J. B., Joly B. and Soussy C. J. 1982. Editions Sarget. France. 179 p.

Crémieux A., Freney J. and 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. and de Mendoza J. 2000. Toward an Artificial Acetylcholinesterase. Chem. Eur. Journal. 6: 3228-3234.

Da Silva E., Shahgaldian P. and Coleman A. W. 2004. Haemolytic properties of some water-soluble para-sulphonato-calix-[n]-arenes. Int. J. Pharm. 273: 57-62.

Darnell M. E., Subbarao K., Feinstone S. M. and Taylor D. R. 2004. Inactivation of the coronavirus that induces severe acute respiratory syndrome, SARS-CoV. J. Virol. Methods. 121: 85-91.

Dauphin A. and Mazin C. 1994. Editions Arnette. Paris. 233 p.

Davies H. D., Matlow A., Petric M., Glazier R. and Wang E. E. 1996. Prospective comparative study of viral, bacterial and atypical organisms identified in pneumonia and bronchiolitis in hospitalized Canadian infants. Pediatr. Infect. Dis. J. 15: 371-375.

Davies J. G., Babb J. R., Bradley C. R. and 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 Haan C. A. and Rottier P. J. 2005a. Molecular interactions in the assembly of coronaviruses. Adv. Virus Res. 64: 165-230.

de Haan C. A. and Rottier P. J. 2005b. Molecular interactions in the assembly of coronaviruses. Adv Virus Res. 64: 165-230.

Decaro N., Campolo M., Desario C., Cirone F., D'Abramo M., Lorusso E., Greco G., Mari V., Colaianni M. L., Elia G., Martella V. and Buonavoglia C. 2008. Respiratory disease associated with bovine coronavirus infection in cattle herds in Southern Italy. J. Vet. Diagn. Invest. 20: 28-32.

Dellanno C., Vega Q. and 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.

Delmas B., Gelfi J., L'Haridon R., Vogel L. K., Sjostrom H., Noren O. and Laude H. 1992. Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. Nature. 357: 417-420.

Dettenkofer M., Wenzler S., Amthor S., Antes G., Motschall E. and Daschner F. D. 2004. Does disinfection of environmental surfaces influence nosocomial infection rates? A systematic review. Am. J. Infect. Control. 32: 84-89.

Deva A. K., Vickery K., Zou J., West R. H., Harris J. P. and Cossart Y. E. 1996. Establishment of an in-use testing method for evaluating disinfection of surgical instruments using the duck hepatitis B model. J. Hosp. Infect. 33: 119-130.

DGS/DHOS (Direction Générale de la Santé et Direction de l'Hospitalisation et de l'Organisation de Soins). 2001. Circulaire DGS/5 C/DHOS/E 2 n° 2001-138 du 14 mars 2001 relative aux précautions à observer lors de soins en vue de réduire les risques de transmission d'agents transmissibles non conventionnels.

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.

Dhar A. K., Cowley J. A., Hasson K. W. and Walker P. J. 2004. Genomic organization, biology, and diagnosis of Taura syndrome virus and yellowhead virus of penaeid shrimp. Adv. Virus. Res. 63: 353-421.

Dibama H. M., Clarot I., Fontanay S., Salem A. B., Mourer M., Finance C., Duval R. E. and 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.

Dijkman R. and van der Hoek L. 2009. Human coronaviruses 229E and NL63: close yet still so far. J Formos Med Assoc. 108: 270-279.

Droogmans G., Prenen J., Eggermont J., Voets T. and Nilius B. 1998. Voltage-dependent block of endothelial volume-regulated anion channels by calix[4]arenes. Am. J. Physiol. 275: C646-652.

Drosten C., Gunther S., Preiser W., van der Werf S., Brodt H. R., Becker S., Rabenau H., Panning M., Kolesnikova L., Fouchier R. A., Berger A., Burguiere A. M., Cinatl J., Eickmann M., Escriou N., Grywna K., Kramme S., Manuguerra J. C., Muller S., Rickerts V., Sturmer M., Vieth S., Klenk H. D., Osterhaus A. D., Schmitz H. and Doerr H. W. 2003. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. N Engl J Med. 348: 1967-1976.

Duan S. M., Zhao X. S., Wen R. F., Huang J. J., Pi G. H., Zhang S. X., Han J., Bi S. L., Ruan L. and 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.

East M. L., Moestl K., Benetka V., Pitra C., Honer O. P., Wachter B. and Hofer H. 2004. Coronavirus infection of spotted hyenas in the Serengeti ecosystem. Vet. Microbiol. 102: 1-9.

Eickmann M., Becker S., Klenk H. D., Doerr H. W., Stadler K., Censini S., Guidotti S., Masignani V., Scarselli M., Mora M., Donati C., Han J. H., Song H. C., Abrignani S., Covacci A. and Rappuoli R. 2003. Phylogeny of the SARS coronavirus. Science. 302: 1504-1505.

Esper F., Weibel C., Ferguson D., Landry M. L. and Kahn J. S. 2005. Evidence of a novel human coronavirus that is associated with respiratory tract disease in infants and young children. J. Infect. Dis. 191: 492-498.

Esposito S., Bosis S., Niesters H. G., Tremolati E., Begliatti E., Rognoni A., Tagliabue C., Principi N. and Osterhaus A. D. 2006. Impact of human coronavirus infections in otherwise healthy children who attended an emergency department. J. Med. Virol. 78: 1609-1615.

Falsey A. R., Walsh E. E. and Hayden F. G. 2002. Rhinovirus and coronavirus infection-associated hospitalizations among older adults. J. Infect. Dis. 185: 1338-1341.

Fischer F., Stegen C. F., Masters P. S. and Samsonoff W. A. 1998. Analysis of constructed E gene mutants of mouse hepatitis virus confirms a pivotal role for E protein in coronavirus assembly. J. Virol. 72: 7885-7894.

Fleurette J. 1995. Diamidines aromatiques. In: Antisepsie et désinfection. Eska (Eds). Paris. 320-324.

Fleurette J., Freney J. and Reverdy M. E. 1995. Edition Eska. Paris. 639 p.

Flory E., Stuhler A., Barac-Latas V., Lassmann H. and Wege H. 1995. Coronavirus-induced encephalomyelitis: balance between protection and immune pathology depends on the immunization schedule with spike protein S. J. Gen. Virol. 76 (Pt 4): 873-879.

Fouchier R. A., Hartwig N. G., Bestebroer T. M., Niemeyer B., de Jong J. C., Simon J. H. and Osterhaus A. D. 2004. A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 101: 6212-6216.

Fouchier R. A., Kuiken T., Schutten M., van Amerongen G., van Doornum G. J., van den Hoogen B. G., Peiris M., Lim W., Stohr K. and Osterhaus A. D. 2003. Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. Nature. 423: 240.

Gagneur A., Legrand M. C., Picard B., Baron R., Talbot P. J., de Parscau L. and Sizun J. 2002a. [Nosocomial infections due to human coronaviruses in the newborn]. Arch. Pediatr. 9: 61-69.

Gagneur A., Sizun J., Vallet S., Legr M. C., Picard B. and Talbot P. J. 2002b. Coronavirus-related nosocomial viral respiratory infections in a neonatal and paediatric intensive care unit: a prospective study. J. Hosp. Infect. 51: 59-64.

Geller C., Fontanay S., Finance C. and 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.

Gerna G., Campanini G., Rovida F., Percivalle E., Sarasini A., Marchi A. and Baldanti F. 2006. Genetic variability of human coronavirus OC43-, 229E-, and NL63-like strains and their association with lower respiratory tract infections of hospitalized infants and immunocompromised patients. J. Med. Virol. 78: 938-949.

Gerna G., Percivalle E., Sarasini A., Campanini G., Piralla A., Rovida F., Genini E., Marchi A. and Baldanti F. 2007. Human respiratory coronavirus HKU1 versus other coronavirus infections in Italian hospitalised patients. J. Clin. Virol. 38: 244-250.

Gilbert P. and Moore L. E. 2005. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. J. Appl. Microbiol. 99: 703-715.

Gonzalez J. M., Gomez-Puertas P., Cavanagh D., Gorbalenya A. E. and Enjuanes L. 2003. A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae. Arch Virol. 148: 2207-2235.

Gorbalenya A. E., Enjuanes L., Ziebuhr J. and Snijder E. J. 2006. Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. Virus Res. 117: 17-37.

Gorbalenya A. E., Snijder E. J. and Spaan W. J. 2004. Severe acute respiratory syndrome coronavirus phylogeny: toward consensus. J Virol. 78: 7863-7866.

Grare M., Dibama H. M., Lafosse S., Ribon A., Mourer M., Regnouf-de-Vains J. B., Finance C. and 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. and 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. and Coleman A. W. 2003. Interactions of amphiphilic calix[4]arene-based Solid Lipid Nanoparticles with bovine serum albumin. Int. J. Pharm. 257: 69-73.

Guan Y., Zheng B. J., He Y. Q., Liu X. L., Zhuang Z. X., Cheung C. L., Luo S. W., Li P. H., Zhang L. J., Guan Y. J., Butt K. M., Wong K. L., Chan K. W., Lim W., Shortridge K. F., Yuen K. Y., Peiris J. S. and Poon L. L. 2003. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. Science. 302: 276-278.

Gutsche C. D. and 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., Jr., Moskalski P. B. and Hendley J. O. 1980. Interruption of experimental rhinovirus transmission. J. Infect. Dis. 142: 811-815.

Hamre D. and Procknow J. J. 1966. A new virus isolated from the human respiratory tract. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121: 190-193.

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. and 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.

Hioki H., Yamada T., Fujioka C. and Kodama M. 1999. Peptide library based on calix[4]arene. Tet. Lett. 40: 6821-6825.

Hofmann H., Pyrc K., van der Hoek L., Geier M., Berkhout B. and Pohlmann S. 2005. Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102: 7988-7993.

Holmes K. V. 2001. Coronaviruses. In: Fields virology. D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman and S. E. Straus (Eds). Philadelphia. 1187-1203.

Holmes K. V. and Enjuanes L. 2003. Virology. The SARS coronavirus: a postgenomic era. Science. 300: 1377-1378.

Hsu L. Y., Lee C. C., Green J. A., Ang B., Paton N. I., Lee L., Villacian J. S., Lim P. L., Earnest A. and Leo Y. S. 2003. Severe acute respiratory syndrome (SARS) in Singapore: clinical features of index patient and initial contacts. Emerg. Infect. Dis. 9: 713-717.

Huang Y., Lau S. K., Woo P. C. and Yuen K. Y. 2008. CoVDB: a comprehensive database for comparative analysis of coronavirus genes and genomes. Nucleic Acids Res. 36: D504-511.

Hulmes D., Coleman A. and Aubert-Foucher E. 2000. Brevet n°WO00/7585. Use of calix(n)arenes for treating fibrotic diseases.

Hwang K., Liu S. Y., Lee T. and 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. and Choy W. 1994. Brevet n°WO94/03164. Inhibition and treatment of infection by envelopped virus with calix(n)arene compounds.

ICTV. 2009a. Master Species List 2009 - Version 3. [en ligne]. Date de consultation: 15 février 2010. http://talk.ictvonline.org/files/ictv_documents/m/msl/1231.aspx.

ICTV. 2009b. Taxonomic proposal to the ICTV Executive Committee, Revision of the family Coronaviridae (2008.085-126V). [en ligne]. Date de consultation: 15 février 2010. http://talk.ictvonline.org/files/ictv_official_taxonomy_updates_since_the_8th_report/m/vertebrate-2008/1230.aspx.

Ignjatovic J., Ashton D. F., Reece R., Scott P. and Hooper P. 2002. Pathogenicity of Australian strains of avian infectious bronchitis virus. J. Comp. Pathol. 126: 115-123.

Ijaz M. K., Brunner A. H., Sattar S. A., Nair R. C. and Johnson-Lussenburg C. M. 1985. Survival characteristics of airborne human coronavirus 229E. J. Gen. Virol. 66 (Pt 12): 2743-2748.

Ijaz M. K. and Rubino J. 2008. Should test methods for disinfectants use vertebrate viruses dried on carriers to advance virucidal claims? Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 29: 192-194.

Jin T., Kinjo M., Kobayashi Y. and 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.

Jonassen C. M., Kofstad T., Larsen I. L., Lovland A., Handeland K., Follestad A. and Lillehaug A. 2005. Molecular identification and characterization of novel coronaviruses infecting graylag geese (Anser anser), feral pigeons (Columbia livia) and mallards (Anas platyrhynchos). J. Gen. Virol. 86: 1597-1607.

Jones M. V., Bellamy K., Alcock R. and Hudson R. 1991. The use of bacteriophage MS2 as a model system to evaluate virucidal hand disinfectants. J. Hosp. Infect. 17: 279-285.

Kan B., Wang M., Jing H., Xu H., Jiang X., Yan M., Liang W., Zheng H., Wan K., Liu Q., Cui B., Xu Y., Zhang E., Wang H., Ye J., Li G., Li M., Cui Z., Qi X., Chen K., Du L., Gao K., Zhao Y. T., Zou X. Z., Feng Y. J., Gao Y. F., Hai R., Yu D., Guan Y. and Xu J. 2005. Molecular evolution analysis and geographic investigation of severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in palm civets at an animal market and on farms. J. Virol. 79: 11892-11900.

Kariwa H., Fujii N. and Takashima I. 2006. Inactivation of SARS coronavirus by means of povidone-iodine, physical conditions and chemical reagents. Dermatology. 212 Suppl 1: 119-123.

Kawana R., Kitamura T., Nakagomi O., Matsumoto I., Arita M., Yoshihara N., Yanagi K., Yamada A., Morita O., Yoshida Y., Furuya Y. and Chiba S. 1997. Inactivation of human viruses by povidone-iodine in comparison with other antiseptics. Dermatology. 195 Suppl 2: 29-35.

Krijnse-Locker J., Ericsson M., Rottier P. J. and Griffiths G. 1994. Characterization of the budding compartment of mouse hepatitis virus: evidence that transport from the RER to the Golgi complex requires only one vesicular transport step. J Cell Biol. 124: 55-70.

Ksiazek T. G., Erdman D., Goldsmith C. S., Zaki S. R., Peret T., Emery S., Tong S., Urbani C., Comer J. A., Lim W., Rollin P. E., Dowell S. F., Ling A. E., Humphrey C. D., Shieh W. J., Guarner J., Paddock C. D., Rota P., Fields B., DeRisi J., Yang J. Y., Cox N., Hughes J. M., LeDuc J. W., Bellini W. J. and Anderson L. J. 2003. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. N. Engl. J. Med. 348: 1953-1966.

Kuiken T., Fouchier R. A., Schutten M., Rimmelzwaan G. F., van Amerongen G., van Riel D., Laman J. D., de Jong T., van Doornum G., Lim W., Ling A. E., Chan P. K., Tam J. S., Zambon M. C., Gopal R., Drosten C., van der Werf S., Escriou N., Manuguerra J. C., Stohr K., Peiris J. S. and Osterhaus A. D. 2003. Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome. Lancet. 362: 263-270.

Kurtz J. B. 1979. Virucidal effect of alcohols against echovirus 11. Lancet. 1: 496-497.

Lai M. Y., Cheng P. K. and Lim W. W. 2005. Survival of severe acute respiratory syndrome coronavirus. Clin. Infect. Dis. 41: e67-71.

Lamarre A. and Talbot P. J. 1989. Effect of pH and temperature on the infectivity of human coronavirus 229E. Can. J. Microbiol. 35: 972-974.

Lambert R. J. W. 2004. Evaluation of antimicrobial efficacy. In: Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization (fourth edition). A. P. Fraise, Lambert, P.A., Maillard, J.Y. (Eds). Etats-Unis. pp.345-360.

Larson H. E., Reed S. E. and Tyrrell D. A. 1980. Isolation of rhinoviruses and coronaviruses from 38 colds in adults. J. Med. Virol. 5: 221-229.

Lau S. K., Woo P. C., Li K. S., Huang Y., Tsoi H. W., Wong B. H., Wong S. S., Leung S. Y., Chan K. H. and Yuen K. Y. 2005. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 102: 14040-14045.

Lau S. K., Woo P. C., Yip C. C., Tse H., Tsoi H. W., Cheng V. C., Lee P., Tang B. S., Cheung C. H., Lee R. A., So L. Y., Lau Y. L., Chan K. H. and Yuen K. Y. 2006. Coronavirus HKU1 and other coronavirus infections in Hong Kong. J. Clin. Microbiol. 44: 2063-2071.

Laude H. and Masters P. S. 1995. The coronavirus nucleocapsid protein. In: The *Coronaviridae*. S. G. Siddell (Eds). New York.

Laude H., Rasschaert D., Delmas B. and Eleouët J. F. 1998. Le coronavirus respiratoire porcin PRCV : un virus émergent pas comme les autres. Virologie. 2: 305-316.

Lee N., Hui D., Wu A., Chan P., Cameron P., Joynt G. M., Ahuja A., Yung M. Y., Leung C. B., To K. F., Lui S. F., Szeto C. C., Chung S. and Sung J. J. 2003. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. N. Engl. J. Med. 348: 1986-1994.

Leparc-Goffart I., Hingley S. T., Chua M. M., Phillips J., Lavi E. and Weiss S. R. 1998. Targeted recombination within the spike gene of murine coronavirus mouse hepatitis virus-A59: Q159 is a determinant of hepatotropism. J. Virol. 72: 9628-9636.

Li B. X., Ge J. W. and Li Y. J. 2007. Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus. Virology. 365: 166-172.

Li W., Moore M. J., Vasilieva N., Sui J., Wong S. K., Berne M. A., Somasundaran M., Sullivan J. L., Luzuriaga K., Greenough T. C., Choe H. and Farzan M. 2003. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. Nature. 426: 450-454.

Li W., Shi Z., Yu M., Ren W., Smith C., Epstein J. H., Wang H., Crameri G., Hu Z., Zhang H., Zhang J., McEachern J., Field H., Daszak P., Eaton B. T., Zhang S. and Wang L. F. 2005. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. Science. 310: 676-679.

Liang S. C., Schoeb T. R., Davis J. K., Simecka J. W., Cassell G. H. and Lindsey J. R. 1995. Comparative severity of respiratory lesions of sialodacryoadenitis virus and Sendai virus infections in LEW and F344 rats. Vet. Pathol. 32: 661-667.

Lipsitch M., Cohen T., Cooper B., Robins J. M., Ma S., James L., Gopalakrishna G., Chew S. K., Tan C. C., Samore M. H., Fisman D. and Murray M. 2003. Transmission dynamics and control of severe acute respiratory syndrome. Science. 300: 1966-1970.

Liu Y., Peterson D. A., Kimura H. and Schubert D. 1997. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. J. Neurochem. 69: 581-593.

Lloyd-Evans N., Springthorpe V. S. and Sattar S. A. 1986. Chemical disinfection of human rotavirus-contaminated inanimate surfaces. J. Hyg. (Lond). 97: 163-173.

Marra M. A., Jones S. J., Astell C. R., Holt R. A., Brooks-Wilson A., Butterfield Y. S., Khattra J., Asano J. K., Barber S. A., Chan S. Y., Cloutier A., Coughlin S. M., Freeman D., Girn N., Griffith O. L., Leach S. R., Mayo M., McDonald H., Montgomery S. B., Pandoh P. K., Petrescu A. S., Robertson A. G., Schein J. E., Siddiqui A., Smailus D. E., Stott J. M., Yang G. S., Plummer F., Andonov A., Artsob H., Bastien N., Bernard K., Booth T. F., Bowness D., Czub M., Drebot M., Fernando L., Flick R., Garbutt M., Gray M., Grolla A., Jones S., Feldmann H., Meyers A., Kabani A., Li Y., Normand S., Stroher U., Tipples G. A., Tyler S., Vogrig R., Ward D., Watson B., Brunham R. C., Krajden M., Petric M., Skowronski D. M., Upton C. and Roper R. L. 2003. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. Science. 300: 1399-1404.

Mayo M. A. 2002. A summary f taxonomic changes recently approved by ICTV. Arch. Virol. 147: 1655-1656.

Mbithi J. N., Springthorpe V. S., Boulet J. R. and 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. and 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. and 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.

McIntosh K., Chao R. K., Krause H. E., Wasil R., Mocega H. E. and Mufson M. A. 1974. Coronavirus infection in acute lower respiratory tract disease of infants. J. Infect. Dis. 130: 502-507.

McIntosh K., Dees J. H., Becker W. B., Kapikian A. Z. and Chanock R. M. 1967. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 57: 933-940.

Merck Index. 10ème édition. 1983. Merck Eds. New york.

Meunier S. J. and Roy R. 1996. Polysialosides scaffolded on p-Tert-butylcalix[4]arene. Tet. Lett. 37: 5469-5472.

Mihindukulasuriya K. A., Wu G., St Leger J., Nordhausen R. W. and Wang D. 2008. Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a panviral microarray. J Virol. 82: 5084-5088.

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.

Moes E., Vijgen L., Keyaerts E., Zlateva K., Li S., Maes P., Pyrc K., Berkhout B., van der Hoek L. and Van Ranst M. 2005. A novel pancoronavirus RT-PCR assay: frequent detection of human coronavirus NL63 in children hospitalized with respiratory tract infections in Belgium. BMC Infect. Dis. 5: 6.

Molenveld P., Engbersen J. F. J. and 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. and 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. and 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.

Morace G., Bellamy K., Maris P. and Steinmann J. 2009. Evaluation of the virucidal activity of chemical disinfectants and antiseptics: the European point of view. Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 30: 301-302; author reply 302-304.

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. and 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. and 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. and Regnouf-de-Vains J. B. 2010. Synthesis and anti-HIV evaluation of water-soluble calixarene-based bithiazolyl podands. Bioorg. Med. Chem. 18: 36-45.

Murray R. S., Brown B., Brian D. and Cabirac G. F. 1992. Detection of coronavirus RNA and antigen in multiple sclerosis brain. Ann. Neurol. 31: 525-533.

Narang H. K. and Codd A. A. 1983. Action of commonly used disinfectants against enteroviruses. J. Hosp. Infect. 4: 209-212.

Nicholson K. G., Kent J., Hammersley V. and Cancio E. 1997. Acute viral infections of upper respiratory tract in elderly people living in the community: comparative, prospective, population based study of disease burden. BMJ. 315: 1060-1064.

Ortego J., Sola I., Almazan F., Ceriani J. E., Riquelme C., Balasch M., Plana J. and Enjuanes L. 2003. Transmissible gastroenteritis coronavirus gene 7 is not essential but influences in vivo virus replication and virulence. Virology. 308: 13-22.

Papageorgiou G. T., Moce-Llivina L. and Jofre J. 2001. New method for evaluation of virucidal activity of antiseptics and disinfectants. Appl. Environ. Microbiol. 67: 5844-5848.

Park H. S., Lin Q. and Hamilton A. D. 1998. Protein Surface Recognition by Synthetic Receptors: A Route to Novel Submicromolar Inhibitors for Î±-Chymotrypsin. J. Am. Chem. Soc. 121: 8-13.

Pasternak A. O., Spaan W. J. and Snijder E. J. 2006. Nidovirus transcription: how to make sense...? J. Gen. Virol. 87: 1403-1421.

Pedersen N. C. 2009. A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963-2008. J. Feline Med. Surg. 11: 225-258.

Peiris J. S., Chu C. M., Cheng V. C., Chan K. S., Hung I. F., Poon L. L., Law K. I., Tang B. S., Hon T. Y., Chan C. S., Chan K. H., Ng J. S., Zheng B. J., Ng W. L., Lai R. W., Guan Y. and Yuen K. Y. 2003a. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. Lancet. 361: 1767-1772.

Peiris J. S., Lai S. T., Poon L. L., Guan Y., Yam L. Y., Lim W., Nicholls J., Yee W. K., Yan W. W., Cheung M. T., Cheng V. C., Chan K. H., Tsang D. N., Yung R. W., Ng T. K. and Yuen K. Y. 2003b. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. Lancet. 361: 1319-1325.

Peiris J. S., Yuen K. Y., Osterhaus A. D. and Stohr K. 2003c. The severe acute respiratory syndrome. N. Engl. J. Med. 349: 2431-2441.

Pellet-Rostaing S., Regnouf-de-Vains J.-B. and Lamartine R. 1996. 2,2'-Bithiazolyl-p-tert-butylcalix[4]arene podands. Synthesis and fluorescence properties. Tet. Lett. 37: 5889-5892.

Pene F., Merlat A., Vabret A., Rozenberg F., Buzyn A., Dreyfus F., Cariou A., Freymuth F. and Lebon P. 2003. Coronavirus 229E-related pneumonia in immunocompromised patients. Clin. Infect. Dis. 37: 929-932.

Pfeifer M. L., Evermann J. F., Roelke M. E., Gallina A. M., Ott R. L. and McKeirnan A. J. 1983. Feline infectious peritonitis in a captive cheetah. J. Am. Vet. Med. Assoc. 183: 1317-1319.

Platt J. and Bucknall R. A. 1985. The disinfection of respiratory syncytial virus by isopropanol and a chlorhexidine-detergent handwash. J. Hosp. Infect. 6: 89-94.

Pocock D. H. and Garwes D. J. 1975. The influence of pH on the growth and stability of transmissible gastroenteritis virus in vitro. Arch. Virol. 49: 239-247.

Poland A. M., Vennema H., Foley J. E. and Pedersen N. C. 1996. Two related strains of feline infectious peritonitis virus isolated from immunocompromised cats infected with a feline enteric coronavirus. J. Clin. Microbiol. 34: 3180-3184.

Poon L. L., Chu D. K., Chan K. H., Wong O. K., Ellis T. M., Leung Y. H., Lau S. K., Woo P. C., Suen K. Y., Yuen K. Y., Guan Y. and Peiris J. S. 2005. Identification of a novel coronavirus in bats. J. Virol. 79: 2001-2009.

Poutanen S. M., Low D. E., Henry B., Finkelstein S., Rose D., Green K., Tellier R., Draker R., Adachi D., Ayers M., Chan A. K., Skowronski D. M., Salit I., Simor A. E., Slutsky A. S., Doyle P. W., Krajden M., Petric M., Brunham R. C. and McGeer A. J. 2003. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. N. Engl. J. Med. 348: 1995-2005.

Pratelli A. 2008. Canine coronavirus inactivation with physical and chemical agents. Vet. J. 177: 71-79.

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.

Purohit A., Kopferschmitt-Kubler M. C., Moreau C., Popin E., Blaumeiser M. and Pauli G. 2000. Quaternary ammonium compounds and occupational asthma. Int. Arch. Occup. Environ. Health. 73: 423-427.

Rabenau H. F., Cinatl J., Morgenstern B., Bauer G., Preiser W. and Doerr H. W. 2005a. Stability and inactivation of SARS coronavirus. Med. Microbiol. Immunol. 194: 1-6.

Rabenau H. F., Kampf G., Cinatl J. and Doerr H. W. 2005b. Efficacy of various disinfectants against SARS coronavirus. J. Hosp. Infect. 61: 107-111.

Rasschaert D., Duarte M. and Laude H. 1990. Porcine respiratory coronavirus differs from transmissible gastroenteritis virus by a few genomic deletions. J. Gen. Virol. 71 2599-2607.

Ravis S. M., Shaffer M. P., Shaffer C. L., Dehkhaghani S. and Belsito D. V. 2003. Glutaraldehyde-induced and formaldehyde-induced allergic contact dermatitis among dental hygienists and assistants. J. Am. Dent. Assoc. 134: 1072-1078.

Reed L. J. and Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hyg. 27: 493-497.

Riley S., Fraser C., Donnelly C. A., Ghani A. C., Abu-Raddad L. J., Hedley A. J., Leung G. M., Ho L. M., Lam T. H., Thach T. Q., Chau P., Chan K. P., Lo S. V., Leung P. Y., Tsang T., Ho W., Lee K. H., Lau E. M., Ferguson N. M. and Anderson R. M. 2003. Transmission dynamics of the etiological agent of SARS in Hong Kong: impact of public health interventions. Science. 300: 1961-1966.

Rivers T. M. 1937. Viruses and Koch's Postulates. J. Bacteriol. 33: 1-12.

Rota P. A., Oberste M. S., Monroe S. S., Nix W. A., Campagnoli R., Icenogle J. P., Penaranda S., Bankamp B., Maher K., Chen M. H., Tong S., Tamin A., Lowe L., Frace M., DeRisi J. L., Chen Q., Wang D., Erdman D. D., Peret T. C., Burns C., Ksiazek T. G., Rollin P. E., Sanchez A., Liffick S., Holloway B., Limor J., McCaustland K., Olsen-Rasmussen M., Fouchier R., Gunther S., Osterhaus A. D., Drosten C., Pallansch M. A., Anderson L. J. and Bellini W. J. 2003. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. Science. 300: 1394-1399.

Rottier P. J. M. 1995. The coronavirus membrane glycoprotein. In: The *Coronaviridae*. S. G. Siddell (Eds). New York.

Salmi A., Ziola B., Hovi T. and Reunanen M. 1982. Antibodies to coronaviruses OC43 and 229E in multiple sclerosis patients. Neurology. 32: 292-295.

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. and 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. and 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. and 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. and Springthorpe V. S. 2001. New methods for efficacy testing of disinfectants and antiseptics. In: Disinfection, Sterilization, and Antisepsis: Principles and Practices in Healthcare Facilities. W. A. Rutala (Eds). Washington DC. 173-186.

Sattar S. A., Springthorpe V. S., Adegbunrin O., Zafer A. A. and 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. and Loro P. 1989. Chemical disinfection of non-porous inanimate surfaces experimentally contaminated with four human pathogenic viruses. Epidemiol. Infect. 102: 493-505.

Sawicki D., Wang T. and Sawicki S. 2001. The RNA structures engaged in replication and transcription of the A59 strain of mouse hepatitis virus. J Gen Virol. 82: 385-396.

Sawicki S. G. and Sawicki D. L. 1995. Coronaviruses use discontinuous extension for synthesis of subgenome-length negative strands. Adv Exp Med Biol. 380: 499-506.

Sawicki S. G. and Sawicki D. L. 2005. Coronavirus transcription: a perspective. Curr Top Microbiol Immunol. 287: 31-55.

Sawicki S. G., Sawicki D. L. and Siddell S. G. 2007. A contemporary view of coronavirus transcription. J Virol. 81: 20-29.

Schultze B. and Herrler G. 1992. Bovine coronavirus uses N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid as a receptor determinant to initiate the infection of cultured cells. J Gen Virol. 73 (Pt 4): 901-906.

Shi S. T. and Lai M. M. 2005. Viral and cellular proteins involved in coronavirus replication. Curr Top Microbiol Immunol. 287: 95-131.

Shi Y. and 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. and 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. and Manabe O. 1984. New water-soluble host molecules derived from calix[6]arene. Tet. Lett. 25: 5315-5318.

Sickbert-Bennett E. E., Weber D. J., Gergen-Teague M. F., Sobsey M. D., Samsa G. P. and Rutala W. A. 2005. Comparative efficacy of hand hygiene agents in the reduction of bacteria and viruses. Am. J. Infect. Control. 33: 67-77.

Sitbon M. 1985. Human-enteric-coronaviruslike particles (CVLP) with different epidemiological characteristics. J. Med. Virol. 16: 67-76.

Sizun J., Yu M. W. and Talbot P. J. 2000. Survival of human coronaviruses 229E and OC43 in suspension and after drying onsurfaces: a possible source ofhospital-acquired infections. J. Hosp. Infect. 46: 55-60.

Sloots T. P., McErlean P., Speicher D. J., Arden K. E., Nissen M. D. and Mackay I. M. 2006. Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. J. Clin. Virol. 35: 99-102.

Snijder E. J., Bredenbeek P. J., Dobbe J. C., Thiel V., Ziebuhr J., Poon L. L., Guan Y., Rozanov M., Spaan W. J. and Gorbalenya A. E. 2003. Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. J Mol Biol. 331: 991-1004.

Snijder E. J. and Horzinek M. C. 1993. Toroviruses: replication, evolution and comparison with other members of the coronavirus-like superfamily. J Gen Virol. 74 (Pt 11): 2305-2316.

Snijder E. J. and Meulenberg J. J. 1998. The molecular biology of arteriviruses. J Gen Virol. 79 (Pt 5): 961-979.

Snijder E. J., van der Meer Y., Zevenhoven-Dobbe J., Onderwater J. J., van der Meulen J., Koerten H. K. and Mommaas A. M. 2006. Ultrastructure and origin of membrane vesicles associated with the severe acute respiratory syndrome coronavirus replication complex. J Virol. 80: 5927-5940.

Spire B., Barre-Sinoussi F., Montagnier L. and 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. and Sattar S. A. 1986. Chemical disinfection of human rotaviruses: efficacy of commercially-available products in suspension tests. J. Hyg. (Lond). 97: 139-161.

St-Jean J. R., Jacomy H., Desforges M., Vabret A., Freymuth F. and Talbot P. J. 2004. Human respiratory coronavirus OC43: genetic stability and neuroinvasion. J. Virol. 78: 8824-8834.

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.

Stewart J. N., Mounir S. and Talbot P. J. 1992. Human coronavirus gene expression in the brains of multiple sclerosis patients. Virology. 191: 502-505.

Sturman L. S., Ricard C. S. and Holmes K. V. 1990. Conformational change of the coronavirus peplomer glycoprotein at pH 8.0 and 37 degrees C correlates with virus aggregation and virus-induced cell fusion. J Virol. 64: 3042-3050.

Sui J., Li W., Murakami A., Tamin A., Matthews L. J., Wong S. K., Moore M. J., Tallarico A. S., Olurinde M., Choe H., Anderson L. J., Bellini W. J., Farzan M. and Marasco W. A. 2004. Potent neutralization of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a human mAb to S1 protein that blocks receptor association. Proc Natl Acad Sci U S A. 101: 2536-2541.

Sutton S. V., Wrzosek T. and Proud D. W. 1991. Neutralization efficacy of Dey-Engley medium in testing of contact lens disinfecting solutions. J. Appl. Bacteriol. 70: 351-354.

Sutton S. V. W. 1996. Neutralizer evaluation as control experiments for antimicrobial efficacy tests. In: Hanbook of disinfectants and antiseptics. J. M. Ascenzi (Eds). New York. pp.43-62.

Talbot H. K., Shepherd B. E., Crowe J. E., Jr., Griffin M. R., Edwards K. M., Podsiad A. B., Tollefson S. J., Wright P. F. and Williams J. V. 2009. The pediatric burden of human coronaviruses evaluated for twenty years. Pediatr. Infect. Dis. J. 28: 682-687.

Tennant B. J., Gaskell R. M., Kelly D. F., Carter S. D. and Gaskell C. J. 1991. Canine coronavirus infection in the dog following oronasal inoculation. Res. Vet. Sci. 51: 11-18.

Tresnan D. B., Levis R. and Holmes K. V. 1996. Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine, and human coronaviruses in serogroup I. J. Virol. 70: 8669-8674.

Tu C., Crameri G., Kong X., Chen J., Sun Y., Yu M., Xiang H., Xia X., Liu S., Ren T., Yu Y., Eaton B. T., Xuan H. and Wang L. F. 2004. Antibodies to SARS coronavirus in civets. Emerg. Infect. Dis. 10: 2244-2248.

Turner R. B. and Hendley J. O. 2005. Virucidal hand treatments for prevention of rhinovirus infection. J. Antimicrob. Chemother. 56: 805-807.

Tyler R. and Ayliffe G. A. 1987. A surface test for virucidal activity of disinfectants: preliminary study with herpes virus. J. Hosp. Infect. 9: 22-29.

Tyrrell D. A. and Bynoe M. L. 1965. Cultivation of a Novel Type of Common-Cold Virus in Organ Cultures. Br. Med. J. 1: 1467-1470.

Vabret A., Dina J., Brison E., Brouard J. and Freymuth F. 2009. [Human coronaviruses.]. Pathol Biol (Paris). 57: 149-160.

Vabret A., Dina J., Gouarin S., Petitjean J., Corbet S. and Freymuth F. 2006. Detection of the new human coronavirus HKU1: a report of 6 cases. Clin. Infect. Dis. 42: 634-639.

Vabret A., Dina J., Gouarin S., Petitjean J., Tripey V., Brouard J. and Freymuth F. 2008. Human (non-severe acute respiratory syndrome) coronavirus infections in hospitalised children in France. J. Paediatr. Child. Health. 44: 176-181.

Vabret A., Mourez T., Dina J. and Freymuth F. 2005a. Coronavirus humains. Virologie. 9: 273-287.

Vabret A., Mourez T., Dina J., van der Hoek L., Gouarin S., Petitjean J., Brouard J. and Freymuth F. 2005b. Human coronavirus NL63, France. Emerg. Infect. Dis. 11: 1225-1229.

Vabret A., Mourez T., Gouarin S., Petitjean J. and Freymuth F. 2003. An outbreak of coronavirus OC43 respiratory infection in Normandy, France. Clin. Infect. Dis. 36: 985-989.

Vabret A., Mouthon F., Mourez T., Gouarin S., Petitjean J. and Freymuth F. 2001. Direct diagnosis of human respiratory coronaviruses 229E and OC43 by the polymerase chain reaction. J. Virol. Methods. 97: 59-66.

Vadrot C. and Darbord J. C. 2006. Quantitative evaluation of prion inactivation comparing steam sterilization and chemical sterilants: proposed method for test standardization. J Hosp Infect. 64: 143-148.

Valot S., Edert D. and Le Faou A. 2000. A simple method for the in vitro study of the virucidal activity of disinfectants. J. Virol. Methods. 86: 21-24.

Van Bommel K. J. C., Verboom W., Hulst R., Kooijman H., Spek A. L. and Reinhoudt D. N. 2000. Calix[4]arene Rhenium(V) Complexes as Potential Radiopharmaceuticals. Inorg. Chem. 39: 4099-4106.

Van der Hoek L., Pyrc K., Jebbink M. F., Vermeulen-Oost W., Berkhout R. J., Wolthers K. C., Wertheim-van Dillen P. M., Kaandorp J., Spaargaren J. and Berkhout B. 2004. Identification of a new human coronavirus. Nat. Med. 10: 368-373.

Van der Hoek L., Sure K., Ihorst G., Stang A., Pyrc K., Jebbink M. F., Petersen G., Forster J., Berkhout B. and Uberla K. 2005. Croup is associated with the novel coronavirus NL63. PLoS Med. 2: e240.

Van Elden L. J., van Loon A. M., van Alphen F., Hendriksen K. A., Hoepelman A. I., van Kraaij M. G., Oosterheert J. J., Schipper P., Schuurman R. and Nijhuis M. 2004. Frequent detection of human

coronaviruses in clinical specimens from patients with respiratory tract infection by use of a novel real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction. J. Infect. Dis. 189: 652-657.

Varia M., Wilson S., Sarwal S., McGeer A., Gournis E., Galanis E. and Henry B. 2003. Investigation of a nosocomial outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Toronto, Canada. CMAJ. 169: 285-292.

Vennema H., Godeke G. J., Rossen J. W., Voorhout W. F., Horzinek M. C., Opstelten D. J. and Rottier P. J. 1996. Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. EMBO J. 15: 2020-2028.

Vennema H., Poland A., Foley J. and Pedersen N. C. 1998. Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. Virology. 243: 150-157.

Vijgen L., Keyaerts E., Moes E., Thoelen I., Wollants E., Lemey P., Vandamme A. M. and Van Ranst M. 2005. Complete genomic sequence of human coronavirus OC43: molecular clock analysis suggests a relatively recent zoonotic coronavirus transmission event. J. Virol. 79: 1595-1604.

Vu T. H., Cabau J. F., Nguyen N. T. and Lenoir M. 2003. SARS in Northern Vietnam. N. Engl. J. Med. 348: 2035.

Watts J. 2004. China culls wild animals to prevent new SARS threat. Lancet. 363: 134.

Wenzel R. P., Hendley J. O., Davies J. A. and Gwaltney J. M., Jr. 1974. Coronavirus infections in military recruits. Three-year study with coronavirus strains OC43 and 229E. Am. Rev. Respir. Dis. 109: 621-624.

WHO. 2003a. First data on stability and resistance of SARS coronavirus compiled by members of WHO laboratory network. [en ligne]. Date de consultation: 16 Février 2010. http://www.who.int/csr/sars/survival_2003_05_04/en/index.html.

WHO. 2003b. Global surveillance for Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). Wkly. Epidemiol. Rec. 78: 100-109.

WHO. 2003c. Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003. [en ligne]. Date de consultation: 21 Février 2010. http://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/index.html.

WHO. 2003d. WHO recommended measures for persons undertaking international travel from areas affected by Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). Wkly. Epidemiol. Rec. 78: 97-100.

WHO multicentre collaborative network for Severe Acute Respiratory Syndrome diagnosis. 2003. A multicentre collaboration to investigate the cause of severe acute respiratory syndrome. Lancet. 361: 1730-1733.

Wieser C., Dieleman C. B. and Matt D. 1997. Calixarene and resorcinarene ligands in transition metal chemistry. Coord. Chem. Rev. 165: 93-161.

Williams R. K., Jiang G. S. and Holmes K. V. 1991. Receptor for mouse hepatitis virus is a member of the carcinoembryonic antigen family of glycoproteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 88: 5533-5536.

Winther B., McCue K., Ashe K., Rubino J. R. and Hendley J. O. 2007. Environmental contamination with rhinovirus and transfer to fingers of healthy individuals by daily life activity. J. Med. Virol. 79: 1606-1610.

Woo P. C., Lau S. K., Chu C. M., Chan K. H., Tsoi H. W., Huang Y., Wong B. H., Poon R. W., Cai J. J., Luk W. K., Poon L. L., Wong S. S., Guan Y., Peiris J. S. and Yuen K. Y. 2005a. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. J. Virol. 79: 884-895.

Woo P. C., Lau S. K., Li K. S., Poon R. W., Wong B. H., Tsoi H. W., Yip B. C., Huang Y., Chan K. H. and Yuen K. Y. 2006. Molecular diversity of coronaviruses in bats. Virology. 351: 180-187.

Woo P. C., Lau S. K., Tsoi H. W., Huang Y., Poon R. W., Chu C. M., Lee R. A., Luk W. K., Wong G. K., Wong B. H., Cheng V. C., Tang B. S., Wu A. K., Yung R. W., Chen H., Guan Y., Chan K. H. and Yuen K. Y. 2005b. Clinical and molecular epidemiological features of coronavirus HKU1-associated community-acquired pneumonia. J. Infect. Dis. 192: 1898-1907.

Wood A. and Payne D. 1998. The action of three antiseptics/disinfectants against enveloped and non-enveloped viruses. J. Hosp. Infect. 38: 283-295.

Yang W. and 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.

Yeager C. L., Ashmun R. A., Williams R. K., Cardellichio C. B., Shapiro L. H., Look A. T. and Holmes K. V. 1992. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. Nature. 357: 420-422.

Zarnke R. L., Evermann J., Ver Hoef J. M., McNay M. E., Boertje R. D., Gardner C. L., Adams L. G., Dale B. W. and Burch J. 2001. Serologic survey for canine coronavirus in wolves from Alaska. J. Wildl. Dis. 37: 740-745.

Zhang X. M., Herbst W., Kousoulas K. G. and Storz J. 1994. Biological and genetic characterization of a hemagglutinating coronavirus isolated from a diarrhoeic child. J. Med. Virol. 44: 152-161.

Zhao Z., Zhang F., Xu M., Huang K., Zhong W., Cai W., Yin Z., Huang S., Deng Z., Wei M., Xiong J. and Hawkey P. M. 2003. Description and clinical treatment of an early outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangzhou, PR China. J. Med. Microbiol. 52: 715-720.

Zhong N. S., Zheng B. J., Li Y. M., Poon, Xie Z. H., Chan K. H., Li P. H., Tan S. Y., Chang Q., Xie J. P., Liu X. Q., Xu J., Li D. X., Yuen K. Y., Peiris and Guan Y. 2003. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. Lancet. 362: 1353-1358.

Zuniga S., Sola I., Alonso S. and Enjuanes L. 2004. Sequence motifs involved in the regulation of discontinuous coronavirus subgenomic RNA synthesis. J Virol. 78: 980-994.

Annexe 1 : Liste des formules utilisées

Équation 1 : Pourcentage de viabilité cellulaire

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

où l'échantillon correspond aux puits contenant les cellules et la solution à tester, le témoin X correspond au témoin milieu seul, le témoin Y correspond au témoin cellule (100% de viabilité) et le témoin Z correspond au témoin milieu + solution à tester.

Équation 2 : Pourcentage de cytotoxicité

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

L'échantillon correspond aux puits contenant les cellules et la solution à tester, le témoin X correspond au témoin milieu seul (0% de cytotoxicité), le témoin Y correspond au témoin cellule et le témoin Z correspond au témoin milieu + solution à tester.

Équation 3 : Loi de Beer-Lambert

$$A = \varepsilon.l.c$$

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

Équation 4 : Taux de rétention des molécules testées par les colonnes de Séphadex™

$$TR = (Ci-Cf)/Ci) \times 100$$

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

Annexe 2 : Analyse statistique et spectrophotométrique pour l'optimisation de la conception des colonnes de Séphadex™

1 Optimisation des colonnes de Séphadex™ G–25

1.1 Homogénéité des volumes de gels obtenus après la première centrifugation

Volumes de gels obtenus

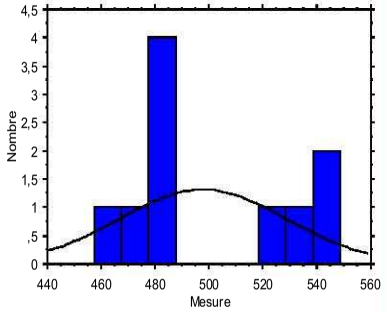
Volume de gels obtenus après la première centrifugation			
Lot A	Lot B	Lot C	Lot D
460	490	510	510
520	500	490	550
530	520	510	530
540	490	500	530
470	540	500	520
480	560	530	550
480	520	530	500
540	530	530	550
480	500	520	550
480	530	510	480

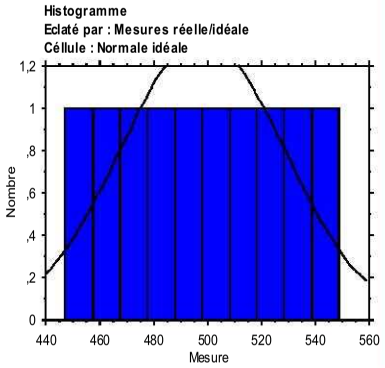
Evaluation de la normalité des distributions pour chaque lot : Test de Komolgorov-Smirnov

Lot A

Kolmogorov-Smirnov pourMesure
Variables groupe : Mesures réelle/idéale

DDL	2
Nombre,Réelle	10
Nombre,Normale idéale	10
Différence maximum	,300
Chi 2	1,800
Valeur de p	,8131

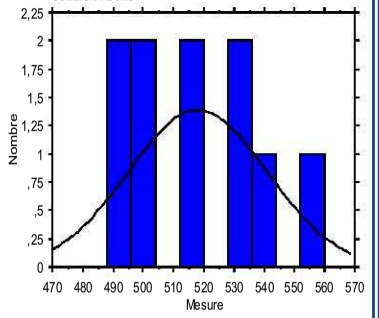


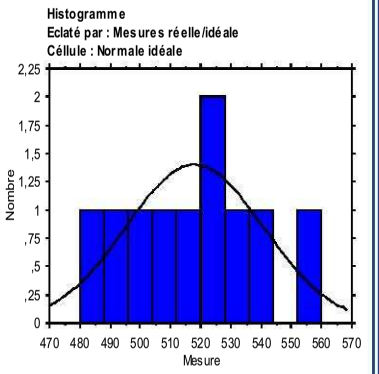


Lot B

Kolmogorov-Smirnov pourMesure
Variables groupe : Mesures réelle/idéale

DDL	2
Nombre,Réelle	10
Nombre,Normale idéale	10
Différence maximum	,200
Chi 2	,800
Valeur de p	>,9999

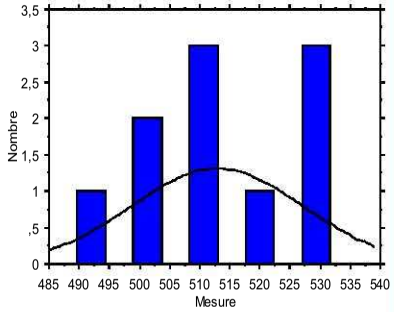


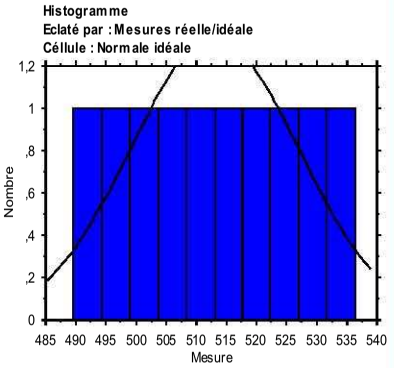


Lot C

Kolmogorov-Smirnov pourMesure
Variables groupe : Mesures réelle/idéale

DDL	2
Nombre,Réelle	10
Nombre,Normale idéale	10
Différence maximum	,200
Chi 2	,800
Valeur de p	>,9999

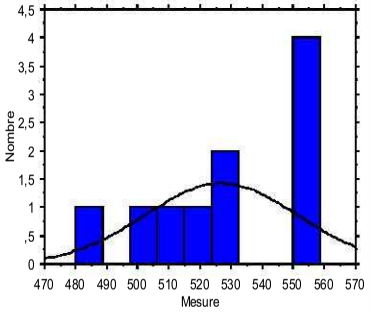


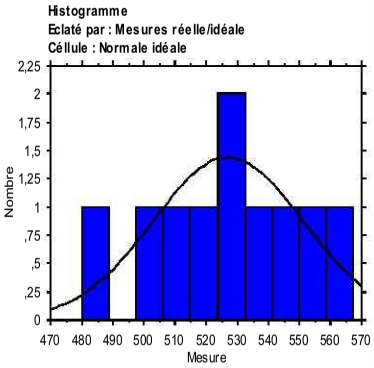


Lot D

Kolmogorov-Smirnov pourMesure
Variables groupe : Mesures réelle/idéale

DDL	2
Nombre,Réelle	10
Nombre,Normale idéale	10
Différence maximum	,200
Chi 2	,800
Valeur de p	>,9999





Lot A

p = 0,8131 : Les distributions ne sont pas significativement différentes. La distribution peut être considérée comme normale.

Lot B

p > 0,9999 : Les distributions ne sont pas significativement différentes. La distribution peut être considérée comme normale.

Lot C

p > 0,9999 : Les distributions ne sont pas significativement différentes. La distribution peut être considérée comme normale.

Lot D

p > 0,9999 : Les distributions ne sont pas significativement différentes. La distribution peut être considérée comme normale.

Note : Si p < 0,05, la différence est significative et la distribution ne peut pas être considérée comme normale.

Test d'homogénéité des variances pour 3 groupes ou plus : Test de Bartlett

p = 0,1888 > 0,05 donc les variances peuvent être considérées comme homogènes.

Test ANOVA pour la comparaison des moyennes de 3 groupes ou plus

Tableau ANOVA pour Gel volume G25

	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p	Lambda	Puissance
Gel volume G-25	3	4420,000	1473,333	2,582	,0684	7,747	,580
Résidu	36	20540,000	570,556				

Tableau de moyennes pour Gel volume G25
Effet : Gel volume G-25

	Nombre	Moyenne	Dév. Std.	Err. Std.
lot A	10	498,000	30,840	9,752
lot B	10	518,000	22,998	7,272
lot C	10	513,000	14,181	4,485
lot D	10	527,000	24,518	7,753

p = 0,0684 > 0,05 donc il n'y a pas de différence significative entre les moyennes.

1.2 Homogénéité des volumes de filtrats obtenus après la deuxième centrifugation

Volumes des filtrats obtenus

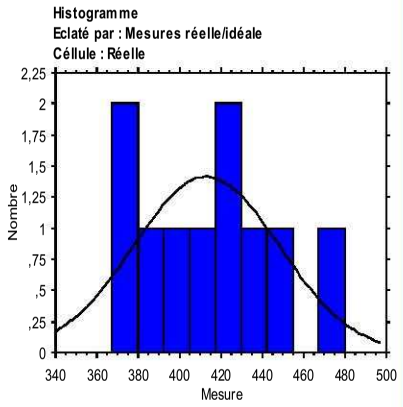
Volume de filtrats obtenus après la 2ème centrifugation			
Lot A	**Lot B**	**Lot C**	**Lot D**
380	420	490	410
420	380	420	430
420	420	440	440
370	440	450	440
410	420	430	420
430	430	410	400
480	430	420	430
400	420	410	420
370	430	420	420
450	430	420	440

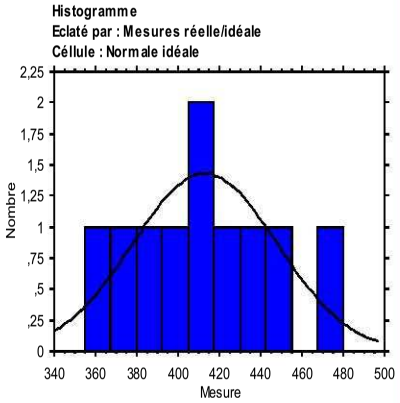
Evaluation de la normalité des distributions pour chaque lot : Test de Komolgorov-Smirnov

Lot A

Kolmogorov-Smirnov pourMesure
Variables groupe : Mesures réelle/idéale

DDL	2
Nombre,Réelle	10
Nombre,Normale idéale	10
Différence maximum	,100
Chi 2	,200
Valeur de p	>,9999

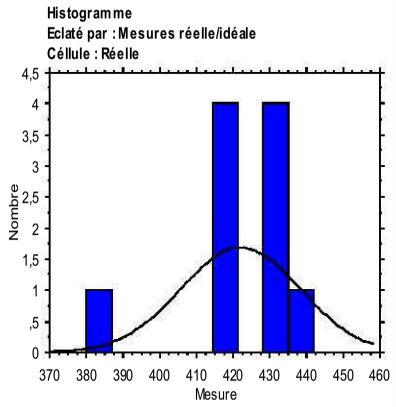


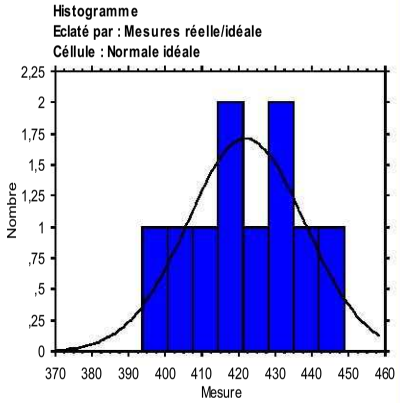


Lot B

Kolmogorov-Smirnov pourMesure
Variables groupe : Mesures réelle/idéale

DDL	2
Nombre,Réelle	10
Nombre,Normale idéale	10
Différence maximum	,400
Chi 2	3,200
Valeur de p	,4038

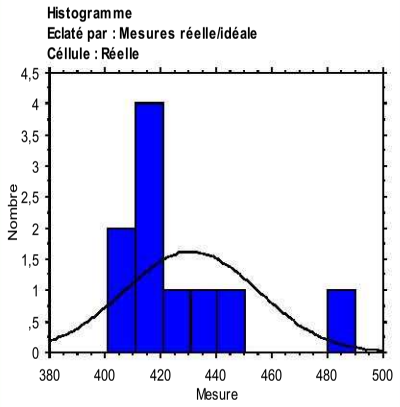


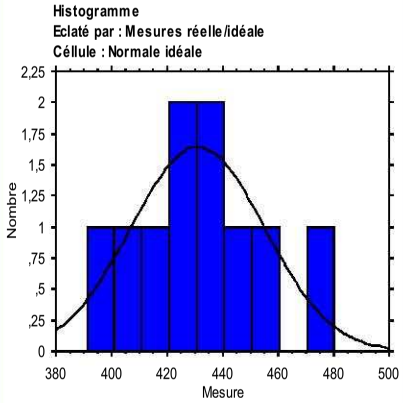


Lot C

Kolmogorov-Smirnov pourMesure
Variables groupe : Mesures réelle/idéale

DDL	2
Nombre,Réelle	10
Nombre,Normale idéale	10
Différence maximum	,300
Chi 2	1,800
Valeur de p	,8131

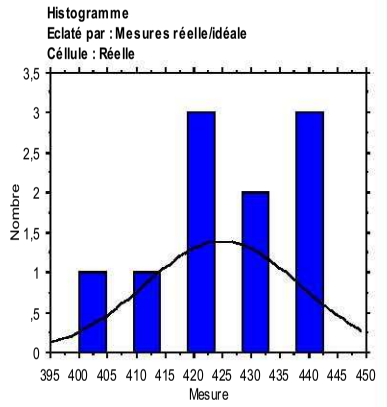


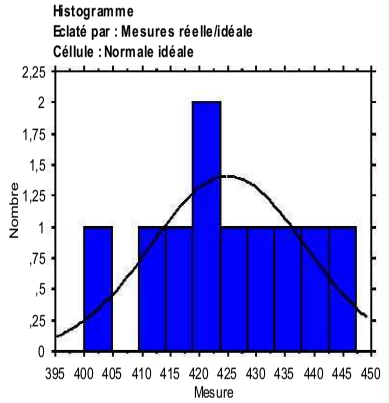


Lot D

Kolmogorov-Smirnov pourMesure
Variables groupe : Mesures réelle/idéale

DDL	2
Nombre,Réelle	10
Nombre,Normale idéale	10
Différence maximum	,200
Chi 2	,800
Valeur de p	>,9999





Lot A

p > 0,9999: Les distributions ne sont pas significativement différentes. La distribution peut être considérée comme normale.

Lot B

p = 0,4038 : Les distributions ne sont pas significativement différentes. La distribution peut être considérée comme normale.

Lot C

p = 0,8131 : Les distributions ne sont pas significativement différentes. La distribution peut être considérée comme normale.

Lot D

p > 0,9999 : Les distributions ne sont pas significativement différentes. La distribution peut être considérée comme normale.

Test d'homogénéité des variances pour 3 groupes ou plus : Test de Bartlett

p = 0,0240 < 0,05 donc les variances ne peuvent pas être considérées comme homogènes.

On ne peut donc pas utiliser le test ANOVA. On va donc utiliser le test de Kruskall-Wallis, équivalent non paramétrique du test ANOVA, permettant la comparaison de plus de deux moyennes.

Test non paramétrique de Kruskall-Wallis pour la comparaison des moyennes de 3 groupes ou plus

Kruskal-Wallis pourG25 filtrates volumes
Variables groupe : G25 filtrates volumes

DDL	3
# Groupes	4
# ex-aequo	8
H	2,138
Valeur de p	,5442
H corrigé pour ex-aequo	2,240
p corrigé pour ex-aequo	,5242

Info. de Kruskal-Wallis pourG25 filtrates volumes
Variables groupe : G25 filtrates volumes

	Nombre	Somme des rangs	Moy. des rangs
lot A	10	158,500	15,850
lot B	10	215,500	21,550
lot C	10	224,000	22,400
lot D	10	222,000	22,200

p = 0,5242 > 0,05 donc il n'y a pas de différence significative entre les moyennes

2 Optimisation des colonnes de Séphadex™ G–10

2.1 Homogénéité des volumes de gels obtenus après la première centrifugation

Volumes de gels obtenus

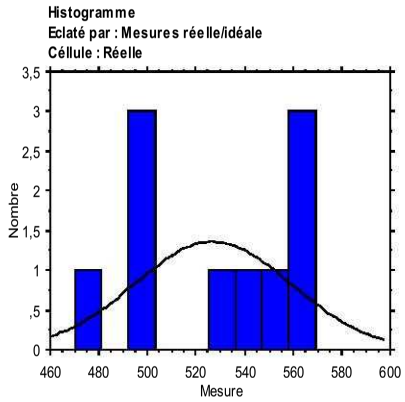
Volume de gels obtenus après la 1ère centrifugation			
Lot A	**Lot B**	**Lot C**	**Lot D**
550	530	550	470
470	520	450	550
500	540	550	520
500	520	550	480
530	520	450	480
560	490	520	500
500	500	500	490
560	540	550	530
560	450	520	530
540	480	500	550

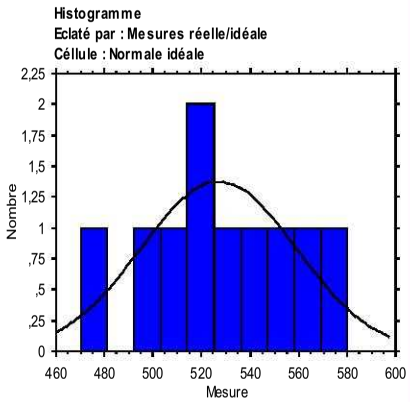
Evaluation de la normalité des distributions pour chaque lot : Test de Komolgorov-Smirnov

Lot A

Kolmogorov-Smirnov pourMesure
Variables groupe : Mesures réelle/idéale

DDL	2
Nombre,Réelle	10
Nombre,Normale idéale	10
Différence maximum	,200
Chi 2	,800
Valeur de p	>,9999

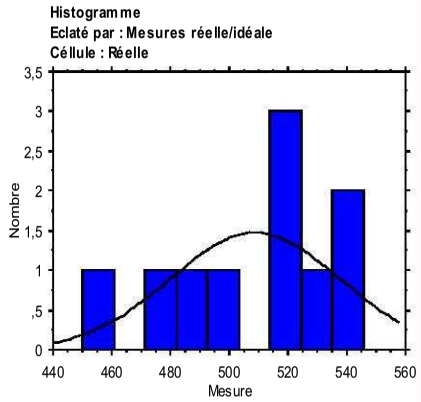


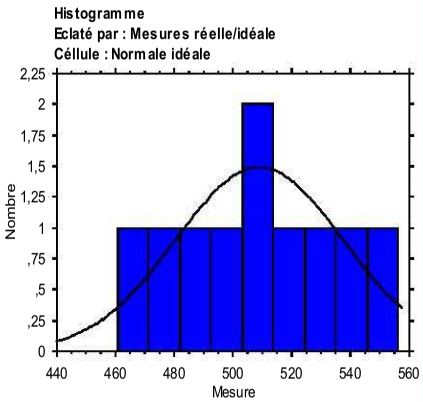


Lot B

Kolmogorov-Smirnov pourMesure
Variables groupe : Mesures réelle/idéale

DDL	2
Nombre,Réelle	10
Nombre,Normale idéale	10
Différence maximum	,200
Chi 2	,800
Valeur de p	>,9999

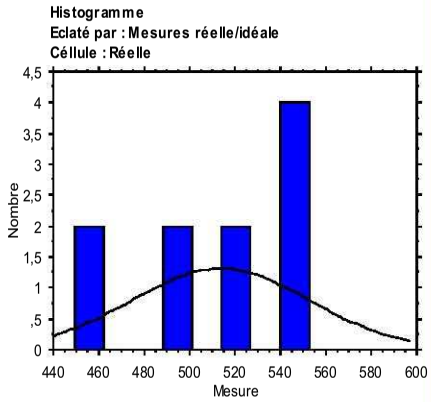


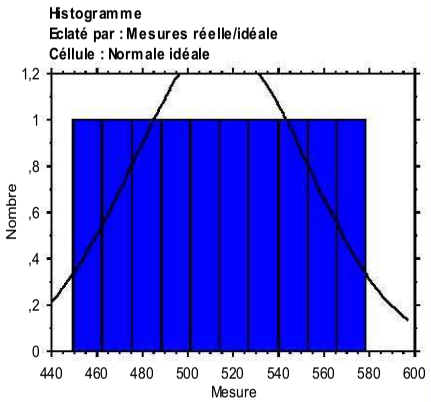


Lot C

Kolmogorov-Smirnov pourMesure
Variables groupe : Mesures réelle/idéale

DDL	2
Nombre,Réelle	10
Nombre,Normale idéale	10
Différence maximum	,200
Chi 2	,800
Valeur de p	>,9999

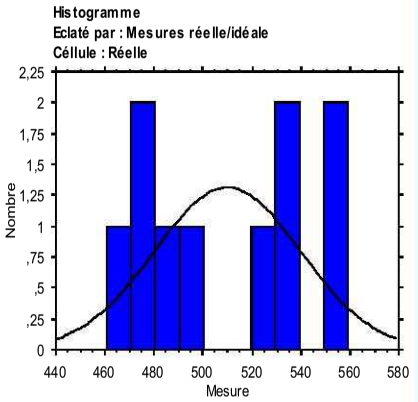


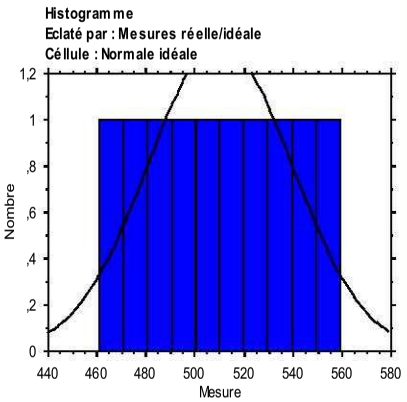


Lot D

Kolmogorov-Smirnov pourMesure
Variables groupe : Mesures réelle/idéale

DDL	2
Nombre,Réelle	10
Nombre,Normale idéale	10
Différence maximum	,100
Chi 2	,200
Valeur de p	>,9999





Lot A

p > 0,9999 : Les distributions ne sont pas significativement différentes. La distribution peut être considérée comme normale.

Lot B

p > 0,9999 : Les distributions ne sont pas significativement différentes. La distribution peut être considérée comme normale.

Lot C

p > 0,9999 : Les distributions ne sont pas significativement différentes. La distribution peut-être considérée comme normale.

Lot D

p > 0,9999 : Les distributions ne sont pas significativement différentes. La distribution peut-être considérée comme normale.

Test d'homogénéité des variances pour 3 groupes ou plus : Test de Bartlett

p = 0,8110 > 0,05 donc les variances peuvent être considérées comme homogènes.

Test ANOVA pour la comparaison des moyennes de 3 groupes ou plus

Tableau ANOVA pour vol gel G10

	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p	Lambda	Puissance
vol gel G10	3	2060,000	686,667	,638	,5954	1,914	,167
Résidu	36	38740,000	1076,111				

Tableau de moyennes pour vol gel G10
Effet : vol gel G10

	Nombre	Moyenne	Dév. Std.	Err. Std.
lot A	10	527,000	32,335	10,225
lot B	10	509,000	28,848	9,123
lot C	10	514,000	39,215	12,401
lot D	10	510,000	29,814	9,428

p = 0,5954 > 0,05 donc il n'existe pas de différence significative entre les moyennes.

2.2 Homogénéité des volumes de filtrats obtenus après la deuxième centrifugation

Volumes des filtrats obtenus

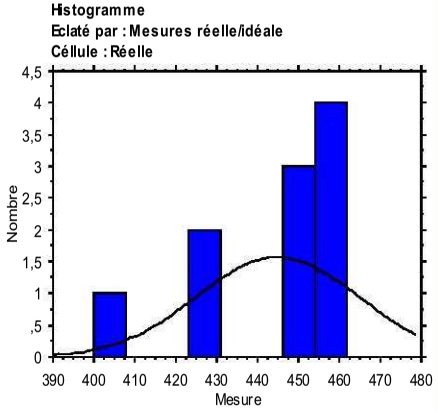
Volume de filtrats obtenus après la 2ème centrifugation			
Lot A	**Lot B**	**Lot C**	**Lot D**
450	520	410	520
430	460	470	470
460	480	460	460
450	470	460	460
430	490	460	450
400	490	460	470
460	450	630	520
460	470	460	460
450	420	460	460
460	460	460	460

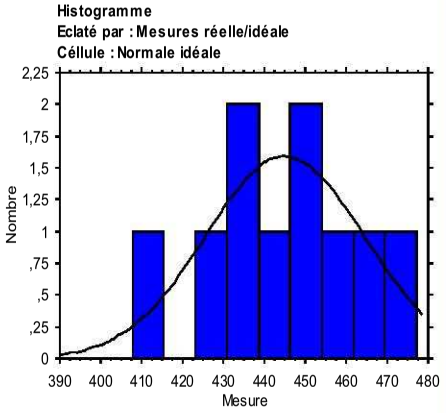
Evaluation de la normalité des distributions pour chaque lot : Test de Komolgorov-Smirnov

Lot A

Kolmogorov-Smirnov pourMesure
Variables groupe : Mesures réelle/idéale

DDL	2
Nombre,Réelle	10
Nombre,Normale idéale	10
Différence maximum	,300
Chi 2	1,800
Valeur de p	,8131

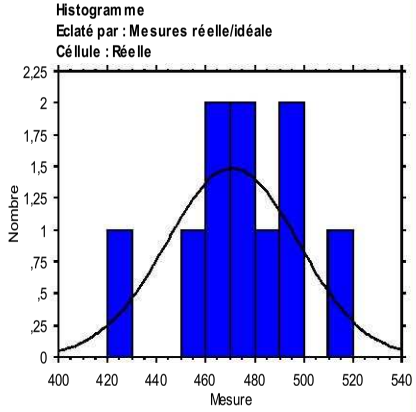


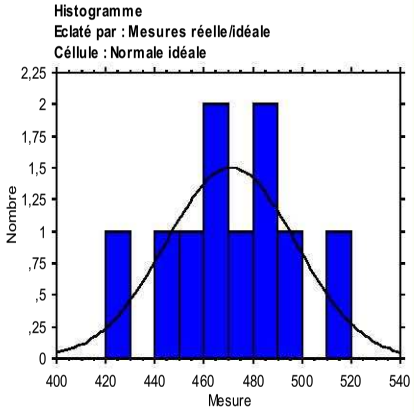


Lot B

Kolmogorov-Smirnov pourMesure
Variables groupe : Mesures réelle/idéale

DDL	2
Nombre,Réelle	10
Nombre,Normale idéale	10
Différence maximum	,100
Chi 2	,200
Valeur de p	>,9999

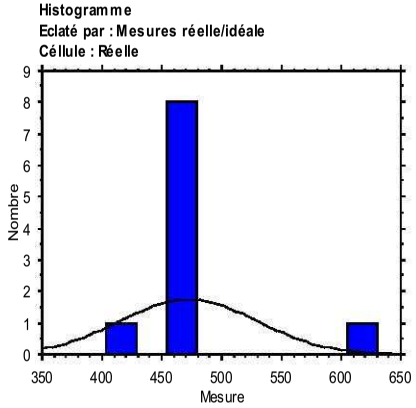


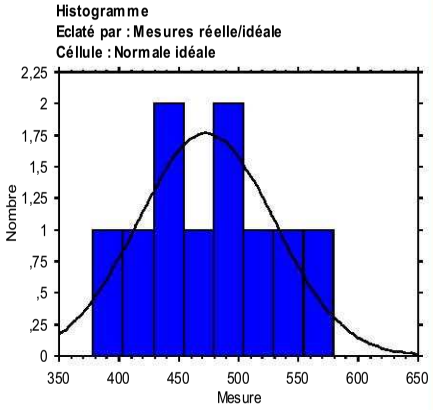


Lot C

Kolmogorov-Smirnov pourMesure
Variables groupe : Mesures réelle/idéale

DDL	2
Nombre,Réelle	10
Nombre,Normale idéale	10
Différence maximum	,400
Chi 2	3,200
Valeur de p	,4038

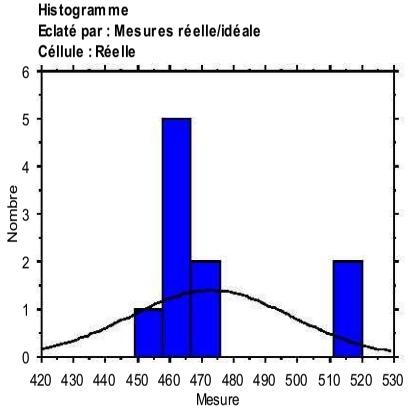


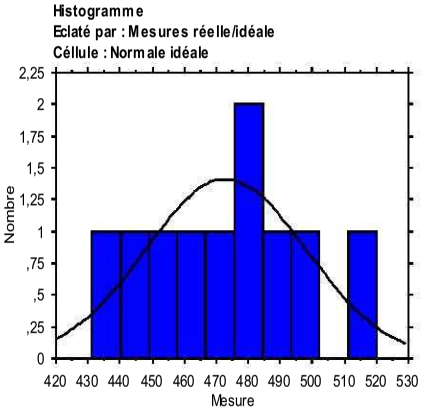


Lot D

Kolmogorov-Smirnov pourMesure
Variables groupe : Mesures réelle/idéale

DDL	2
Nombre,Réelle	10
Nombre,Normale idéale	10
Différence maximum	,300
Chi 2	1,800
Valeur de p	,8131





Lot A

p = 0,8131 > 0,05 : Les distributions ne sont pas significativement différentes. La distribution peut être considérée comme normale.

Lot B

p > 0,9999 : Les distributions ne sont pas significativement différentes. La distribution peut être considérée comme normale.

Lot C

p = 0,4038 : Les distributions ne sont pas significativement différentes. La distribution peut être considérée comme normale.

Lot D

p = 0,8131 : Les distributions ne sont pas significativement différentes. La distribution peut être considérée comme normale.

Test d'homogénéité des variances pour 3 groupes ou plus : Test de Bartlett

p = 0,0055 < 0,05 donc les variances ne peuvent pas être considérées comme homogènes.

On ne peut pas utiliser le test ANOVA. Il faut utiliser un test non-paramétrique, le test de Kruskall-Wallis.

Test de Kruskall-Willis pour la comparaison des moyennes de 3 groupes ou plus

Kruskal-Wallis pourvol filtrat G10
Variables groupe : vol filtrat G10

DDL	3
# Groupes	4
# ex-aequo	6
H	9,257
Valeur de p	,0261
H corrigé pour ex-aequo	10,231
p corrigé pour ex-aequo	,0167

Info. de Kruskal-Wallis pourvol filtrat G10
Variables groupe : vol filtrat G10

	Nombre	Somme des rangs	Moy. des rangs
lot A	10	112,000	11,200
lot B	10	255,000	25,500
lot C	10	209,500	20,950
lot D	10	243,500	24,350

p = 0,0167 < 0,05 donc il existe une différence significative et les moyennes ne peuvent pas être considérées comme homogènes.

3 Analyse des paramètres spectrophotométriques spécifiques du BT

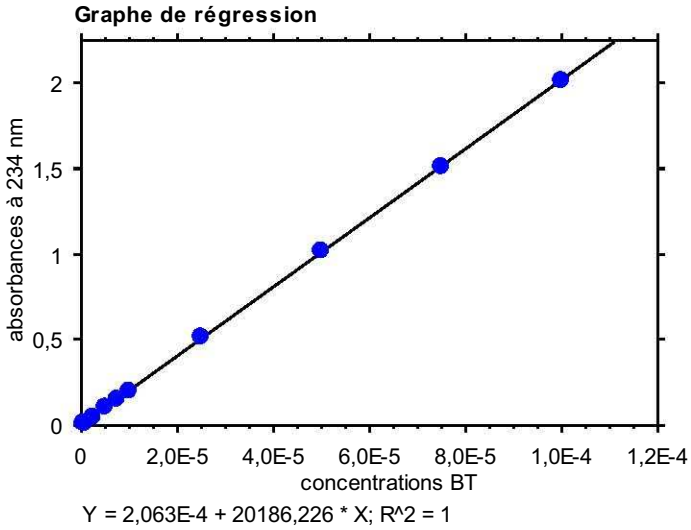
3.1 Détermination des longueurs d'onde des maxima d'absorption du BT

Tableau I : Maxima d'absorption du BT en fonction des longueurs d'onde

C (mol.L^{-1})	10^{-7}	$2{,}5.10^{-7}$	5.10^{-7}	$7{,}5.10^{-7}$	10^{-6}	$2{,}5.10^{-6}$	5.10^{-6}	$7{,}5.10^{-6}$	10^{-5}	$2{,}5.10^{-5}$	5.10^{-5}	$7{,}5.10^{-5}$	10^{-4}	$4{,}1.10^{-4}$
192	0,1034	0,105	0,116	0,11	0,129	0,17	0,23	0,28	0,32	0,57	0,81	0,92	0,94	1,01
194	0,1028	0,106	0,121	0,118	0,130	0,179	0,247	0,2999	0,35	0,65	0,98	1,14	1,19	1,27
196	0,092	0,10	0,11	0,11	0,12	0,17	0,24	0,3005	0,36	0,71	1,12	1,35	1,44	1,54
198	0,074	0,08	0,10	0,09	0,10	0,15	0,23	0,29	0,35	0,731	1,22	1,52	1,66	1,79
200	0,052	0,06	0,07	0,07	0,08	0,13	0,21	0,26	0,33	0,727	1,28	1,65	1,85	2,02
202	0,033	0,04	0,05	0,05	0,06	0,11	0,18	0,24	0,30	0,71	1,305	1,74	2,00	2,23
204	0,018	0,02	0,04	0,04	0,04	0,09	0,16	0,22	0,29	0,69	1,301	1,79	2,12	2,43
206	0,009	0,01	0,03	0,03	0,03	0,08	0,15	0,21	0,27	0,67	1,28	1,808	2,19	2,61
208	0,002	0,01	0,02	0,02	0,03	0,07	0,14	0,19	0,26	0,64	1,25	1,79	2,227	2,79
210	-0,001	0,00	0,02	0,015	0,02	0,06	0,13	0,18	0,24	0,62	1,21	1,76	2,229	3,14
…														
234	-0,002	0,00	0,01	0,011	0,0166	0,04924	0,1039	0,150	0,202	0,515	1,019	1,507	2,017	8,00
236	-0,002	0,00	0,01	0,011	0,0167	0,04923	0,1036	0,149	0,201	0,512	1,01	1,49	2,00	8,00
…														
316	-0,002	0,00	0,00	0,00	0,00800	0,02513	0,0548	0,0808	0,1101	0,28286	0,561	0,829	1,101	2,57
318	-0,002	0,00	0,00	0,00	0,00797	0,0250	0,0546	0,0806	0,1099	0,28291	0,562	0,831	1,104	2,56
…														
584	0,0010	0,005	0,0141	0,0209	0,0297	0,075	0,150	0,218	0,295	0,741	1,432	1,9893	2,2966	2,457
586	0,0010	0,005	0,0142	0,0210	0,0299	0,076	0,151	0,219	0,296	0,7418	1,431	1,9890	2,2971	2,4577
588	0,0011	0,005	0,014297	0,02108	0,02999	0,076	0,151	0,219	0,2969	0,7415	1,429	1,986	2,296	2,4580
590	0,0011	0,005	0,014301	0,02109	0,03003	0,076	0,151	0,2197	0,2970	0,740	1,42	1,98	2,29	2,457
592	0,0011	0,0055	0,0142	0,0210	0,03001	0,076	0,15160	0,2198	0,2969	0,738	1,42	1,97	2,29	2,456
594	0,0011	0,0055	0,0141	0,0209	0,0299	0,07652	0,15156	0,2195	0,296	0,734	1,41	1,96	2,28	2,45
596	0,0011	0,00555	0,0140	0,0208	0,0298	0,07654	0,151	0,219	0,295	0,730	1,40	1,95	2,27	2,45

3.2 Détermination des coefficients d'absorption molaire du BT par analyse de régression

3.2.1 Détermination du coefficient d'absorption molaire du BT à 234 nm



Résumé régression
absorbances à 234 nm vs concentrations BT

Nombre	11
Manquants	0
|R|	1,000
R carré	1,000
R carré ajusté	1,000
Ec. type résiduel	,006

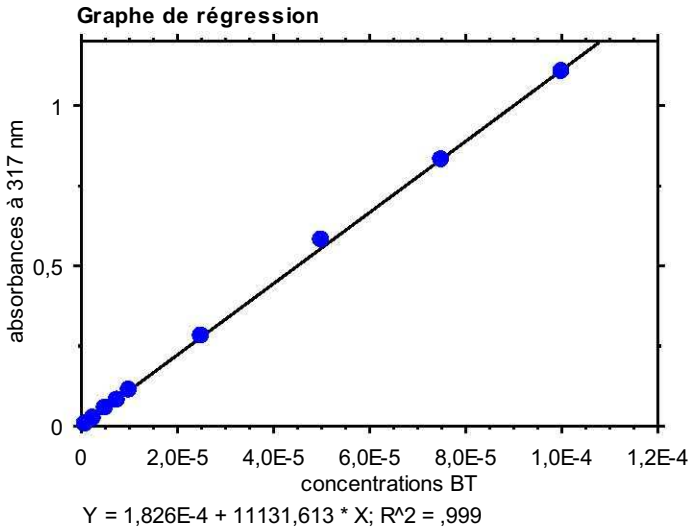
Tableau d'ANOVA
absorbances à 234 nm vs concentrations BT

	DDL	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p
Régression	1	4,870	4,870	153376,344	<,0001
Résidu	9	2,858E-4	3,175E-5		
Total	10	4,870			

Coeff. de régression
absorbances à 234 nm vs concentrations BT

	Coefficient	Erreur standardisée	Coeff. standardisé	Valeur de t	Valeur de p
Terme cst.	2,063E-4	,002	2,063E-4	,096	,9253
concentrations BT	20186,226	51,544	1,000	391,633	<,0001

3.2.2 Détermination du coefficient d'absorption molaire du BT à 317 nm



Résumé régression
absorbances à 317 nm vs concentrations BT

Nombre	10
Manquants	1
|R|	1,000
R carré	,999
R carré ajusté	,999
Ec. type résiduel	,010

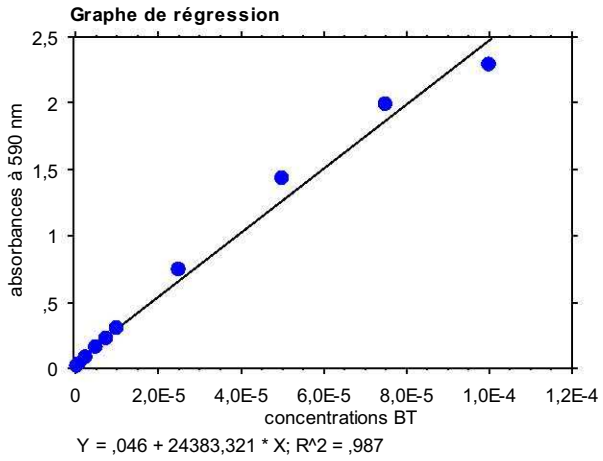
Tableau d'ANOVA
absorbances à 317 nm vs concentrations BT

	DDL	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p
Régression	1	1,398	1,398	13875,480	<,0001
Résidu	8	,001	1,007E-4		
Total	9	1,399			

Coeff. de régression
absorbances à 317 nm vs concentrations BT

	Coefficient	Erreur standardisée	Coeff. standardisé	Valeur de t	Valeur de p
Terme cst.	1,826E-4	,004	1,826E-4	,044	,9657
concentrations BT	11131,613	94,500	1,000	117,794	<,0001

3.2.3 Détermination du coefficient d'absorption molaire du BT à 590 nm



Résumé régression
absorbances à 590 nm vs concentrations BT

Nombre	11
Manquants	1
|R|	,994
R carré	,987
R carré ajusté	,986
Ec. type résiduel	,100

Tableau d'ANOVA
absorbances à 590 nm vs concentrations BT

	DDL	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p
Régression	1	7,106	7,106	710,088	<,0001
Résidu	9	,090	,010		
Total	10	7,196			

Coeff. de régression
absorbances à 590 nm vs concentrations BT

	Coefficient	Erreur standardisée	Coeff. standardisé	Valeur de t	Valeur de p
Terme cst.	,046	,038	,046	1,221	,2532
concentrations BT	24383,321	915,033	,994	26,647	<,0001

4 Analyse des paramètres spectrophotométriques spécifiques du RN

4.1 Détermination des longueurs d'onde des maxima d'absorption du RN

Tableau II : Maxima d'absorption du RN en fonction des longueurs d'onde

C (mol.L^{-1})	5.10^{-7}	$7,5.10^{-7}$	10^{-6}	$2,5.10^{-6}$	5.10^{-6}	$7,5.10^{-6}$	10^{-5}	$2,5.10^{-5}$	5.10^{-5}	$7,5.10^{-5}$	10^{-4}	$2,5.10^{-4}$	5.10^{-4}
191	0,0404	0,022	0,003	0,0229	0,03	0,05	0,07	0,15	0,26	0,28	0,36	0,63	0,96
192	0,0399	0,021	0,004	0,0231	0,04	0,06	0,08	0,17	0,29	0,30	0,39	0,67	1,02
193	0,037	0,019	0,003	0,021	0,04	0,06	0,08	0,19	0,32	0,31	0,42	0,71	1,08
194	0,03	0,017	0,003	0,019	0,046	0,06	0,08	0,20	0,35	0,33	0,44	0,73	1,14
195	0,03	0,01	0,003	0,018	0,048	0,06	0,09	0,21	0,37	0,34	0,46	0,76	1,19
196	0,03	0,01	0,003	0,018	0,0487	0,06	0,0892	0,217	0,38	0,35	0,47	0,77	1,22
197	0,02	0,01	0,003	0,017	0,0488	0,0651	0,0902	0,221	0,388	0,35	0,47	0,78	1,25
198	0,02	0,01	0,003	0,017	0,0486	0,0652	0,0904	0,2220	0,391	0,3571	0,475	0,79	1,27
199	0,01	0,01	0,003	0,017	0,048	0,0652	0,0900	0,2216	0,392	0,3583	0,477	0,80	1,28
200	0,01	0,01	0,004	0,018	0,048	0,06	0,0892	0,220	0,390	0,3579	0,476	0,806	1,288
201	0,01	0,01	0,004	0,018	0,047	0,06	0,0879	0,216	0,386	0,3562	0,475	0,8074	1,294
274	0,02265	0,0262	0,033	0,083	0,179	0,266	0,349	0,83	1,295	0,926	1,076	1,39	1,845
275	0,02269	0,0264	0,033	0,084	0,181	0,269	0,353	0,83	1,3049	0,932	1,083	1,395	1,849
276	0,0226	0,0265	0,034	0,085	0,182	0,270	0,354	0,84	1,3046	0,933	1,084	1,396	1,847
277	0,022	0,0263	0,033	0,084	0,181	0,268	0,352	0,83	1,29	0,927	1,078	1,39	1,84
448	0,0047	0,00768	0,01047	0,0265	0,0567	0,08	0,1106	0,260	0,42	0,38	0,49	0,80	1,19
449	0,0048	0,00769	0,01046	0,0266	0,0568	0,08	0,1108	0,2606	0,42	0,38	0,50	0,80	1,20
450	0,0048	0,00770	0,0104	0,0266	0,0569	0,08	0,1110	0,2609	0,425	0,38	0,50	0,80	1,20
451	0,00486	0,00769	0,0104	0,02669	0,0570	0,08	0,1111	0,2611	0,4256	0,38	0,50	0,80	1,21
452	0,00492	0,00768	0,0104	0,02674	0,05710	0,085044	0,1111	0,26122	0,4259	0,38	0,50	0,81	1,21
453	0,00494	0,0076	0,0104	0,02673	0,05712	0,085038	0,1112	0,26120	0,4260	0,385	0,50	0,81	1,21
454	0,00490	0,0076	0,0103	0,02670	0,05707	0,08	0,1111	0,2610	0,4258	0,3856	0,50	0,81	1,21
455	0,0048	0,0076	0,0103	0,0266	0,0569	0,08	0,1109	0,2606	0,425	0,3860	0,505	0,81	1,22
456	0,0047	0,0075	0,0102	0,026	0,0567	0,08	0,1107	0,260	0,42	0,38617	0,506	0,82	1,22
457	0,0046	0,007	0,0102	0,026	0,056	0,08	0,110	0,259	0,42	0,38621	0,506	0,82	1,22
458	0,0045	0,007	0,0101	0,026	0,056	0,08	0,110	0,258	0,42	0,3861	0,507	0,82	1,22
459	0,004	0,007	0,0101	0,026	0,056	0,08	0,110	0,258	0,42	0,3859	0,507	0,82	1,23

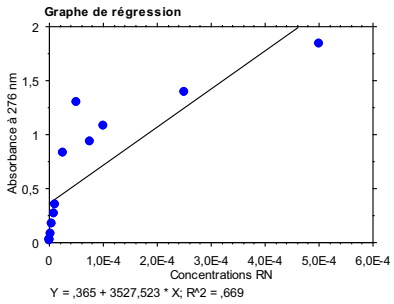
Tableau II : Maxima d'absorption du RN en fonction des longueurs d'onde

460	0,004	0,007	0,0100	0,026	0,056	0,08	0,109	0,256	0,42	0,3856	0,5078	0,82	1,23
461	0,004	0,007	0,0100	0,03	0,056	0,08	0,109	0,255	0,42	0,385	0,50798	0,82	1,23
462	0,004	0,007	0,0099	0,03	0,055	0,08	0,108	0,25	0,42	0,38	0,50803	0,82	1,23
463	0,004	0,007	0,0099	0,03	0,05	0,08	0,107	0,25	0,41	0,38	0,5078	0,82	1,23
464	0,004	0,007	0,0099	0,03	0,05	0,08	0,107	0,25	0,41	0,38	0,5075	0,82	1,23
465	0,004	0,007	0,0098	0,03	0,05	0,08	0,106	0,25	0,41	0,38	0,507	0,82	1,23
466	0,004	0,01	0,01	0,03	0,05	0,08	0,105	0,25	0,41	0,38	0,506	0,8250	1,236
467	0,00	0,01	0,01	0,02	0,05	0,08	0,10	0,25	0,40	0,38	0,506	0,8252	1,237
468	0,00	0,01	0,01	0,02	0,05	0,08	0,10	0,24	0,40	0,38	0,50	0,8253	1,238
469	0,00	0,01	0,01	0,02	0,05	0,08	0,10	0,24	0,40	0,38	0,50	0,8251	1,238
470	0,00	0,01	0,01	0,02	0,05	0,08	0,10	0,24	0,39	0,37	0,50	0,82	1,2387
471	0,00	0,01	0,01	0,02	0,05	0,08	0,10	0,24	0,39	0,37	0,50	0,82	1,2389
472	0,00	0,01	0,01	0,02	0,05	0,08	0,10	0,23	0,39	0,37	0,50	0,82	1,2390

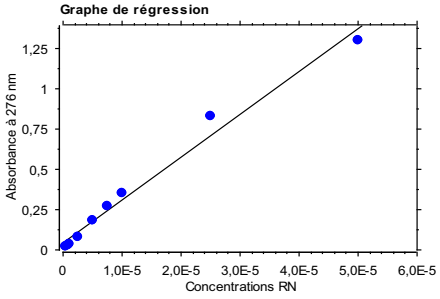
4.2 Détermination des coefficients d'absorption molaire du RN par analyse de régression

4.2.1 Détermination du coefficient d'absorption molaire du RN à 276 nm

- Graph de régression à 276 nm avec toutes les valeurs d'absorbance pour les concentrations de 5.10^{-7} M à 5.10^{-4} mol.L^{-1}



- Graph de régression à 276 nm avec les valeurs d'absorbance pour les concentrations de 5.10^{-7} M à 5.10^{-5} mol.L^{-1} pour lesquelles la relation est linéaire.



Y = ,042 + 26713,842 * X; R^2 = ,982

Résumé régression
Absorbance à 276 nm vs Concentrations RN

Nombre	9
Manquants	0
|R|	,991
R carré	,982
R carré ajusté	,980
Ec. type résiduel	,063

Tableau d'ANOVA
Absorbance à 276 nm vs Concentrations RN

	DDL	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p
Régression	1	1,536	1,536	384,011	<,0001
Résidu	7	,028	,004		
Total	8	1,564			

Coeff. de régression
Absorbance à 276 nm vs Concentrations RN

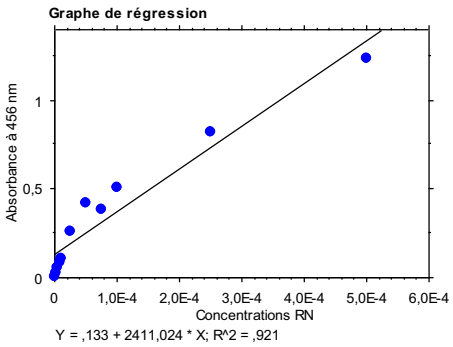
	Coefficient	Erreur standardisée	Coeff. standardisé	Valeur de t	Valeur de p
Terme cst.	,042	,026	,042	1,623	,1487
Concentrations RN	26713,842	1363,216	,991	19,596	<,0001

Intervalles de confiance
Absorbance à 276 nm vs Concentrations RN

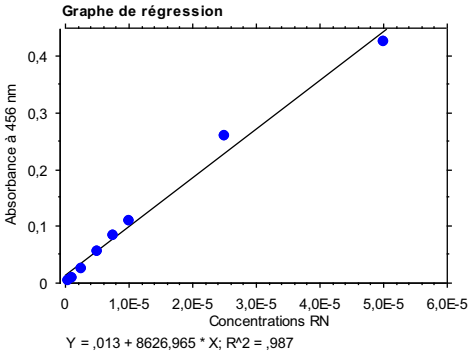
	Coefficient	95% Inf.	95% Sup.
Terme cst.	,042	-,019	,104
Concentrations RN	26713,842	23490,348	29937,336

4.2.2 Détermination du coefficient d'absorption molaire du RN à 456 nm

- Graph de régression à 456 nm avec toutes les valeurs d'absorbance pour les concentrations de 5.10^{-7} mol.L^{-1} à 5.10^{-4} mol.L^{-1}



- Graph de régression à 456 nm avec les valeurs d'absorbance pour les concentrations de 10^{-6} M à 5.10^{-4} mol.L^{-1} pour lesquelles la relation est linéaire



Résumé régression
Absorbance à 456 nm vs Concentrations RN

Nombre	8
Manquants	0
|R|	,994
R carré	,987
R carré ajusté	,985
Ec. type résiduel	,018

Tableau d'ANOVA
Absorbance à 456 nm vs Concentrations RN

	DDL	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p
Régression	1	,151	,151	468,796	<,0001
Résidu	6	,002	3,216E-4		
Total	7	,153			

Coeff. de régression
Absorbance à 456 nm vs Concentrations RN

	Coefficient	Erreur standardisée	Coeff. standardisé	Valeur de t	Valeur de p
Terme cst.	,013	,008	,013	1,649	,1503
Concentrations RN	8626,965	398,443	,994	21,652	<,0001

Intervalles de confiance
Absorbance à 456 nm vs Concentrations RN

	Coefficient	95% Inf.	95% Sup.
Terme cst.	,013	-,006	,033
Concentrations RN	8626,965	7652,011	9601,920

Annexe 3 : Résultats obtenus en spectrophotométrie UV-visible

Dans les tableaux suivants, les abréviations suivantes seront rencontrées : la concentration C est donnée en $mol.L^{-1}$, A correspond à l'absorbance et est sans unité, les longueurs d'onde λ en nm et les coefficients d'absorption molaires ε en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ (sauf mention complémentaire). Les ε correspondant à des absorbances ne répondant pas à la Loi de Beer-Lambert n'ont pas été calculées (NC : non calculé).

1 Détermination des paramètres spectrophotométriques de la CHX

Dans les tableaux suivants, sont consignées les valeurs d'absorbance de la CHX obtenues aux environs des pics d'absorption maximum :

- Tableau I) pour des concentrations de 10^{-4} $mol.L^{-1}$ à 10^{-10} $mol.L^{-1}$
- Tableau II) pour des concentrations de 5.10^{-5} $mol.L^{-1}$ à 6.10^{-6} $mol.L^{-1}$

et estimation des coefficients d'absorption molaire grâce à l'Équation 3 (Loi de Beer-Lambert) : $A = \varepsilon.l.c$

Les cases en surbrillance représentent les valeurs d'absorbance maximales observées.

Tableau I : Détermination des paramètres spectrophotométriques de la CHX de 10^{-4} mol.L^{-1} à 10^{-10} mol.L^{-1}

C	10^{-4}		10^{-5}		10^{-6}		10^{-7}		10^{-8}		10^{-9}		10^{-10}	
λ	A	ε	A	ε	A	ε	A	E	A	E	A	ε	A	ε
230	2,922	NC	0,242	$2,4.10^4$	0,007	NC	0,010	NC	0,0030	NC	0,002	NC	0,009	NC
231	2,945	NC	0,244	$2,4.10^4$	0,007	NC	0,010	NC	0,003	NC	0,002	NC	0,009	NC
232	2,958	NC	0,246	$2,5.10^4$	0,008	NC	0,009	NC	0,003	NC	0,002	NC	0,009	NC
233	2,942	NC	0,246	$2,5.10^4$	0,008	NC	0,0090	NC	0,002	NC	0,002	NC	0,008	NC
234	2,928	NC	0,246	$2,5.10^4$	0,009	NC	0,009	NC	0,002	NC	0,002	NC	0,008	NC
235	2,900	NC	0,245	$2,4.10^4$	0,009	NC	0,009	NC	0,002	NC	0,002	NC	0,008	NC
…														
250	2,844	NC	0,247	$2,5.10^4$	0,009	NC	0,0054	NC	-0,001	NC	0,000	NC	0,010	NC
251	2,867	NC	0,248	$2,5.10^4$	0,009	NC	0,0053	NC	-0,001	NC	0,000	NC	0,010	NC
252	2,883	NC	0,249	$2,5.10^4$	0,009	NC	0,0051	NC	-0,001	NC	0,000	NC	0,010	NC
253	2,8961	NC	0,2496	$2,5.10^4$	0,0088	NC	0,0049	NC	-0,0010	NC	-0,001	NC	0,010	NC
254	2,8983	NC	0,2496	$2,5.10^4$	0,0088	NC	0,0048	NC	-0,0011	NC	-0,0006	NC	0,0105	NC
255	2,8919	NC	0,2491	$2,5.10^4$	0,0087	NC	0,0046	NC	-0,0012	NC	-0,0006	NC	0,0107	NC

Tableau II : Détermination des paramètres spectrophotométriques de la CHX de 5.10^{-5} mol.L^{-1} à 5.10^{-6} mol.L^{-1}

c	5.10^{-6}		6.10^{-6}		7.10^{-6}		8.10^{-6}		9.10^{-6}		10^{-5}		2.10^{-5}		3.10^{-5}		4.10^{-5}		5.10^{-5}	
λ	A	ε	A	ε	A	ε	A	ε	A	ε	A	E	A	E	A	ε	A	ε	A	E
230	0,1026	$2,05.10^4$	0,1471	$2,45.10^4$	0,1816	$2,59.10^4$	0,1983	$2,48.10^4$	0,2198	$2,44.10^4$	0,2635	$2,63.10^4$	0,5548	$2,77.10^4$	0,8526	$2,84.10^4$	1,1255	$2,81.10^4$	1,3787	$2,76.10^4$
231	0,1040	$2,08.10^4$	0,1483	$2,47.10^4$	0,1829	$2,61.10^4$	0,1997	$2,50.10^4$	0,2207	$2,45.10^4$	0,2648	$2,65.10^4$	0,5570	$2,79.10^4$	0,8557	$2,85.10^4$	1,1288	$2,82.10^4$	1,3834	$2,77.10^4$
232	0,1051	$2,10.10^4$	0,1490	$2,48.10^4$	0,1835	$2,62.10^4$	0,2003	$2,50.10^4$	0,2208	$2,45.10^4$	0,2652	$2,65.10^4$	0,5571	$2,79.10^4$	0,8553	$2,85.10^4$	1,1277	$2,82.10^4$	1,3826	$2,77.10^4$
233	0,1058	$2,12.10^4$	0,1491	$2,49.10^4$	0,1836	$2,62.10^4$	0,2002	$2,50.10^4$	0,2202	$2,45.10^4$	0,2647	$2,65.10^4$	0,5551	$2,78.10^4$	0,8519	$2,84.10^4$	1,1224	$2,81.10^4$	1,3769	$2,75.10^4$
234	0,1062	$2,12.10^4$	0,1488	$2,48.10^4$	0,1831	$2,62.10^4$	0,1995	$2,49.10^4$	0,2189	$2,43.10^4$	0,2633	$2,63.10^4$	0,5515	$2,76.10^4$	0,8461	$2,82.10^4$	1,1140	$2,78.10^4$	1,3669	$2,73.10^4$
235	0,1062	$2,12.10^4$	0,1481	$2,47.10^4$	0,1821	$2,60.10^4$	0,1984	$2,48.10^4$	0,2171	$2,41.10^4$	0,2613	$2,61.10^4$	0,5468	$2,73.10^4$	0,8387	$2,80.10^4$	1,1034	$2,76.10^4$	1,3542	$2,71.10^4$
...																				
250	0,1049	$2,10.10^4$	0,1443	$2,40.10^4$	0,1787	$2,55.10^4$	0,1963	$2,45.10^4$	0,2132	$2,37.10^4$	0,2566	$2,57.10^4$	0,5369	$2,68.10^4$	0,8270	$2,76.10^4$	1,0865	$2,72.10^4$	1,3371	$2,67.10^4$
251	0,1055	$2,11.10^4$	0,1451	$2,42.10^4$	0,1797	$2,57.10^4$	0,1975	$2,47.10^4$	0,2145	$2,38.10^4$	0,2581	$2,58.10^4$	0,5395	$2,70.10^4$	0,8309	$2,77.10^4$	1,0915	$2,73.10^4$	1,3432	$2,69.10^4$
252	0,1060	$2,12.10^4$	0,1458	$2,43.10^4$	0,1806	$2,58.10^4$	0,1986	$2,48.10^4$	0,2157	$2,40.10^4$	0,2594	$2,59.10^4$	0,5417	$2,71.10^4$	0,8340	$2,78.10^4$	1,0952	$2,74.10^4$	1,3477	$2,70.10^4$
253	0,1065	$2,13.10^4$	0,1464	$2,44.10^4$	0,1813	$2,59.10^4$	0,1995	$2,49.10^4$	0,2166	$2,41.10^4$	0,2605	$2,60.10^4$	0,5431	$2,72.10^4$	0,8358	$2,79.10^4$	1,0975	$2,74.10^4$	1,3503	$2,70.10^4$
254	0,1068	$2,14.10^4$	0,1468	$2,45.10^4$	0,1818	$2,60.10^4$	0,2001	$2,50.10^4$	0,2171	$2,41.10^4$	0,2612	$2,61.10^4$	0,5437	$2,72.10^4$	0,8363	$2,79.10^4$	1,0979	$2,74.10^4$	1,3504	$2,70.10^4$
255	0,1070	$2,14.10^4$	0,1471	$2,45.10^4$	0,1819	$2,60.10^4$	0,2004	$2,50.10^4$	0,2173	$2,41.10^4$	0,2615	$2,61.10^4$	0,5433	$2,72.10^4$	0,8351	$2,78.10^4$	1,0961	$2,74.10^4$	1,3479	$2,70.10^4$
256	0,1070	$2,14.10^4$	0,1471	$2,45.10^4$	0,1818	$2,60.10^4$	0,2003	$2,50.10^4$	0,2171	$2,41.10^4$	0,2613	$2,61.10^4$	0,5418	$2,71.10^4$	0,8320	$2,77.10^4$	1,0921	$2,73.10^4$	1,3424	$2,68.10^4$

2 Détermination des paramètres spectrophotométriques de l'HXM

Comme pour la CHX, les tableaux suivants donnent les valeurs d'absorbance de l'HXM obtenues aux environs des pics maximum d'absorption :

- Tableau III) pour des concentrations de 10^{-3} mol.L^{-1} à 10^{-10} mol.L^{-1}
- Tableau IV) pour des concentrations de 5.10^{-5} mol.L^{-1} à 6.10^{-6} mol.L^{-1}

et estimation des coefficients d'absorption molaire grâce à l'Équation 3 : $A = \varepsilon.l.c$.

Les cases en surbrillance représentent les valeurs d'absorbance maximales observées.

Dans le tableau IV, les ε sont exprimés en : 10^4 L.mol^{-1}.cm^{-1}

Tableau III : Détermination des paramètres spectrophotométriques de l'HXM de 10^{-3} mol.L^{-1} à 10^{-10} mol.L^{-1}

C	10^{-3}		10^{-4}		10^{-5}		10^{-6}		10^{-7}		10^{-8}		10^{-9}		10^{-10}	
λ	A	ε	A	ε	A	ε	A	ε	A	ε	A	ε	A	ε	A	ε
189	0,861	NC	0,849	NC	0,241	$2,4.10^4$	0,026	$2,6.10^4$	-0,243	NC	0,011	NC	0,056	NC	0,008	NC
190	1,042	NC	1,025	NC	0,268	$2,7.10^4$	0,032	$3,2.10^4$	-0,146	NC	0,014	NC	0,054	NC	0,008	NC
191	1,213	NC	1,193	NC	0,287	$2,9.10^4$	0,035	$3,5.10^4$	-0,073	NC	0,015	NC	0,048	NC	0,006	NC
192	1,364	NC	1,339	NC	0,300	$3,0.10^4$	0,036	$3,6.10^4$	-0,025	NC	0,015	NC	0,039	NC	0,005	NC
193	1,499	NC	1,464	NC	0,310	$3,1.10^4$	0,037	$3,7.10^4$	0,001	NC	0,014	NC	0,031	NC	0,005	NC
194	1,620	NC	1,575	NC	0,317	$3,2.10^4$	0,037	$3,7.10^4$	0,013	NC	0,014	NC	0,024	NC	0,004	NC
195	1,728	NC	1,678	NC	0,324	$3,2.10^4$	0,036	$3,6.10^4$	0,016	NC	0,013	NC	0,019	NC	0,004	NC
196	1,822	NC	1,766	NC	0,330	$3,3.10^4$	0,035	$3,5.10^4$	0,016	NC	0,011	NC	0,015	NC	0,004	NC
197	1,909	NC	1,850	NC	0,334	$3,3.10^4$	0,033	$3,3.10^4$	0,014	NC	0,010	NC	0,012	NC	0,003	NC
198	1,983	NC	1,931	NC	0,337	$3,4.10^4$	0,032	$3,2.10^4$	0,013	NC	0,009	NC	0,009	NC	0,003	NC
199	2,047	NC	2,004	NC	0,338	$3,4.10^4$	0,031	$3,1.10^4$	0,011	NC	0,008	NC	0,008	NC	0,002	NC
200	2,109	NC	2,071	NC	0,338	$3,4.10^4$	0,030	$3,0.10^4$	0,010	NC	0,007	NC	0,006	NC	0,002	NC
201	2,170	NC	2,138	NC	0,335	$3,4.10^4$	0,029	$2,9.10^4$	0,009	NC	0,006	NC	0,006	NC	0,002	NC
202	2,225	NC	2,194	NC	0,331	$3,3.10^4$	0,029	$2,9.10^4$	0,008	NC	0,006	NC	0,005	NC	0,002	NC
203	2,284	NC	2,247	NC	0,325	$3,3.10^4$	0,028	$2,8.10^4$	0,007	NC	0,005	NC	0,005	NC	0,002	NC
204	2,348	NC	2,302	NC	0,318	$3,2.10^4$	0,027	$2,7.10^4$	0,007	NC	0,005	NC	0,004	NC	0,002	NC
205	2,416	NC	2,347	NC	0,311	$3,1.10^4$	0,027	$2,7.10^4$	0,007	NC	0,005	NC	0,004	NC	0,002	NC
206	2,484	NC	2,385	NC	0,304	$3,0.10^4$	0,026	$2,6.10^4$	0,007	NC	0,005	NC	0,004	NC	0,002	NC
207	2,560	NC	2,426	NC	0,297	$3,0.10^4$	0,025	$2,5.10^4$	0,007	NC	0,004	NC	0,004	NC	0,002	NC
208	2,631	NC	2,462	NC	0,291	$2,9.10^4$	0,024	$2,4.10^4$	0,007	NC	0,004	NC	0,003	NC	0,002	NC
209	2,702	NC	2,492	NC	0,285	$2,9.10^4$	0,024	$2,4.10^4$	0,006	NC	0,004	NC	0,003	NC	0,002	NC
210	2,772	NC	2,522	NC	0,280	$2,8.10^4$	0,023	$2,3.10^4$	0,006	NC	0,004	NC	0,003	NC	0,002	NC
211	2,843	NC	2,542	NC	0,274	$2,7.10^4$	0,023	$2,3.10^4$	0,006	NC	0,004	NC	0,003	NC	0,002	NC
...																
260	4,492	NC	2,395	NC	0,228	$2,3.10^4$	0,017	$1,7.10^4$	0,002	NC	0,001	NC	0,001	NC	0,001	NC
261	4,264	NC	2,402	NC	0,229	$2,3.10^4$	0,017	$1,7.10^4$	0,002	NC	0,001	NC	0,001	NC	0,001	NC
262	4,056	NC	2,400	NC	0,229	$2,3.10^4$	0,017	$1,7.10^4$	0,002	NC	0,001	NC	0,001	NC	0,001	NC

Tableau IV : Détermination des paramètres spectrophotométriques de l'HXM de 5.10^{-5} mol.L^{-1} à 5.10^{-6} mol.L^{-1}

C	5.10^{-5}		4.10^{-5}		3.10^{-5}		2.10^{-5}		10^{-5}		9.10^{-6}		8.10^{-6}		7.10^{-6}		6.10^{-6}		5.10^{-6}	
λ	A	ε	A	ε	A	E	A	ε	A	ε	A	ε	A	ε	A	ε	A	ε	A	ε
199	1,5895	3,2	1,3177	3,3	1,0388	3,5	0,6828	3,4	0,3323	3,3	0,2955	3,3	0,2577	3,2	0,2249	3,2	0,1823	3,0	0,1560	3,1
200	1,6110	3,2	1,3280	3,3	1,0431	3,5	0,6834	3,4	0,3313	3,3	0,2956	3,3	0,2582	3,2	0,2251	3,2	0,1828	3,0	0,1562	3,1
201	1,6219	3,2	1,3288	3,3	1,0403	3,5	0,6797	3,4	0,3284	3,3	0,2937	3,3	0,2571	3,2	0,2239	3,2	0,1821	3,0	0,1556	3,1
202	1,6224	3,2	1,3215	3,3	1,0306	3,4	0,6720	3,4	0,3237	3,2	0,2902	3,2	0,2543	3,2	0,2212	3,2	0,1800	3,0	0,1540	3,1
203	1,6127	3,2	1,3071	3,3	1,0158	3,4	0,6612	3,3	0,3177	3,2	0,2852	3,2	0,2502	3,1	0,2174	3,1	0,1770	3,0	0,1517	3,0
...																				
258	1,1934	2,4	0,9358	2,3	0,7158	2,4	0,4624	2,3	0,2187	2,2	0,2001	2,2	0,1776	2,2	0,1537	2,2	0,1280	2,1	0,1061	2,1
259	1,2057	2,4	0,9453	2,4	0,7231	2,4	0,4670	2,3	0,2209	2,2	0,2021	2,2	0,1794	2,2	0,1552	2,2	0,1293	2,2	0,1071	2,1
260	1,2136	2,4	0,9513	2,4	0,7278	2,4	0,4700	2,3	0,2223	2,2	0,2034	2,3	0,1806	2,3	0,1562	2,2	0,1301	2,2	0,1078	2,2
261	1,2172	2,4	0,9541	2,4	0,7300	2,4	0,4714	2,4	0,2231	2,2	0,2040	2,3	0,1812	2,3	0,1567	2,2	0,1305	2,2	0,1082	2,2
262	1,2171	2,4	0,9540	2,4	0,7300	2,4	0,4715	2,4	0,2231	2,2	0,2040	2,3	0,1812	2,3	0,1567	2,2	0,1305	2,2	0,1082	2,2

3 Détermination des paramètres spectrophotométriques du C[4]S

Les tableaux suivants donnent les valeurs d'absorbance du calix[4]arène sulfoné obtenues aux environs des pics maximum d'absorption :

- Tableau V) pour des concentrations de 10^{-2} mol.L^{-1} à 10^{-9} mol.L^{-1} pour le lot dialysé
- Tableau VI) pour des concentrations de $2{,}5.10^{-4}$ mol.L^{-1} à 10^{-6} mol.L^{-1} pour le lot dialysé
- Tableau VII) pour des concentrations de 10^{-5} mol.L^{-1} à 10^{-6} mol.L^{-1} pour le lot de non dialysé

et estimation des coefficients d'absorption molaire grâce à l'Équation 3 : $A = \varepsilon.l.c$.

Les cases en surbrillance représentent les valeurs d'absorbance maximales observées.

Tableau V : Détermination des paramètres spectrophotométriques du C[4]S de 10^{-9} mol.L^{-1} à 10^{-2} mol.L^{-1}

	10^{-9}		10^{-8}		10^{-7}		10^{-6}		10^{-5}		10^{-4}		10^{-3}		10^{-2}	
λ	A	ε	A	ε	A	ε	A	ε	A	ε	A	ε	A	ε	A	ε
197	0,2597	$2,60.10^{8}$	0,2440	$2,44.10^{7}$	0,2511	$2,51.10^{6}$	0,3338	$3,34.10^{5}$	1,1202	$1,12.10^{5}$	2,1647	$2,16.10^{4}$	2,1753	$2,18.10^{3}$	1,9618	$1,96.10^{2}$
198	0,2590	$2,59.10^{8}$	0,2434	$2,43.10^{7}$	0,2506	$2,51.10^{6}$	0,3360	$3,36.10^{5}$	1,1496	$1,15.10^{5}$	2,2383	$2,24.10^{4}$	2,2477	$2,25.10^{3}$	2,0390	$2,04.10^{2}$
199	0,2572	$2,57.10^{8}$	0,2418	$2,42.10^{7}$	0,2491	$2,49.10^{6}$	0,3371	$3,37.10^{5}$	1,1777	$1,18.10^{5}$	2,3060	$2,31.10^{4}$	2,3155	$2,32.10^{3}$	2,1144	$2,11.10^{2}$
200	0,2546	$2,55.10^{8}$	0,2392	$2,39.10^{7}$	0,2467	$2,47.10^{6}$	0,3372	$3,37.10^{5}$	1,2045	$1,20.10^{5}$	2,3725	$2,37.10^{4}$	2,3784	$2,38.10^{3}$	2,1919	$2,19.10^{2}$
...																
206	0,2266	$2,27.10^{8}$	0,2113	$2,11.10^{7}$	0,2202	$2,20.10^{6}$	0,3237	$3,24.10^{5}$	1,3238	$1,32.10^{5}$	2,7546	$2,75.10^{4}$	2,7943	$2,79.10^{3}$	2,6238	$2,62.10^{2}$
207	0,2215	$2,22.10^{8}$	0,2064	$2,06.10^{7}$	0,2154	$2,15.10^{6}$	0,3199	$3,20.10^{5}$	1,3308	$1,33.10^{5}$	2,8131	$2,81.10^{4}$	2,8602	$2,86.10^{3}$	2,6923	$2,69.10^{2}$
208	0,2167	$2,17.10^{8}$	0,2017	$2,02.10^{7}$	0,2108	$2,11.10^{6}$	0,3157	$3,16.10^{5}$	1,3316	$1,33.10^{5}$	2,8746	$2,87.10^{4}$	2,9262	$2,93.10^{3}$	2,7592	$2,76.10^{2}$
...																
279	0,0642	NC	0,0606	NC	0,0605	$6,05.10^{5}$	0,0683	$6,83.10^{4}$	0,1463	$1,46.10^{4}$	0,8908	$8,91.10^{3}$	3,1475	$3,15.10^{3}$	3,1754	$3,18.10^{2}$
280	0,0632	NC	0,0596	NC	0,0595	$5,95.10^{5}$	0,0675	$6,75.10^{4}$	0,1466	$1,47.10^{4}$	0,9032	$9,03.10^{3}$	3,1493	$3,15.10^{3}$	3,1386	$3,14.10^{2}$
281	0,0623	NC	0,0586	NC	0,0585	$5,85.10^{5}$	0,0665	$6,65.10^{4}$	0,1464	$1,46.10^{4}$	0,9098	$9,10.10^{3}$	3,1731	$3,17.10^{3}$	3,1198	$3,12.10^{2}$
282	0,0613	NC	0,0576	NC	0,0576	$5,76.10^{5}$	0,0656	$6,56.10^{4}$	0,1455	$1,46.10^{4}$	0,9097	$9,10.10^{3}$	3,1999	$3,20.10^{3}$	3,1075	$3,11.10^{2}$
283	0,0604	NC	0,0566	NC	0,0567	$5,67.10^{5}$	0,0646	$6,46.10^{4}$	0,1439	$1,44.10^{4}$	0,9028	$9,03.10^{3}$	3,2224	$3,22.10^{3}$	3,0911	$3,09.10^{2}$
284	0,0595	NC	0,0557	NC	0,0557	$5,57.10^{5}$	0,0635	$6,35.10^{4}$	0,1416	$1,42.10^{4}$	0,8889	$8,89.10^{3}$	3,2215	$3,22.10^{3}$	3,0614	$3,06.10^{2}$

Tableau VI : Détermination des paramètres spectrophotométriques du C[4]S de 10^{-6} mol.L^{-1} à 2,5.10^{-4} mol.L^{-1}

c	10^{-6}		$2,5.10^{-6}$		5.10^{-6}		$7,5.10^{-6}$		10^{-5}		$2,5.10^{-5}$		5.10^{-5}		$7,5.10^{-5}$		10^{-4}		$2,5.10^{-4}$	
λ	A	ε	A	ε	A	E	A	ε	A	ε	A	ε	A	ε	A	ε	A	ε	A	ε
207	0,1125	$1,12.10^5$	0,2792	$1,12.10^5$	0,5458	$1,09.10^5$	0,8631	$1,15.10^5$	1,1321	$1,13.10^5$	2,3299	$9,32.10^4$	2,5655	$5,13.10^4$	2,5899	$3,45.10^4$	2,5942	$2,59.10^4$	2,6308	NC
208	0,1123	$1,12.10^5$	0,2793	$1,12.10^5$	0,54711	$1,09.10^5$	0,8654	$1,15.10^5$	1,1374	$1,14.10^5$	2,3688	$9,48.10^4$	2,6233	$5,25.10^4$	2,6603	$3,55.10^4$	2,6622	$2,66.10^4$	2,6967	NC
209	0,1115	$1,12.10^5$	0,2778	$1,11.10^5$	0,5450	$1,09.10^5$	0,8624	$1,15.10^5$	1,1353	$1,14.10^5$	2,3985	$9,59.10^4$	2,6837	$5,37.10^4$	2,7313	$3,64.10^4$	2,7242	$2,72.10^4$	2,7512	NC
210	0,1101	$1,10.10^5$	0,2744	$1,10.10^5$	0,5394	$1,08.10^5$	0,8539	$1,14.10^5$	1,1255	$1,13.10^5$	2,4115	$9,65.10^4$	2,7487	$5,50.10^4$	2,8035	$3,74.10^4$	2,7985	$2,80.10^4$	2,8083	NC
211	0,1080	$1,08.10^5$	0,2694	$1,08.10^5$	0,5305	$1,06.10^5$	0,8404	$1,12.10^5$	1,1085	$1,11.10^5$	2,4162	$9,66.10^4$	2,8156	$5,63.10^4$	2,8850	$3,85.10^4$	2,8803	$2,88.10^4$	2,8754	NC
212	0,1054	$1,05.10^5$	0,2629	$1,05.10^5$	0,5184	$1,04.10^5$	0,8271	$1,10.10^5$	1,0844	$1,08.10^5$	2,4023	$9,61.10^4$	2,8797	$5,76.10^4$	2,9534	$3,94.10^4$	2,9444	$2,94.10^4$	2,9553	NC
...																				
218	0,08205	$8,20.10^4$	0,2052	$8,21.10^4$	0,4076	$8,15.10^4$	0,6472	$8,63.10^4$	0,8574	$8,57.10^4$	2,0291	$8,12.10^4$	3,2315	$6,46.10^4$	3,5449	$4,73.10^4$	3,5241	$3,52.10^4$	4,7267	NC
219	0,0778	$7,78.10^4$	0,1949	$7,80.10^4$	0,3876	$7,75.10^4$	0,6157	$8,21.10^4$	0,8164	$8,16.10^4$	1,9430	$7,77.10^4$	3,2493	$6,50.10^4$	3,7881	$5,05.10^4$	3,6720	$3,67.10^4$	5,1759	NC
...																				
280	0,0084	NC	0,0205	$8,21.10^3$	0,0414	$8,27.10^3$	0,0658	$8,77.10^3$	0,0865	$8,65.10^3$	0,2082	$8,33.10^3$	0,4185	$8,37.10^3$	0,6338	$8,45.10^3$	0,8416	$8,42.10^3$	2,0180	NC
281	0,0084	NC	0,0207	$8,26.10^3$	0,0417	$8,34.10^3$	0,0663	$8,84.10^3$	0,0872	$8,72.10^3$	0,2101	$8,40.10^3$	0,4221	$8,44.10^3$	0,6392	$8,52.10^3$	0,8490	$8,49.10^3$	2,0348	NC
282	0,0084	NC	0,0206	$8,26.10^3$	0,0417	$8,34.10^3$	0,0663	$8,84.10^3$	0,0872	$8,72.10^3$	0,2102	$8,41.10^3$	0,4225	$8,45.10^3$	0,6397	$8,53.10^3$	0,8497	$8,50.10^3$	2,0361	NC
283	0,0083	NC	0,0205	$8,19.10^3$	0,0414	$8,28.10^3$	0,0658	$8,78.10^3$	0,0865	$8,65.10^3$	0,2087	$8,35.10^3$	0,4195	$8,39.10^3$	0,6350	$8,47.10^3$	0,8435	$8,44.10^3$	2,0208	NC

Tableau VII : Détermination des paramètres spectrophotométriques du C[4]S de 10^{-6} mol.L^{-1} 10^{-5} mol.L^{-1}

	10^{-6}		2.10^{-6}		4.10^{-6}		6.10^{-6}		8.10^{-6}		10^{-5}	
λ (nm)	A	ε	A	ε	A	ε	A	ε	A	ε	A	ε
280	0,0055	$5,51.10^3$	0,0166	$8,30.10^3$	0,0326	$8,15.10^3$	0,0504	$8,39.10^3$	0,0766	$9,58.10^3$	0,0934	$9,34.10^3$
281	0,0058	$5,76.10^3$	0,0169	$8,43.10^3$	0,0331	$8,28.10^3$	0,0511	$8,51.10^3$	0,0774	$9,68.10^3$	0,0944	$9,44.10^3$
282	0,0059	$5,95.10^3$	0,0170	$8,48.10^3$	0,0333	$8,33.10^3$	0,0514	$8,56.10^3$	0,0777	$9,71.10^3$	0,0946	$9,46.10^3$
283	0,0061	$6,07.10^3$	0,0169	$8,47.10^3$	0,0333	$8,32.10^3$	0,0512	$8,54.10^3$	0,0773	$9,66.10^3$	0,0941	$9,41.10^3$
284	0,0061	$6,11.10^3$	0,0167	$8,37.10^3$	0,0330	$8,24.10^3$	0,0506	$8,43.10^3$	0,0763	$9,54.10^3$	0,0928	$9,28.10^3$
285	0,0061	$6,07.10^3$	0,0164	$8,19.10^3$	0,0323	$8,08.10^3$	0,0495	$8,25.10^3$	0,0747	$9,34.10^3$	0,0908	$9,08.10^3$

4 Détermination des paramètres spectrophotométriques du C[4]S-BTZ

Les tableaux suivants donnent les valeurs d'absorbance du calix[4]arène sulfoné et bithiazolé obtenues aux environs des pics maximum d'absorption :

- Tableau VIII) pour des concentrations de 10^{-3} mol.L^{-1} à 10^{-6} mol.L^{-1}

et estimation des coefficients d'absorption molaire grâce à l'Équation 3 : $A = \varepsilon.l.c$.

Les cases en surbrillance représentent les valeurs d'absorbance maximales observées.

Tableau VIII : Détermination des paramètres spectrophotométriques du C[4]S-BTZ de 10^{-6} mol.L^{-1} à 10^{-3} mol.L^{-1}

	10-3		10-4		$7{,}5.10^{-5}$		5.10^{-5}		$2{,}5.10^{-5}$		10-5		$7{,}5.10^{-6}$		5.10^{-6}		$2{,}5.10^{-6}$		10-6	
λ	A	ε	A	ε	A	ε	A	ε	A	ε	A	ε	A	ε	A	ε	A	ε	A	ε
325	2,4193	$2{,}42.10^{3}$	1,9851	$1{,}99.10^{4}$	1,5901	$2{,}12.10^{4}$	1,0810	$2{,}16.10^{4}$	0,5404	$2{,}16.10^{4}$	0,2220	$2{,}22.10^{4}$	0,1687	$2{,}25.10^{4}$	0,1042	$2{,}08.10^{4}$	0,0512	$2{,}05.10^{4}$	0,0228	$2{,}28.10^{4}$
326	2,4286	$2{,}43.10^{3}$	1,9965	$2{,}00.10^{4}$	1,6017	$2{,}14.10^{4}$	1,0886	$2{,}18.10^{4}$	0,5446	$2{,}18.10^{4}$	0,2237	$2{,}24.10^{4}$	0,1701	$2{,}27.10^{4}$	0,1050	$2{,}10.10^{4}$	0,0516	$2{,}07.10^{4}$	0,0230	$2{,}30.10^{4}$
327	2,4385	$2{,}44.10^{3}$	2,0059	$2{,}01.10^{4}$	1,6102	$2{,}15.10^{4}$	1,0944	$2{,}19.10^{4}$	0,5478	$2{,}19.10^{4}$	0,2249	$2{,}25.10^{4}$	0,1712	$2{,}28.10^{4}$	0,1056	$2{,}11.10^{4}$	0,0519	$2{,}08.10^{4}$	0,0231	$2{,}31.10^{4}$
328	2,4445	$2{,}44.10^{3}$	2,0108	$2{,}01.10^{4}$	1,6159	$2{,}15.10^{4}$	1,0984	$2{,}20.10^{4}$	0,5500	$2{,}20.10^{4}$	0,2257	$2{,}26.10^{4}$	0,1719	$2{,}29.10^{4}$	0,1060	$2{,}12.10^{4}$	0,0522	$2{,}09.10^{4}$	0,0231	$2{,}31.10^{4}$
329	2,4450	$2{,}45.10^{3}$	2,0159	$2{,}02.10^{4}$	1,6195	$2{,}16.10^{4}$	1,1005	$2{,}20.10^{4}$	0,5513	$2{,}21.10^{4}$	0,2261	$2{,}26.10^{4}$	0,1723	$2{,}30.10^{4}$	0,1063	$2{,}13.10^{4}$	0,0522	$2{,}09.10^{4}$	0,0232	$2{,}32.10^{4}$
330	2,4489	$2{,}45.10^{3}$	2,0198	$2{,}02.10^{4}$	1,6195	$2{,}16.10^{4}$	1,1007	$2{,}20.10^{4}$	0,5515	$2{,}21.10^{4}$	0,2261	$2{,}26.10^{4}$	0,1723	$2{,}30.10^{4}$	0,1064	$2{,}13.10^{4}$	0,0523	$2{,}09.10^{4}$	0,0231	$2{,}31.10^{4}$
331	2,4475	$2{,}45.10^{3}$	2,0217	$2{,}02.10^{4}$	1,6154	$2{,}15.10^{4}$	1,0987	$2{,}20.10^{4}$	0,5506	$2{,}20.10^{4}$	0,2256	$2{,}26.10^{4}$	0,1719	$2{,}29.10^{4}$	0,1063	$2{,}13.10^{4}$	0,0521	$2{,}09.10^{4}$	0,0231	$2{,}31.10^{4}$
332	2,4469	$2{,}45.10^{3}$	2,0214	$2{,}02.10^{4}$	1,6095	$2{,}15.10^{4}$	1,0947	$2{,}19.10^{4}$	0,5486	$2{,}19.10^{4}$	0,2248	$2{,}25.10^{4}$	0,1712	$2{,}28.10^{4}$	0,1059	$2{,}12.10^{4}$	0,0519	$2{,}08.10^{4}$	0,0230	$2{,}30.10^{4}$
333	2,4493	$2{,}45.10^{3}$	2,0175	$2{,}02.10^{4}$	1,6015	$2{,}14.10^{4}$	1,0886	$2{,}18.10^{4}$	0,5454	$2{,}18.10^{4}$	0,2235	$2{,}24.10^{4}$	0,1701	$2{,}27.10^{4}$	0,1053	$2{,}11.10^{4}$	0,0516	$2{,}06.10^{4}$	0,0228	$2{,}28.10^{4}$
334	2,4464	$2{,}45.10^{3}$	2,0063	$2{,}01.10^{4}$	1,5899	$2{,}12.10^{4}$	1,0802	$2{,}16.10^{4}$	0,5409	$2{,}16.10^{4}$	0,2217	$2{,}22.10^{4}$	0,1687	$2{,}25.10^{4}$	0,1045	$2{,}09.10^{4}$	0,0512	$2{,}05.10^{4}$	0,0226	$2{,}26.10^{4}$
335	2,4373	$2{,}44.10^{3}$	1,9885	$1{,}99.10^{4}$	1,5751	$2{,}10.10^{4}$	1,0694	$2{,}14.10^{4}$	0,5351	$2{,}14.10^{4}$	0,2195	$2{,}19.10^{4}$	0,1669	$2{,}23.10^{4}$	0,1034	$2{,}07.10^{4}$	0,0506	$2{,}02.10^{4}$	0,0223	$2{,}23.10^{4}$

Annexe 4 : Analyses statistiques des résultats obtenus en spectrophotométrie UV-Visible

1 Analyse de régression des paramètres spectrophotométriques de la CHX

1.1 A la longueur d'onde d'absorption maximale de 232 nm

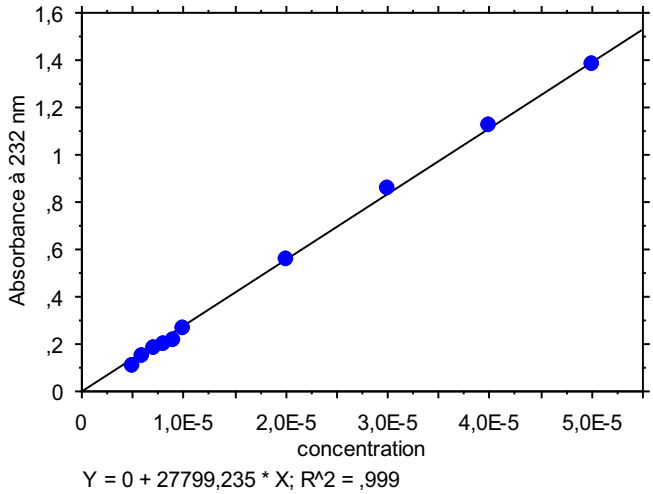
Résumé régression
Absorbance à 232 nm vs concentration

Nombre	10
Manquants	0
|R|	1,000
R carré	,999
R carré ajusté	,999
Ec. type résiduel	,021

Coeff. de régression
Absorbance à 232 nm vs concentration

	Coefficient	Erreur standardisée	Coeff. standardisé	Valeur de t	Valeur de p
concentration	27799,235	273,063	,973	101,805	<,0001

Graphe de régression



Y = 0 + 27799,235 * X; R^2 = ,999

Intervalles de confiance
Absorbance à 232 nm vs concentration

	Coefficient	95% Inf.	95% Sup.
concentration	27799,235	27181,524	28416,947

1.2 A la longueur d'onde d'absorption maximale de 255 nm

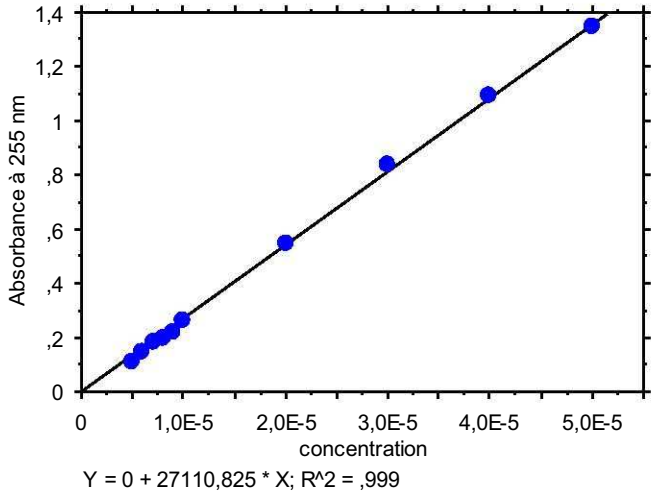
Résumé régression
Absorbance à 255 nm vs concentration

Nombre	10
Manquants	0
|R|	1,000
R carré	,999
R carré ajusté	,999
Ec. type résiduel	,018

Coeff. de régression
Absorbance à 255 nm vs concentration

	Coefficient	Erreur standardisée	Coeff. standardisé	Valeur de t	Valeur de p
concentration	27110,825	235,245	,977	115,245	<,0001

Graphe de régression



Y = 0 + 27110,825 * X; R^2 = ,999

Intervalles de confiance
Absorbance à 255 nm vs concentration

	Coefficient	95% Inf.	95% Sup.
concentration	27110,825	26578,663	27642,987

2 Analyse de régression des paramètres spectrophotométriques de l'HXM à 262 nm

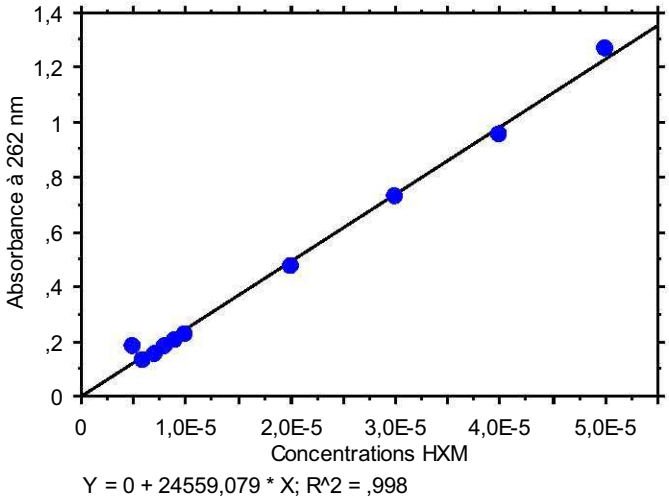
Résumé régression
Absorbance à 262 nm vs Concentrations HXM

Nombre	10
Manquants	0
|R|	,999
R carré	,998
R carré ajusté	,997
Ec. type résiduel	,030

Coeff. de régression
Absorbance à 262 nm vs Concentrations HXM

	Coefficient	Erreur standardisée	Coeff. standardisé	Valeur de t	Valeur de p
Concentrations HXM	24559,079	391,300	,984	62,763	<,0001

Graphe de régression



Y = 0 + 24559,079 * X; R^2 = ,998

Intervalles de confiance
Absorbance à 262 nm vs Concentrations HXM

	Coefficient	95% Inf.	95% Sup.
Concentrations HXM	24559,079	23673,896	25444,262

3 Analyse de régression des paramètres spectrophotométriques du C[4]S

3.1 C[4]S dialysé

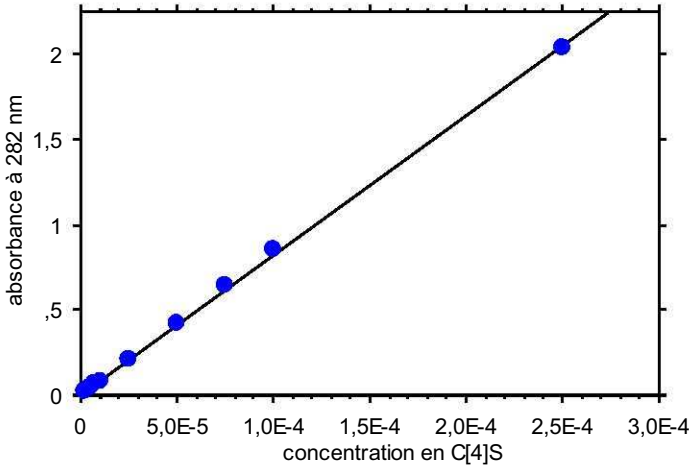
Résumé régression
absorbance à 282 nm vs concentration en C[4]S

Nombre	9
Manquants	0
|R|	1,000
R carré	1,000
R carré ajusté	1,000
Ec. type résiduel	,015

Coeff. de régression
absorbance à 282 nm vs concentration en C[4]S

	Coefficient	Erreur standardisée	Coeff. standardisé	Valeur de t	Valeur de p
concentration en C[4]S	8226,944	53,434	1,008	153,965	<,0001

Graphe de régression



Y = 0 + 8226,944 * X; R^2 = 1

Intervalles de confiance
absorbance à 282 nm vs concentration en C[4]S

	Coefficient	95% Inf.	95% Sup.
concentration en C[4]S	8226,944	8103,726	8350,162

3.2 C[4]S non dialysé

Résumé régression
Absorbance à 282 nm vs Concentration en C[4]S non dialysé

Nombre	5
Manquants	0
|R|	,999
R carré	,997
R carré ajusté	,997
Ec. type résiduel	,004

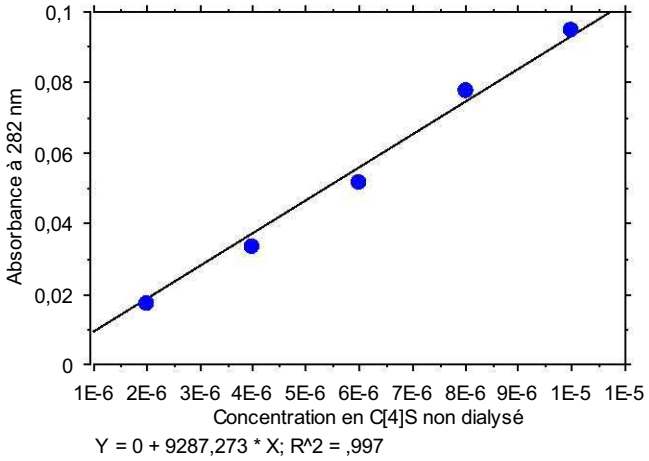
Coeff. de régression
Absorbance à 282 nm vs Concentration en C[4]S non dialysé

	Coefficient	Erreur standardisée	Coeff. standardisé	Valeur de t	Valeur de p
Concentration en C[4]S non dialysé	9287,273	239,660	,927	38,752	<,0001

Intervalles de confiance
Absorbance à 282 nm vs Concentration en C[4]S non dialysé

	Coefficient	95% Inf.	95% Sup.
Concentration en C[4]S non dialysé	9287,273	8621,871	9952,675

Graphe de régression



Y = 0 + 9287,273 * X; R^2 = ,997

4 Analyse de régression des paramètres spectrophotométriques du C[4]S-BTZ

Résumé régression
Absorbances à 330 nm vs concentrations en C[4]S-BTZ

Nombre	9
Manquants	0
|R|	,999
R carré	,998
R carré ajusté	,997
Ec. type résiduel	,038

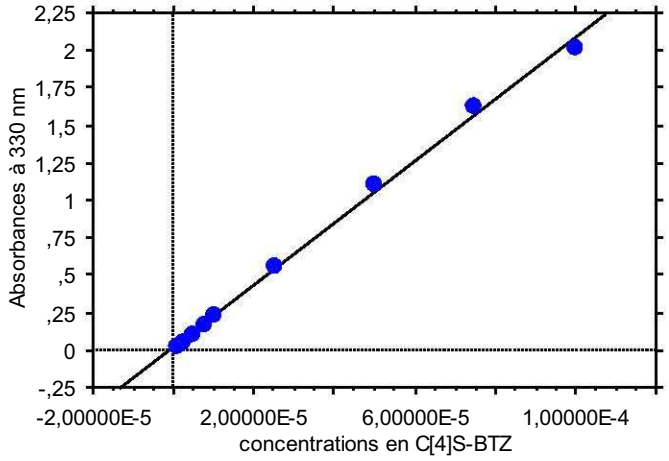
Coeff. de régression
Absorbances à 330 nm vs concentrations en C[4]S-BTZ

	Coefficient	Erreur standardisée	Coeff. standardisé	Valeur de t	Valeur de p
Terme cst.	,019	,017	,019	1,091	,3112
concentrations en C[4]S-BTZ	20675,679	371,080	,999	55,718	<,0001

Intervalles de confiance
Absorbances à 330 nm vs concentrations en C[4]S-BTZ

	Coefficient	95% Inf.	95% Sup.
Terme cst.	,019	-,022	,059
concentrations en C[4]S-BTZ	20675,679	19798,214	21553,144

Graphe de régression



Y = ,019 + 20675,679 * X; R^2 = ,998

Chloé Geller

Equipe GEVSM, UMR 7565, Nancy-Université, CNRS

337 pages

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

Résumé

Une antisepsie-désinfection efficace est fondamentale si l'on considère le manque de traitements antiviraux spécifiques, l'émergence de nouveaux virus et l'accroissement du nombre d'infections nosocomiales virales. A ce jour, une seule norme Européenne, la norme NF EN 14476+A1, propose un cadre pour évaluer l'activité antiseptique antivirale en médecine Humaine et certaines améliorations sont encore nécessaires.

Dans ce but, nous avons développé et validé, biologiquement et physico-chimiquement, un protocole pour évaluer l'activité antiseptique antivirale. Ce dernier est basé sur une méthode originale de filtration sur gel faisant appel à des colonnes de Séphadex™ G-25 et G-10 de notre conception comme moyen de neutralisation. Nous avons ainsi évalué, sur le coronavirus Humain 229E (HCoV 229E), les activités 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 la norme Européenne, pour qu'une formulation, simple ou complexe, puisse prétendre à une activité antiseptique antivirale, il faut qu'elle induise une diminution de 4 $\log_{10}$ dans les titres viraux.

L'HXM et le C[4]S n'ont 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 antiseptique sur le HCoV 229E. Enfin, le C[4]S-BTZ a montré une activité comparable, voire meilleure, que la CHX.

Ainsi, grâce à cette méthode originale, nous avons pu déceler un potentiel antiviral prometteur d'une nouvelle molécule, le C[4]S-BTZ, montrant une activité comparable à la CHX mais plus rapide et sans cytotoxicité, contrairement à la CHX.

Mots clés :

Evaluation de l'activité antiseptique antivirale, Neutralisation par filtration sur gel, Séphadex™, coronavirus Humain 229E, chlorhexidine, hexamidine, calix[4]arènes sulfonés

Development of an original method for antiviral antiseptic-disinfectant activity evaluation

Determination of antiseptic properties of calixarenic compounds on the Human coronavirus 229E

Summary

Efficient antisepsis-disinfection is fundamental, considering the lack in antiviral treatments, the emergence of new viruses and the raising of viral nosocomial infections. Only one European Standard (NF EN 14476 + A1) proposes a frame to evaluate antiseptic antiviral activity in Human medicine and some improvements are still needed.

We thus developed and validated, biologically and physic-chemically, a virucidal assay based on an original gel filtration method, using “in-house” G-25 and G-10 Sephadex™ columns, as neutralization method. We evaluated, on the Human coronavirus 229E (HCoV 229E), the antiseptic activity of two reference molecules, chlorhexidine (CHX) and hexamidine (HXM), and of two new potent antiviral drugs: the *tetra-para*-sulfonatocalix[4]arene (C[4]S) and the 1,3-bis(bithiazolyl)-*tetra-para*-sulfonato calix[4]arene (C[4]S-BTZ). A 4 $\log_{10}$ reduction in viral titers is required, according to the European Standard.

HXM and C[4]S showed almost no activity on the HCoV 229E. Considering the CHX, it showed a quite interesting activity, even if it did not reach the threshold to pretend to an antiseptic activity on the HCoV 229E. Finally, The C[4]S-BTZ showed a comparable activity to the CHX, and even better.

Thanks to this original method, we could highlight a new interesting molecule, the C[4]S-BTZ, which showed a close activity to the CHX, but faster and without cytotoxicity, whereas chlorhexidine did.

Key words :

Antiseptic antiviral activity evaluation, gel filtration-based neutralization, Human coronavirus 229E, chlorhexidine, hexamidine, sulfonatocalix[4]arenes