

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



PCT

(43) Date de la publication internationale  
24 janvier 2008 (24.01.2008)

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2008/009862 A2

(51) Classification internationale des brevets : Non classée

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2007/051691

(22) Date de dépôt international : 19 juillet 2007 (19.07.2007)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
0606591 19 juillet 2006 (19.07.2006) FR

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : UNIVERSITE DE ROUEN [FR/FR]; 1, rue Thomas Becket, F-76821 Mont-Saint-Aignan Cedex (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : NGUYEN, Quang Trong [FR/FR]; 8, rue Boulard, F-76620 Le Havre (FR). LEBRUN, Laurent [FR/FR]; 12 rue de la Ferme, F-76160 Darnetal (FR).

(74) Mandataires : Cabinet Plasseraud etc.; 52 rue de la Victoire, F-75440 Paris Cedex 09 (FR).

(81) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible*) : AE, AG, AL, AM, AT,

AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

(54) Title: ANTIVIRAL FILTER AND USE THEREOF IN AN AIR PURIFIER, AIR CONDITIONER OR AIR HUMIDIFIER

(54) Titre : FILTRE ANTIVIRAL ET SON UTILISATION DANS UN PURIFICATEUR D'AIR, CLIMATISEUR OU HUMIDIFICATEUR

(57) Abstract: Fiber bed, preferably negatively charged, covered with a cationic polymer having a positive net charge; antiviral filter comprising said fiber bed; and method for the fabrication of said fiber bed having antiviral characteristic.

(57) Abrégé : Lit de fibres, de préférence chargé négativement, recouvert avec un polymère cationique ayant une charge positive nette, filtre antiviral comprenant ledit lit de fibres et procédé d'obtention dudit lit de fibres à propriété antivirale.

**Filtre antiviral et son utilisation dans un  
purificateur d'air, climatiseur ou humidificateur**

La présente invention concerne le domaine du risque 5 sanitaire et de la santé publique, notamment lié à la présence de virus aériens. L'invention concerne plus particulièrement un filtre antiviral et optionnellement antibactérien qui est capable de séquestrer les virus et optionnellement les bactéries présents dans l'air ambiant. L'invention concerne 10 aussi tous les produits comprenant ledit filtre tels que des climatiseurs, purificateurs d'air, humidificateurs, ou dispositifs médicaux comme les masques chirurgicaux.

L'élimination des virus aériens est aujourd'hui un important sujet de santé publique. Par exemple, les récentes 15 épidémies virales en Asie (grippes aviaires, SRAS) ont montré qu'il existe un réel besoin de protection face aux attaques virales. La vaccination est pour l'instant une solution peu efficace, du fait des mutations rapides des virus ainsi que de leur multiplication et propagation fulgurantes. Les filtres 20 bactériens existants à l'heure actuelle, tels que les filtres HEPA que l'on peut trouver par exemple dans les masques chirurgicaux traditionnels, ne sont pas efficaces comme barrière de protection contre les virus. En effet, ces filtres sont constitués de couches de polypropylène non tissé dont les 25 pores présentent une taille de 0,2 µm. Cette taille de pores est peu efficace contre les virus puisque ces derniers sont d'une taille inférieure (de 80 à 110 nm). La fabrication de filtres antiviraux représente ainsi une solution intéressante face à ce besoin de protection.

30 Plusieurs approches de fabrication de filtres antiviraux ont été décrites.

Par exemple, la demande de brevet japonais JP2004432430 décrit ainsi un filtre contenant un composé extrait de la

graminée *Sasa veitchii*, qui aurait des vertus antibactérienne et antivirale.

Le brevet US 5, 888, 527 divulgue un masque antiviral imprégné de polyphénol de thé contenant des catéchines et des théaflavines qui permettrait d'inactiver les virus en inhibant la réplication virale et en altérant les propriétés physiques des membranes virales.

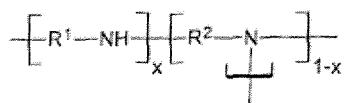
La demande de brevet international WO03/051460 concerne un masque comprenant un filtre passif et un filtre actif désinfectant. Le filtre passif permettrait de retenir les particules de poussière, les bactéries et les spores, tandis que le filtre actif tuerait les bactéries, les spores et les virus dont la taille est trop petite pour qu'ils soient bloqués par le filtre passif. Le filtre actif comprend des agents antibactériens, antibiotiques ou antiviraux comme la chlorohexidine ou d'autres composés antiseptiques contenant de la chlorine ou un halogène antiseptique.

Enfin, l'équipe de Kawabata et al. s'est particulièrement intéressée aux polymères de 4-vinylpyridine, et a démontré que ces polymères ont une activité antibactérienne (Kawabata et al., antibacterial activity of soluble pyridinium-type polymer, Applied and Environmental Microbiology, 1988, pp. 2532-2535), et également une activité antivirale quand ils sont polymérisés sous forme de billes de diamètre 1.7 microns dans un non-tissé (N. Kawabata et al. 1998, Reactive & functional polymers, n°37 p 213-218). Dans cette publication, le polymère 4-vinylpyridine est polymérisé sur une membrane non tissée ayant une taille de pores de 14 µm, en présence de divinylbenzène, de manière à obtenir des billes de diamètre 1,7 microns. Selon les auteurs, la présence de divinylbenzène est essentielle, car en son absence, la polymérisation conduit à l'obtention d'un film d'homopolymères de 4-vinylpyridine qui rend difficile l'obtention d'une

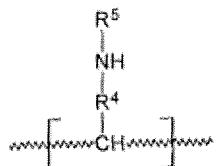
membrane microporeuse. Il est ainsi essentiel que le 4-vinylpyridine soit polymérisé sous forme de billes pour obtenir une membrane microporeuse.

Selon Kawabata et al., l'efficacité de la rétention virale serait due à l'affinité particulière de ce polymère particulier de type pyridine (polychlorure de N-benzyl-4-vinylpyridinium) avec les virus. Sans pouvoir expliquer les causes de cette affinité, Kawabata émet l'hypothèse que (1) les interactions électrostatiques entre les charges positives du polymère et les charges négatives des virus et (2) les interactions hydrophobes entre ce polymère et les virus, pourraient jouer des rôles importants dans cette affinité particulière. Il est à souligner que, en l'absence de test témoin, le test de cette publication ne permet pas d'identifier si la rétention virale observée est réellement due au polymère 4-vinylpyridine ou à la perte virale due aux conditions expérimentales.

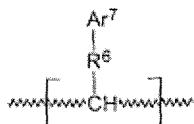
Récemment, la demande de brevet WO2006/071191 a décrit un produit antimicrobien et/ou antiviral, recouvert d'un polymère modifié à partir d'un polymère précurseur, ledit polymère précurseur étant sélectionné dans le groupe des polymères ayant la formule générale I, II ou III ou des copolymères de ceux-ci :



Formula I



Formula II



Formula III

dans lesquelles

R<sup>1</sup> et R<sup>2</sup> indépendamment sont sélectionnés parmi des chaînes hydrocarbonées (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) linéaire ou branchées,

5 X est dans la gamme de 0 à 1,

R<sup>4</sup> est sélectionné parmi une liaison directe et une chaîne hydrocarbonée (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) linéaire ou branchée,

R<sup>5</sup> est sélectionné parmi un hydrogène ou des chaînes hydrocarbonées (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) linéaire ou branchées,

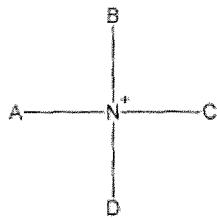
10 R<sup>6</sup> est sélectionné parmi une liaison directe ou des chaînes hydrocarbonées (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) linéaire ou branchées,

Ar<sup>7</sup> est un groupe hétéro-aromatique contenant un azote,

et dans lesquelles ledit polymère précurseur est modifié de telle façon que :

- 15
- au moins une partie desdits atomes d'azotes sont substitués avec un substituant sélectionné dans le groupe consistant en des groupes alkyls C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> linéaires ou branchés, et
  - au moins une partie des atomes d'azote dans ledit polymère précurseur sont quaternisés.
- 20

Au sens de l'invention décrite dans WO2006/071191, l'expression « polymère avec des atomes d'azotes quaternisés » se réfère à des composés de formule générale suivante :



5 dans laquelle au moins un des résidus « A », « B », « C » et « D » fait partie de l'unité de répétition du polymère, et dans laquelle le ou les résidus « A »-« D » non compris dans l'unité de répétition du polymère sont n'importe quels résidus formant avec l'azote un composé quaternaire cationique stable formé de façon covalente.

Le terme non-covalent au sens de WO2006/071191 réfère à une liaison non covalente telle qu'une liaison hydrogène.

10

La Demanderesse a cherché à mettre au point un filtre présentant une activité antivirale, ledit filtre ayant une faible taille de pores, de préférence inférieure à 5 µm, très préférentiellement inférieure à 1 µm et encore plus préférentiellement inférieure ou égale à 0,2 µm. Le filtre selon l'invention peut être préparé selon un procédé simple qui n'exige pas une polymérisation *in situ*, ledit filtre présentant une surface non occlusive, impliquant que la membrane ou lit de fibres reste microporeux(se).

20 La Demanderesse établit ainsi que l'affinité entre un polymère et un virus est due à la densité des charges positives réparties dans le réseau polymérique situé sur l'ensemble de la surface du lit de fibres, lesdites charges étant de préférence portées par des fonctions amines situées dans la chaîne principale et/ou dans les chaînes latérales du polymère.

Ainsi, la présente invention a pour but de proposer une solution alternative aux filtres antiviraux déjà existants

pour répondre au besoin de protection contre les virus aériens, et concerne l'utilisation d'un polymère cationique ayant de préférence plus d'une fonction amine par motif, susceptible d'être déposé sur un lit de fibres, de préférence 5 non tissé, en tant que piège à virus.

La présente invention a plus particulièrement pour objet un lit de fibres, de préférence chargé négativement, recouvert d'au moins un polymère cationique ayant de 10 préférence plus d'une fonction amine par motif, dont les atomes d'azotes ne sont pas substitués par des groupes alkyls et dont les atomes d'azotes ne sont pas quaternisés, et ayant un taux de protonation d'au moins 20%.

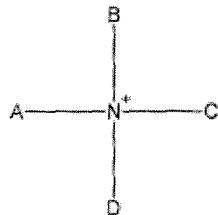
On entend par lit de fibres toute couche tissée ou non 15 tissée composée de fibres en polymères naturels, artificiels ou synthétiques, par exemple des fibres cellulosiques ou non cellulosiques telles que des fibres polyesters, polyéthylène, polypropylène ou polyamides. Suivant un mode de réalisation préféré de l'invention, le lit de fibre est microporeux, 20 c'est-à-dire qu'il a une faible taille de pores, de préférence inférieure à 5  $\mu\text{m}$ , très préférentiellement inférieure à 1  $\mu\text{m}$  et encore plus préférentiellement inférieure ou égale à 0,2  $\mu\text{m}$ .

On entend par polymère cationique, tout polymère 25 protonable, de préférence du type comportant des fonctions amines sur sa chaîne principale et/ou sur sa ou ses chaîne(s) latérale(s), et ayant un taux de protonation tel qu'il est capable de se fixer sur un lit de fibres d'une part et de fixer des virus d'autre part. De préférence, le taux de 30 protonation d'un polymère cationique est d'au moins 20%.

Le polymère cationique de la présente invention se différencie donc de celui décrit dans WO2006/071191 par le fait qu'il ne comprend pas d'atomes d'azotes substitués par

des groupes alkyls ni d'atomes d'azotes quaternisés au sens de WO2006/071191. Le polymère cationique de la présente invention comprend des fonctions amines sur sa chaîne principale et/ou sur sa ou ses chaîne(s) latérale(s), et a un taux de 5 protonation d'au moins 20%.

Au sens de la présente invention, le terme « amine protonée » ou « azote protoné » se réfère à des composés de formule générale suivante :



10 dans laquelle au moins un des résidus « A », « B », « C » et « D » fait partie de l'unité de répétition du polymère, et dans laquelle le ou les résidus « A »-« D » non compris dans l'unité de répétition du polymère sont des atomes d'hydrogènes formant avec l'azote un composé quaternaire 15 cationique stable formé de façon non covalente.

On entend par « taux de protonation » le pourcentage d'atomes d'azotes qui sont protonés.

Dans un mode de réalisation de l'invention, ledit lit de fibres ainsi recouvert a une densité de charge de  $1 \times 10^{-6}$  à 20  $1 \times 10^{-8}$  mole de charge par  $\text{cm}^2$  de lit de fibres ou  $1 \times 10^{-5}$  à  $1 \times 10^{-3}$  meq par  $\text{cm}^2$  de lit de fibres, de préférence ledit lit de fibre a une densité de charge de  $1 \times 10^{-7}$  mol de charge par  $\text{cm}^2$  de lit ou  $1 \times 10^{-4}$  meq par  $\text{cm}^2$  de lit de fibres.

Le dosage de la densité de charge par  $\text{cm}^2$  de lit de fibres est réalisé par les méthodes connues par l'homme du métier comme celles permettant de déterminer la capacité d'échange d'une membrane ou d'une résine échangeuse d'ions

décrivées par F. Helfferich, *Ion Exchange*. McGraw-Hill Book Company Inc. Ed. (1962), Chapitre 4 ; pages 72-94.

Selon un mode de réalisation, ledit polymère comprend 5 des groupes cationiques sur sa chaîne principale, et/ou sur sa ou ses chaînes latérales.

Dans un premier mode de réalisation, ledit polymère cationique comprend un polymère porteur de groupes amine (primaires, secondaires, tertiaires) sur sa chaîne principale, 10 une partie au moins des groupes amines, avantageusement au moins 20%, préférentiellement au moins 30%, très préférentiellement au moins 50%, des groupes amines étant protonés. De préférence, ces polymères cationiques sont le polydiméthylamine-co-épichlorhydrine ou le polydiméthylamine- 15 co-épichlorhydrine-co-éthylenediamine. Le dosage du pourcentage de protonation est réalisé par des techniques bien connues de l'homme du métier telle que celle décrite par Eyler et al. (Eyler RW, Krug TS, Siephius S, *Analytical Chemistry* 1947 ; 19(1) 24-7). D'autres techniques permettant de doser le 20 pourcentage de protonation sont décrites par Muller et al. (G Muller, C Ripoll et E Sélégny, *European Polymer Journal*, volume 7 (10), 1971, pages 1373-1392).

Dans un second mode de réalisation, ledit polymère cationique comprend un polymère porteur de groupes amines 25 (primaires, secondaires, tertiaires) sur sa ou ses chaîne(s) latérale(s), une partie au moins des groupes amines, avantageusement au moins 20%, préférentiellement au moins 30%, très préférentiellement au moins 50%, des groupes amines étant protonés. De préférence, ces polymères cationiques sont la 30 polyvinylamine, le polyacrylamide modifié, le polyvinylimidazole, les diéthylaminoéthyl polysaccharides, le chitosan, les polyméthacrylate, de préférence le poly 2-

diméthylaminoéthyl-méthacrylate, et ne comprennent pas le 4-vinylpyridine.

Dans un troisième mode de réalisation très préféré, l'édit polymère cationique comprend un polymère porteur de groupes amine (primaires, secondaires, tertiaires) sur sa chaîne principale et sur sa ou ses chaîne(s) latérale(s), une partie au moins des groupes amines, et avantageusement au moins 20%, préférentiellement au moins 30%, très préférentiellement au moins 50%, des groupes amines étant protonés. De préférence, ces polymères cationiques sont le polyéthylène-imine.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, l'édit polymère est le polyéthylène-imine.

15 La présente invention a également pour objet un filtre antiviral et optionnellement antibactérien comprenant au moins un lit de fibres recouvert d'au moins un polymère cationique tel que décrit précédemment.

20 Dans un mode de réalisation préféré, le filtre de l'invention est un filtre antiviral et antibactérien, et comprend au moins un lit de fibres recouvert d'un polymère cationique tel que décrit précédemment, l'édit lit de fibre ayant une taille de pores égale ou inférieure à 0,2 µm. La 25 taille de pores égale ou inférieure à 0,2 µm confère une propriété antibactérienne au lit de fibres ; la surface de ce lit de fibres est ensuite recouverte par au moins un polymère cationique, le lit de fibres acquiert ainsi une propriété antivirale en plus de la propriété antibactérienne.

30 On entend par propriétés antivirales du lit de fibres, la capacité dudit lit de fibres à séquestrer les virus.

On entend par virus aérien notamment les virus de la grippe (Influenza virus A, B et C), les coronavirus (par

exemple SARS-CoV). D'autres virus concernés également par l'invention sont notamment le virus de la variole, les bactériophages (E. coli), les virus des hépatites, les poliovirus, rotavirus, le virus mosaïque du tabac, le virus 5 ébola et autres virus infectieux.

Dans un autre mode de réalisation préféré, le filtre de l'invention est un filtre antiviral et antibactérien, et comprend au moins un lit de fibres recouvert d'un polymère 10 cationique tel que décrit précédemment, et au moins un lit de fibre ayant une taille de pores égale ou inférieure à 0,2 µm.

Avantageusement, le lit de fibres selon l'invention est efficace pendant une durée d'au moins 5 heures, de préférence d'au moins 12 heures et très préférentiellement d'au moins 18 15 heures.

La présente invention a aussi pour objet un purificateur d'air, un climatiseur ou un humidificateur comprenant au moins un filtre antiviral et optionnellement antibactérien tel que décrit précédemment.

La présente invention a aussi pour objet un dispositif médical comprenant au moins un filtre antiviral et optionnellement antibactérien tel que décrit précédemment, notamment un masque chirurgical, des pansements, des vêtements de protection tels qu'un survêtement...

La présente invention a pour objet un procédé de préparation d'un lit de fibres à propriété antivirale, comprenant la mise en contact dudit lit de fibres avec une solution de polymère cationique tel que décrit précédemment, puis une étape de séchage.

Lors de la mise en contact du polymère cationique avec le lit de fibres, les fonctions cationiques, en particulier

amine quaternaire, vont interagir avec le lit de fibres, ce qui conduit à la fixation du polymère sur le lit de fibres.

Selon un mode de réalisation, le polymère cationique est solubilisé dans un solvant ou un mélange de solvant. Dans 5 un mode de réalisation préféré, le solvant est un solvant polaire, de préférence l'eau. Très préférentiellement, le polymère cationique est solubilisé dans un sel ionisable, notamment du NaCl.

Selon un mode de réalisation, la concentration du 10 polymère dans ladite solution de polymère cationique est de 0,1 à 200 g.l<sup>-1</sup>, de préférence de 1 à 100 g.l<sup>-1</sup>, plus préférentiellement de 20 à 80 g.l<sup>-1</sup> et très préférentiellement de 40 à 50 g.l<sup>-1</sup>.

Selon un mode de réalisation, le pH de la solution de 15 polymère est de préférence acide, préférentiellement de 3 à 6,5, et très préférentiellement le pH de la solution de polymère est 6.

Selon un mode de réalisation, le lit de fibres est trempé dans la solution de polymère à température ambiante ou 20 la solution de polymère est pulvérisée à température ambiante sur le lit de fibres.

Selon un mode de réalisation, le lit de fibres est trempé dans la solution de polymère pendant 1 minute à 3 heures, préférentiellement pendant 5 minutes à 1 heure, très 25 préférentiellement pendant 10 à 30 minutes.

Selon un mode de réalisation, le lit de fibres est lavé à l'eau avant séchage de manière à éliminer l'excès de solution de polymère.

Selon un mode de réalisation, le lit de fibres est mis 30 à sécher à température ambiante par évaporation ou à l'air ventilé. L'étape de séchage peut être accélérée par un passage dans une étuve ventilée ou sous vide.

Selon un mode de réalisation, l'épaisseur du film de polymère obtenu à la surface du lit de fibres est de  $0,5 \text{ } 10^{-3} \mu\text{m}$  à  $5 \mu\text{m}$ , de préférence de  $0,001$  à  $1 \mu\text{m}$ , très préférentiellement de  $0,001$  à  $0,01 \mu\text{m}$ .

5 La présente invention comprend un procédé de préparation d'un lit de fibres à propriété antivirale tel que décrit précédemment comprenant en outre une étape de réticulation du polymère après séchage. Cette opération, facultative, permet parfois d'optimiser la fixation du  
10 polymère sur les fibres.

La présente invention comprend également un procédé de préparation d'un lit de fibres à propriétés antivirale et antibactérienne dans lequel le procédé de préparation d'un lit de fibres à propriété antivirale tel que décrit précédemment est appliqué sur un lit de fibres comprenant une taille de pores égale ou inférieure à  $0,2 \mu\text{m}$ .

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples d'obtention du lit de fibres à propriété antivirale.

20 Dans les exemples qui suivent, donnés à titre illustratif, il sera fait référence à la figure 1 en annexe, dans laquelle est illustré le montage permettant les expériences de filtration.

25

## 1- Matériels et méthodes

### *Réactifs et supports*

30 Un polyéthylène-imine (PEI) branché de haut poids moléculaire provenant de la société Aldrich Chemicals (référence 40,872-7, lot 05906DU-202) a été choisi pour ces

expériences d'obtention d'un lit de fibres à propriété antivirale.

Le lit de fibres utilisé dans ces expériences provient de la troisième couche de masques de chirurgiens rectangulaires FFP1. Une analyse Infra-Rouge en mode ATR a révélé que les deux premières couches d'un masque (face à l'extérieur) sont constituées de polypropylène non tissé et servent de filtres bactériens, tandis que la troisième couche également non tissée (face visage) est constituée d'un mélange de polyester-cellulose ou de cellulose estérifiée. Ces couches sont chargées négativement.

#### **Dosage des groupes amines protonés**

Cette mesure est effectuée par dosage pHmétrique.

15 25 ml d'une solution de PEI à 0,44 % (4,4 g.l<sup>-1</sup> ou 0,102 mol.l<sup>-1</sup>) dans du NaCl 0,2 mol.l<sup>-1</sup> sont dosés par une solution de HCl 0,1 mol.l<sup>-1</sup>

Le pH de la solution initiale (PEI non protoné) est de 11.

20 14 ml de HCl 0,1 mol.l<sup>-1</sup> ont été ajoutés pour un volume total de 18 ml pour atteindre un pH = 6.

A pH = 6, le taux de protonation du PEI est de 75 %  $\pm$  5 % (14 ml/18 ml).

25

#### **Dosage de la densité de charge par cm<sup>2</sup> de lit de fibres.**

Une surface précise du lit de fibres (232 cm<sup>2</sup>) est trempée pendant 12h dans 50 ml d'une solution à 4,4% de PEI 30 dans du NaCl 0,2 mol.l<sup>-1</sup>. Le lit de fibre est ensuite placé dans une solution de HCl 0,1 mol.l<sup>-1</sup> afin de protoner la totalité du PEI fixé.

Le lit de fibre est ensuite lavé à l'eau jusqu'à pH constant pour soutirer l'excès de HCl.

Le lit de fibre est enfin placé dans 8 ml d'eau. La quantité de charge positive présente sur le lit de fibre est 5 dosée par la soude  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ .

Le pH initial est de 8,56. On trouve un volume équivalent de  $2,5 \text{ cm}^3$  de soude  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ .

Ceci correspond à une concentration de  $3,125 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$  d'acide, ou  $2,5 \times 10^{-5}$  mole d'acide dans les 8 ml d'eau.

10 En considérant qu'une mole d'acide avait réagi avec une mole de motif de répétition de PEI ( $M_{\text{PEI}} = 43 \text{ g.mol}^{-1}$ ),  $1,075 \times 10^{-3} \text{ g}$  de PEI sont donc fixés sur les  $232 \text{ cm}^2$  de lit de fibre, ce qui est équivalent à  $4,63 \times 10^{-6} \text{ g}$  de PEI par  $\text{cm}^2$  de lit de fibre.

15 La valeur de densité de charge du lit de fibres est donc de  $1,1 \times 10^{-7}$  mole de charge par  $\text{cm}^2$  de lit de fibres ou mieux  $1,1 \times 10^{-4}$  meq par  $\text{cm}^2$  de lit de fibres.

### ***Modification de la couche 3***

20 La fonctionnalisation s'est portée sur la couche 3 du masque, ci-après dénommée lit de fibres.

La couche non tissée est trempée pendant une journée dans une solution de PEI à 4,4% en masse dans du NaCl à 0,2 M à pH=8 ou à pH=6.

25 Le sel permet d'augmenter la quantité de polymère fixée. La valeur pH de 8 correspond à un pH optimum de fixation préalablement déterminé. La valeur pH de 6 permet d'augmenter la protonation, de préférence la quaternisation du PEI ( $7 < \text{pKa} < 9$ ) et donc d'améliorer sa fixation. La couche est 30 ensuite égouttée, lavée à l'eau sous agitation lente pendant

10 h, puis séchée à l'air. Enfin, la couche est stérilisée sous UV avant son montage dans la cellule de filtration.

### ***Virus et souche bactérienne***

5 Le bactériophage T4 parasite de la souche *E. coli* a été choisi comme virus test. Le bactériophage T4 et la souche *E. coli* sont tous deux non pathogènes pour l'homme et pour l'environnement.

### ***Milieux de culture***

10 Le milieu 1 sert pour infecter *E. coli* par le phage et pour réaliser l'expérience de filtration. Il a pour composition pour un litre d'eau déionisée (Milliro®) : extrait de peptone et de viande : 13g, extrait de levure : 5g ; NaCl : 15 5g ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 8g ; NaOH pour obtenir un pH de 7,6.

15 Le milieu 2, plus riche que le premier, sert au dosage du phage. Il a pour composition pour un litre d'eau déionisée (Milliro®) : extrait de peptone et de viande : 10g ; glucose : 10 g ; NaCl : 3g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0,044 g ; CaCl<sub>2</sub> : 0,011 g ; MgCl<sub>2</sub> : 20 0,203g ; NaOH pour obtenir un pH de 7,6.

25 Les extraits de peptone, de viande et de levure sont des substrats riches en protéines, en glucides et en vitamines hydrosolubles qui servent à la croissance bactérienne. Le glucose est un glucide qui a le même rôle. NaCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> sont des sels nécessaires à la survie des organismes vivants. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> est un tampon qui permet de maintenir un pH constant.

30 Les milieux 1 et 2, une fois préparés, sont répartis dans des Erlenmeyer de 250 cm<sup>3</sup>. Ils sont utilisés sous forme liquide ou sous forme gélifiée (pour le milieu 2) en y incorporant de l'agar à 3% en masse (polysaccharide

gélifiant). Ce dernier est coulé dans des boites de Pétri et sert à réaliser les numérations lors du dosage. Les milieux sont stérilisés par autoclave (120°C pendant 20 minutes) puis conservés en chambre froide. Le glucose est autoclavé 5 séparément pour éviter sa caramélation avec le milieu.

### ***Montage***

Le montage est illustré figure 1. Il est constitué d'un compresseur d'air générateur d'aérosols (Diffusion 10 Technique Française - Saint-Etienne - France), relié à un nébuliseur (Atomisor NL 11). Un filtre à gaz de taille de pores 0,22 µm (Gelman) est placé entre le générateur et le nébuliseur afin d'éviter les contaminations bactériennes parasites.

15 La cellule est un support de filtre en deux parties, en verre, comportant une arrivée et une sortie d'air. La membrane est insérée stérilement entre deux joints en caoutchouc recouvrant les rodages de la cellule. L'ensemble est maintenu par des pinces.

20 La sortie de la cellule est reliée à un piège liquide (50 cm<sup>3</sup> de sérum physiologique) pour dissoudre par barbotage les virus qui ont traversé la membrane. Le flux d'air résiduel passe par un second piège liquide contenant de l'eau de javel afin de neutraliser les éventuelles traces de virus qui ne se 25 seraient pas dissous.

L'ensemble du montage est autoclavé, démonté puis assemblé stérilement sous hotte à flux laminaire préalablement stérilisé sous UV.

### ***30 Mode opératoire des expériences de filtration***

Les expériences suivent le même mode opératoire :

**Préparation d'une solution virale :**

Dans un premier temps, *E. coli* est inoculé à l'anse de platine dans 150 cm<sup>3</sup> de milieu 1 à 37°C. L'évolution de la croissance de la bactérie est suivie par un spectrophotomètre 5 UV/visible. Quand la DO à 580 nm atteint 0,5 (c'est à dire une population cellulaire de 2,1 x 10<sup>8</sup> cellules / ml), 18 µl d'une solution référence de phages (contenant 10<sup>12</sup> phages / ml) sont dilués dans 182 µl de sérum physiologique. 20 µl de cette solution sont alors inoculés dans le milieu 1 contenant *E.* 10 *coli*. La quantité de phages injectée doit toujours être proportionnelle à la population cellulaire. Après une nuit de mise en culture, 130 ml de milieu sont centrifugés à 3000 tours/min pendant 10 minutes afin d'éliminer les bactéries. Le surnageant est filtré sur Millipore type HA (Millipore) de taille 15 de pores 0,45 µm. Le filtrat est récupéré pour servir de solution mère à nébuliser.

**Expérience de filtration :**

5 cm<sup>3</sup> de la solution mère de phage sont nébulisées 20 pendant environ 1 heure (débit d'air: 8 L/h). Le montage préalablement décrit a permis de réaliser les expériences suivantes:

- Sans membrane, afin de déterminer les pertes en virus dues au montage.
- Avec les 3 couches du masque de chirurgien, afin de déterminer sa rétention virale.
- Avec un lit de fibres non fonctionnalisé.
- Avec un lit de fibres fonctionnalisé par du PEI à 4,4 % (g/g) à pH=8 dans NaCl 0,2M.
- Avec un lit de fibres fonctionnalisé par du PEI à 4,4 % (g/g) à pH=6 dans NaCl 0,2M.

- Avec un lit de fibres fonctionnalisé par du PEI à 0,44 % (g/g) à pH=6 dans NaCl 0,2M.

### **Titrage des virus**

5 En fin d'expérience, 0,4 ml de la solution placée en sortie de cellule sont prélevés et dilués dans 3,6 cm<sup>3</sup> de sérum physiologique. Cette solution est diluée de manière successive jusqu'à une dilution de 10<sup>-8</sup>. 0,25 ml de chaque dilution sont ensuite transférés dans des tubes stériles vides auxquels on 10 ajoute 0,4 ml d'une suspension de *E. coli* en phase exponentielle de croissance préalablement cultivé dans 150 ml de milieu 2 (D<sub>O<sub>580</sub></sub> référence = 0,8). Ces tubes sont ensuite placés à 37°C pendant 30 min pour permettre aux phages de contaminer *E. Coli*. 3 ml de gélose molle (milieu 2 contenant 15 de l'agar à 0,6%) à 40°C sont ensuite ajoutés à chacun des tubes. Le contenu de chaque tube est étalé sur des boîtes de Pétri contenant une gélose solide (agar 3%) de milieu 2. Les boîtes sont placées à 37°C pendant 24 h avant de dénombrer les plages de lyse.

20 La solution mère est également titrée de la même manière (avec une gamme de dilution jusqu'à 10<sup>-11</sup>) et sert de référence pour chaque expérience.

25 Le facteur de perte est égal au nombre de virus par cm<sup>3</sup> de solution mère divisé par le nombre de phages par cm<sup>3</sup> de solution réceptrice après filtration.

### **2- Résultats et discussions**

#### **Filtration dans la cellule sans membrane**

30 L'expérience de filtration sans membrane sert à évaluer la perte en phage due à la nébulisation, au passage du phage

dans la cellule et à sa récupération par bullage dans la solution de sérum physiologique.  $0,72 \times 10^{10}$  virus par  $\text{cm}^3$  ont été retrouvés pour une solution mère nébulisée contenant  $1,18 \times 10^{10}$  virus par  $\text{cm}^3$ . Le facteur de perte du montage est donc 5 de 1,6.

#### **Filtration à travers le masque commercial**

L'efficacité de la rétention virale du masque chirurgical constitué des 3 couches a été testée.  $0,56 \times 10^{10}$  virus par  $\text{cm}^3$  ont été retrouvés pour une solution mère nébulisée contenant  $2,88 \times 10^{10}$  virus par  $\text{cm}^3$ . Le facteur de perte du masque est donc de 5,2. Compte tenu du facteur de perte propre au seul montage, le masque chirurgical commercial est donc totalement inefficace vis-à-vis des virus.

15

#### **Filtration à travers le lit de fibres non fonctionnalisé**

L'efficacité de la rétention virale du lit de fibres sans traitement a été mesurée.  $0,43 \times 10^{10}$  virus par  $\text{cm}^3$  ont diffusé à travers ce lit de fibres non traité pour une solution mère nébulisée contenant  $1,22 \times 10^{10}$  virus par  $\text{cm}^3$ . Le facteur de perte dû au lit de fibres non traité (i.e. la couche 3 non traitée) est donc de 2,9. Ce facteur est inférieur à celui du masque chirurgical à 3 couches ce qui est logique, car les deux couches polypropylène destinées à la filtration bactérienne filtrent aussi très légèrement les virus.

#### **Filtration à travers le lit de fibres fonctionnalisé par du PEI à 4,4 % (g/g) dans NaCl 0,2M à pH =8**

La mesure de la rétention virale du lit de fibres traité avec du PEI montre que  $1,44 \times 10^3$  virus par  $\text{cm}^3$  ont diffusé pour une solution mère nébulisée contenant  $0,5 \times 10^{10}$

virus par  $\text{cm}^3$ . Le facteur de perte dû à la couche 3 non traitée est donc de  $3,5 \times 10^6$ . Le traitement PEI à 4,4 % (g/g) en milieu NaCl 0,2M à pH =8 est donc très efficace pour ralentir la diffusion des virus. Cependant, le traitement ne permet pas 5 de rendre la couche totalement barrière vis-à-vis des virus.

**Filtration à travers le lit de fibres fonctionnalisé par du PEI à 4,4 % (g/g) dans NaCl 0,2M à pH =6**

Une solution mère nébulisée contenant  $0,7 \times 10^{10}$  virus 10 par  $\text{cm}^3$  est filtrée à travers un lit de fibres fonctionnalisé par du PEI à 4,4 % (g/g) dans NaCl 0,2M à pH =6. La mesure de la rétention virale par cette couche montre qu'aucun virus n'est détecté après filtration. La rétention des virus par la couche 3 traitée est donc totale. Cette couche est devenue 15 totalement barrière vis-à-vis des virus par notre traitement. Le PEI est donc un polymère très efficace pour rendre le système de filtration barrière vis-à-vis des virus.

Nous avons vérifié, par dosage COT (carbone organique 20 total), que le PEI ne se décrochait pas du support lors de la respiration après 5 heures d'utilisation. La respiration a été simulée par diffusion d'air à 8 L /min.

**Filtration à travers le lit de fibres fonctionnalisé par du PEI à 0,44 % (g/g) dans NaCl 0,2M à pH =6**

Nous avons dilué 10 fois la concentration en PEI fixée 25 sur le lit de fibres afin de vérifier son efficacité en solution plus diluée. La mesure de la rétention virale montre que  $5,5 \times 10^5$  virus par  $\text{cm}^3$  ont traversé le filtre pour une solution mère nébulisée contenant  $5,5 \times 10^7$  virus par  $\text{cm}^3$ . Le 30 facteur de perte est donc de 100. Le traitement PEI à 0,44 % (g/g) est donc nettement moins efficace que le traitement à 4,4 % (g/g).

**REVENDICATIONS**

1. Lit de fibres, de préférence chargé négativement, recouvert avec au moins un polymère cationique, dont les 5 atomes d'azotes ne sont pas substitués par des groupes alkyls et dont les atomes d'azotes ne sont pas quaternisés, et ayant un taux de protonation d'au moins 20%.

2. Lit de fibres selon la revendication 1, recouvert sur l'une ou l'autre de ses faces, d'un film de polymère 10 cationique d'une épaisseur de  $0,5 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}$  à  $5 \mu\text{m}$ , de préférence de 0,001 à 1  $\mu\text{m}$ , très préférentiellement de 0,001 à  $0,01 \mu\text{m}$ .

3. Lit de fibres l'une des revendications **1** ou **2**, dans lequel la densité de charge positive est de  $1 \times 10^{-6}$  à  $1 \times 10^{-8}$  mole 15 de charge par  $\text{cm}^2$  de lit de fibres ou  $1 \times 10^{-5}$  à  $1 \times 10^{-3}$  meq par  $\text{cm}^2$  de lit de fibres, de préférence de  $1 \times 10^{-7}$  mol de charge par  $\text{cm}^2$  de lit ou  $1 \times 10^{-4}$  meq par  $\text{cm}^2$  de lit de fibres.

4. Lit de fibres selon l'une quelconque des revendications **1** à **3**, caractérisé en ce que ledit polymère comprend des groupes cationiques sur sa chaîne principale 20 et/ou sur sa ou ses chaînes latérales.

5. Lit de fibres présentant des propriétés antivirales selon l'une quelconque des revendications **1** à **4**, caractérisé en ce que ledit polymère est le polyéthylène-imine.

6. Filtre antiviral comprenant au moins un lit de 25 fibres tel que décrit dans l'une quelconque des revendications **1** à **5**.

7. Filtre antiviral selon la revendication **6**, comprenant en outre un lit de fibres comprenant une taille de pores égale ou inférieure à  $0,2 \mu\text{m}$ .

8. Filtre antiviral selon la revendication 6, caractérisé en ce que ledit lit de fibres a une taille de pores égale ou inférieure à 0,2 µm.

9. Purificateur d'air, climatiseur ou humidificateur 5 comprenant au moins un filtre tel que décrit dans l'une des revendications 6 à 8.

10. Dispositif médical comprenant au moins un filtre tel que décrit dans l'une des revendications 6 à 8, ou au moins un lit de fibres tel que décrit dans l'une des 10 revendications 1 à 5.

11. Dispositif selon la revendication 10, qui est un masque chirurgical, un pansement ou un vêtement de protection tel qu'un survêtement.

12. Procédé de préparation d'un lit de fibres à 15 propriété antivirale comprenant la mise en contact dudit lit de fibres avec une solution de polymère cationique tel que décrit dans l'une quelconque des revendications 1 à 5, puis une étape de séchage.

13. Procédé de préparation d'un lit de fibres à 20 propriété antivirale selon la revendication 12, caractérisé en ce que la concentration du polymère dans la solution est comprise entre 0,1 et 200 g.l<sup>-1</sup>, de préférence entre 1 et 100 g.l<sup>-1</sup>, plus préférentiellement entre 20 et 80 g.l<sup>-1</sup> et très préférentiellement entre 40 et 50 g.l<sup>-1</sup>.

25 14. Procédé de préparation d'un lit de fibres à propriété antivirale selon l'une quelconque des revendications 12 à 13 caractérisé en ce que le pH de la solution de polymère est de préférence acide, préférentiellement compris entre 3 et 6,5, et très préférentiellement le pH de la solution de 30 polymère est 6.

1 / 1

Figure 1

