

## PRESENTATION DES ETUDES

SUR LES ENVIRO-BIOTICS BETTERAIR

**Université de Gêne (Italie)**

**Département de Médecine Expérimentale**

**Pr Michela Tonetti**

**HIGEO Biotech**  
Distributeur officiel Betterair  
[www.higeo.fr](http://www.higeo.fr)



Expériences réalisées pour évaluer la capacité d'Enviro-  
Biotics® de Betterair à inhiber le pouvoir infectieux d'un  
pseudovirus du SRAS-CoV-2.

## Rapport final

Prof. M. Tonetti  
Directeur du DI.ME.S.  
Université de Gênes

Entreprise numériquement par :  
MICHELA TONETTI  
Université des études de Gênes  
Firmato il: 17-12-2020 09:31:09  
Certificat de série : 2288545  
Valable du 01-08-2018 au 01-08-2021

Ce document signé ne peut être utilisé comme tel à des fins de marketing. Le Client peut utiliser le  
les résultats rapportés font référence à ce qu'ils ont été obtenus par le CRS-DIMES de l'Université de Gênes.

## PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

### Génération et caractérisation du pseudoCovid-19

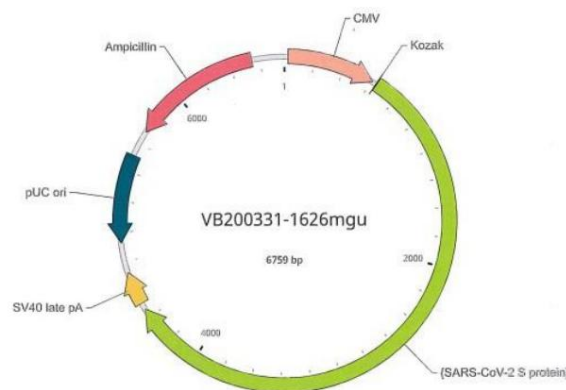
Nous avons généré deux pseudovirus différents avec des caractéristiques structurales et un mécanisme d'infection égaux à ceux du COVID-19 (Sars-CoV-2), en raison de la présence de la protéine Spike S à leur surface.

Un génome de pseudovirus a été inséré avec les gènes d'expression de la protéine de fluorescence EGFP et de la résistance à la puromycine. L'autre a été inséré avec des gènes de résistance à l'enzyme luciférase (LUC) et à la puromycine. La séquence vectorielle utilisée pour la génération des pseudovirus ci-dessus a été obtenue auprès de VectorBuilder Inc (USA). Le résumé vectoriel est présenté dans le tableau 1 et la carte vectorielle spécifique est décrite dans la fig. 1

Tableau 1

ID du vecteur	VB200331-1626mgu
Nom du vecteur	pRP[Exp]-CMV>{protéine S du SRAS-CoV-2}
Taille du vecteur	6759 pb
Type de vecteur	Vecteur d'expression des gènes des mammifères
Promoteur inséré	VMC
ORF inséré	{Protéine S du SRAS-CoV-2}
Nombre de copies plasmidiques	élevé
Résistance aux antibiotiques	Ampicilline
Hôte de clonage	VB UltraStable (ou souche alternative)

Fig. 1



Le protocole pseudoCovid-19 a été standardisé afin d'obtenir une concentration identique de particules virales pour chaque préparation virale.

L'expression de Spike-S dans le pseudoCovid-19 généré, après transfection des cellules HEK dans des conditions spécifiques, a été évaluée par analyse par Western blot.

Une aliquote d'un des bacthes pseudoCovid-19 produite pour les différents tests a été analysée par microscopie électronique à transmission (MET).

Titration pseudoCovid-19

Un titrage du pseudoCovid-19 a été effectué afin de déterminer la concentration des particules virales utilisées dans toutes les expériences réalisées. La quantité d'unités de transduction par millilitre (TU/ml) présentes dans la préparation du pseudoCovid-19 a été calculée comme le nombre de cellules fluorescentes dans les puits de chaque dilution et détecté par analyse FACS. La concentration en TU/ml a été calculée dans les puits où la proportion de cellules fluorescentes était inférieure à 30 % du nombre total de cellules.

Inactivation du pseudoCovid-19 sur les surfaces par les cellules Enviro-Biotics®

L'interaction entre l'Enviro-Biotics® de Betterair, contenant des spores de Bacillus, et le pseudoCovid-19 a été testée à l'aide d'un couvercle de plaque en plastique stérile contenant 96 puits. Les expériences ont été réalisées dans une hotte biologique éteinte et hermétiquement fermée d'un volume intérieur de 0,42 m<sup>3</sup> à une température de 25 °C et à 80 % d'humidité relative.

Les spores Enviro-Biotics® Bacillus, contenues dans le flacon pulvérisateur de Betterair, ont été pulvérisées sur les couvercles des puits, jusqu'à atteindre un volume de 30 µl/puits, suivi de l'ajout de 10 µl de solution saline dans chaque puits. Parallèlement aux puits pulvérisés par les spores, 40 µl de solution saline ont été ajoutés aux puits témoins négatifs sans aucune spore. Les plaques ont été pré-incubées sous hotte pendant quatre heures. L'EGFP-pseudoCovid-19 a été testé dans la première expérience de désactivation virale.

Après quatre heures de préincubation, 30 µl d'EGFP-pseudoCovid-19 ont été ajoutés à chaque puits, donnant un volume final de 70 µl/puits. Cinq périodes d'incubation bactérie-virus ont été testées : 0 min, 15 min, 30 min, 1 h et 3 h en triple.

À la fin de chaque incubation, des échantillons ont été prélevés à la surface du puits en plastique, transférés dans un Tube de 0,2 ml, centrifugé 3 500x pendant 8 minutes et le surnageant récupéré a été filtré (filtre absolu de 0,2 µm) pour éliminer tous les restes bactériens.

Immédiatement après la filtration et pour chaque période d'incubation, les surnageants récupérés ont été transférés dans des plaques à 96 puits où des cellules Caco2 ont étéensemencées (15 000 cellules/puits,ensemencées 24 heures avant la stimulation). Les cellules Caco2 ont été incubées avec le surnageant récupéré pendant 72 heures ; à la fin des 72 heures d'incubation, les cellules Caco2 (pour chaque instant différent) ont été mesurées pour leur fluorescence à la fois avec un spectrofluorimètre et par microscopie confocale pour quantifier l'infectiosité résiduelle de l'EGFP-pseudoCovid-19 (directement proportionnelle à la mesure fluorescence) après son incubation avec des cellules Enviro-Biotics® pré-incubées.

Après détection fluorimétrique, de la puromycine a été ajoutée aux mêmes cellules Caco2 dans chaque puits (afin de sélectionner uniquement les cellules infectées par EGFP-pseudoCovid-19) pour le test de formation de colonies. Les colonies formées pendant 12 jours ont été colorées au cristal violet. Le résultat obtenu par l'analyse de formation de colonies a été capturé par instantané de caméra et par absorbance spectrophotométrique après dissolution du cristal violet fixé dans chaque puits.

Dans le deuxième test de désactivation par les cellules Bacillus, LUC-pseudoCovid-19 a été utilisé à la place de EGFP-pseudoCovid-19 pour valider l'efficacité virucide de Bacillus sur un système différent.

Toutes les conditions expérimentales étaient identiques à l'expérience EGFP-pseudoCovid-19 à l'exception de le temps d'incubation qui a duré 120 heures et l'évaluation des cellules Caco2 infectées qui ont été quantifiées par acquisition par chimiluminescence. Le pouvoir infectieux résiduel du LUC-pseudoCovid-19 était directement proportionnel à la chimiluminescence mesurée qui a été détectée comme activité luciférase.

#### Viabilité des cellules de Bacillus

La viabilité des cellules Bacillus, après les quatre heures de préincubation sur la surface plastique, a été testée sur des plaques de gélose contenant 15 g/l de gélose, 2 g/l d'extrait de levure, 2 g/l de lait écrémé en poudre, 16 g/l de glucose et 5 g/l de glucose. /l de chlorure de sodium. Les cellules de Bacillus ont été suspendues dans un tampon salin, diluées au 1:106 et étalées sur des plaques de gélose. Les plaques de gélose ont ensuite été incubées une nuit à 37°C.

## RÉSULTATS

### Caractérisation du pseudoCovid-19

L'expression de la protéine S dans le pseudoCovid-19 généré, après transfection des cellules HEK, a été détectée par analyse Western blot (Fig1) afin de démontrer l'homologie complète de la protéine pseudoCovid-19 avec le SARS-CoV-2. -protéine.

De plus, une aliquote des lots pseudo Covid-19 produits pour les différents tests de cette étude, a été analysée par microscopie électronique à transmission (TEM). Une image pseudoCovid-19 représentative acquise avec un TEM (50 000x ; 50 kV) est présentée sur la figure 2.

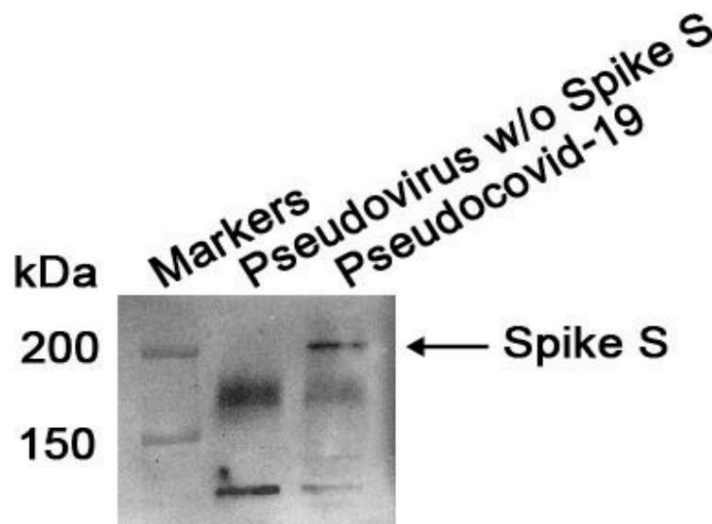


Fig. 1 Western blot réalisé sur la protéine Spike S vide ou surexprimante du pseudoCovid-19 utilisée pour tous les tests réalisés. La protéine Spike S a été identifiée en utilisant un mAb spécifique (Thermo Scientific, USA) pour cette protéine sur le lysat du pseudovirus produit.

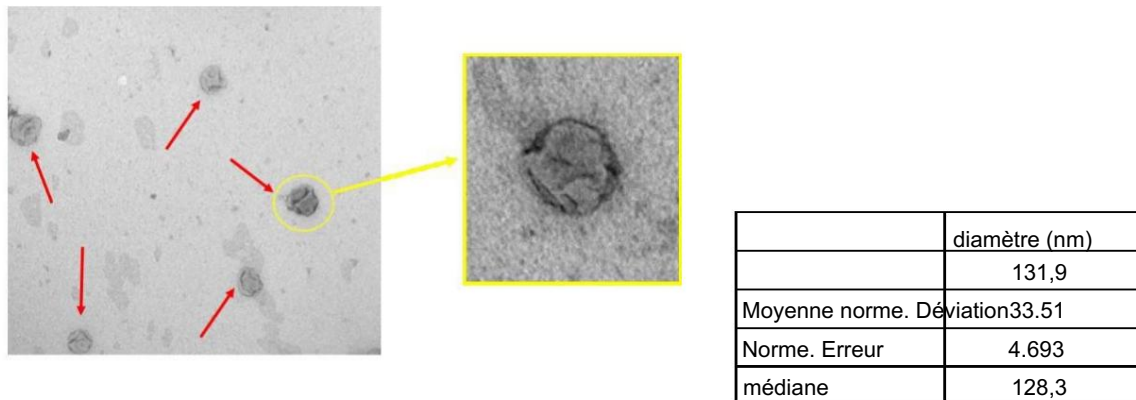


Fig. 3 Une image représentative de l'acquisition TEM du pseudoCovid-19 produit. Les flèches rouges indiquent les particules virales dans le champ d'acquisition ; la boîte jaune est une image zoomée d'une seule particule. Le tableau de droite résume la dimension 2D du pseudoCovid-19.

#### Inactivation du pseudo Covid-19 sur les surfaces par les cellules Enviro-Biotics® Bacillus

Les tests avec EGFP- et LUC-pseudoCovid-19 ont été réalisés selon la procédure décrite dans la section « Procédures expérimentales ».

La quantité de particules de pseudovirus pseudoCovid-19 utilisée pour chaque point d'incubation des tests effectués était de  $2,1 \times 10^4$ , selon le résultat de l'analyse du titrage qui était de  $6,9 \times 10^5$  TU/ml de pseudoCovid-19 dans chaque lot produit.

Bien que la suspension de spores Enviro-Biotics® Bacillus ait été appliquée sur la surface testée seulement 4 heures avant l'inoculation virale, les résultats d'acquisition spetrofluorimétrique de la première inactivation Un test avec EGFP-pseudoCovid-19 a montré que l'incubation des bactéries Bacillus avec les particules virales provoquait une inactivation rapide des virus. En 15 minutes, 67 % des particules virales (une réduction Log de 0,5) ont été neutralisées et en 3 heures, 97,7 % des particules virales (une réduction Log de 1,6) ont été désactivés (Fig. 4).

La concentration en cellules de Bacillus au temps 0 après 4 heures de pré-incubation, avant l'inoculation du pseudoCovid-19, a atteint une UFC de  $1,42 \times 10^8$  cellules/ml, indiquant une initiation de la germination des spores. La concentration initiale de spores appliquée à l'aide de la bombe aérosol Betterair était de  $8 \times 10^7$  spores/ml.

Pendant ce temps, les virus présents dans les surfaces témoins parallèles non traitées étaient totalement stables, indiquant qu'il n'y avait pas de réduction spontanée du nombre de virus. L'analyse par microscopie confocale des cellules infectées par Caco2 a confirmé la désactivation des particules EGFP-pseudoCovid-19 (Fig. 5), démontrant que les cellules Caco2 infectées par l'EGFP-pseudoCovid-19 résiduel, préalablement incubées avec l'actif Enviro Biotics®, n'ont émis aucune fluorescence, indiquant ainsi l'inactivation significative des particules virales.

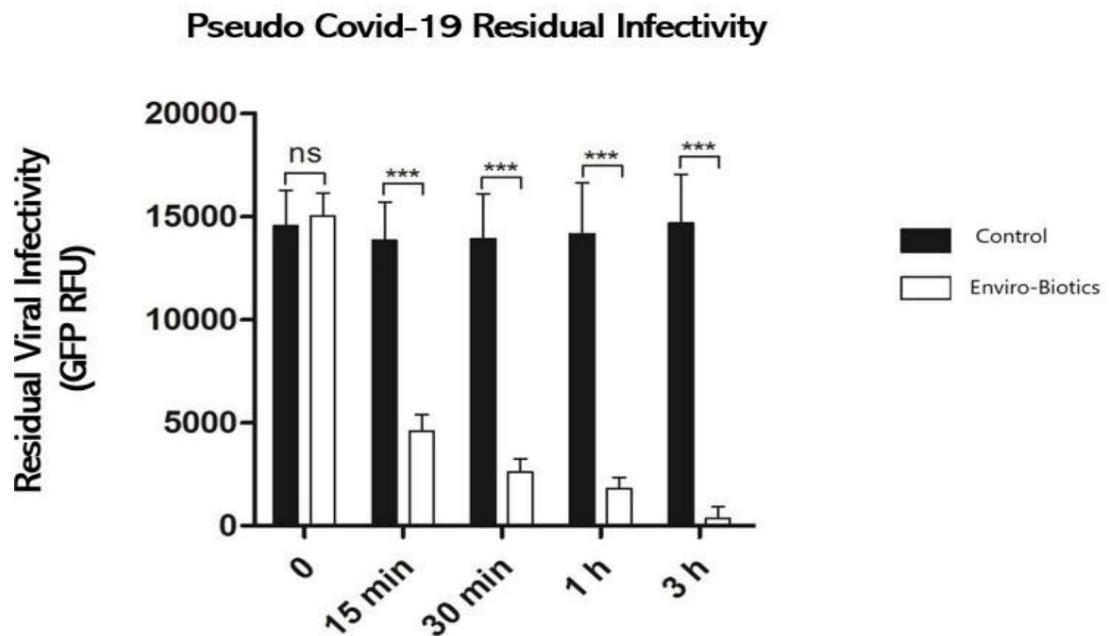


Fig. 4. Quantification fluorimétrique de l'infectivité résiduelle EGFP-pseudoCovid-19 détectée sous forme de fluorescence GFP avec un spectrofluorimètre, présentée en unités de fluorescence relative (RFU). L'autofluorescence de fond provenant uniquement des cellules a été soustraite à chaque instant. Chaque barre correspond à la moyenne  $\pm$  écart-type d'un triple. La valeur P a été calculée par test t non apparié.

### Confocal Microscopy Analysis of Caco2 Cells

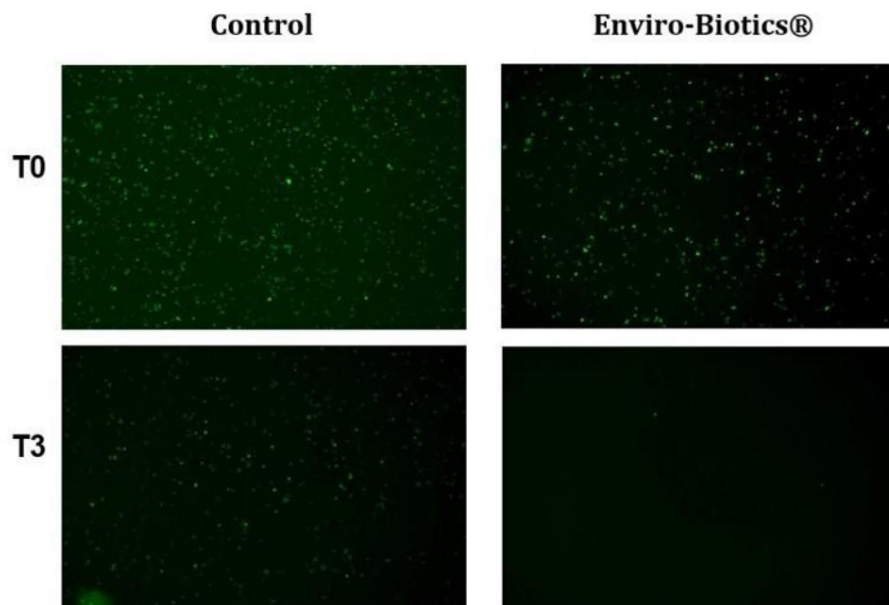


Fig. 5. Analyse par microscopie confocale de cellules Caco2 incubées avec EGFP-pseudoCovid-19 préalablement pré-incubées avec et sans bactérie Enviro Biotic® Bacillus active à T0 (Initiation de Bacillus – incubation du virus) et après 3 heures d'incubation.

Après acquisition par microscopie confocale, de la puromycine a été ajoutée dans chaque puits des cellules hôtes Caco2 comme autre évaluation de l'efficacité virucide des cellules Bacillus. Comme le montre la figure 6, un test de formation de colonies a révélé l'effet de désactivation significatif des cellules de Bacillus sur la capacité de survie du virus. La résistance à la puromycine a également été acquise par absorbance spectrophotométrique après dissolution du cristal violet fixé dans chaque puits (Fig.7).

#### Test de formation de colonies résistantes à la puromycine

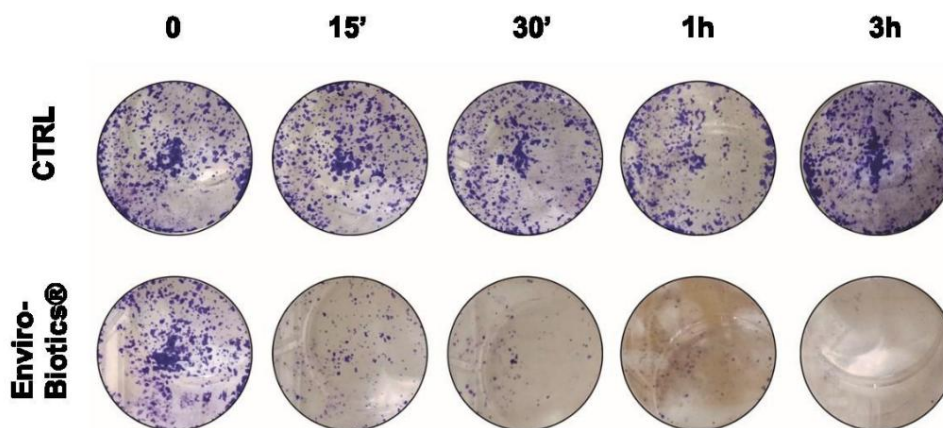


Fig. 6. Test de formation de colonies montrant les plaques contenant des cellules Caco2 qui ont été traitées avec le Bacillus Enviro-Biotics® pulvérisé par rapport au contrôle non traité, après une supplémentation en puromycine.

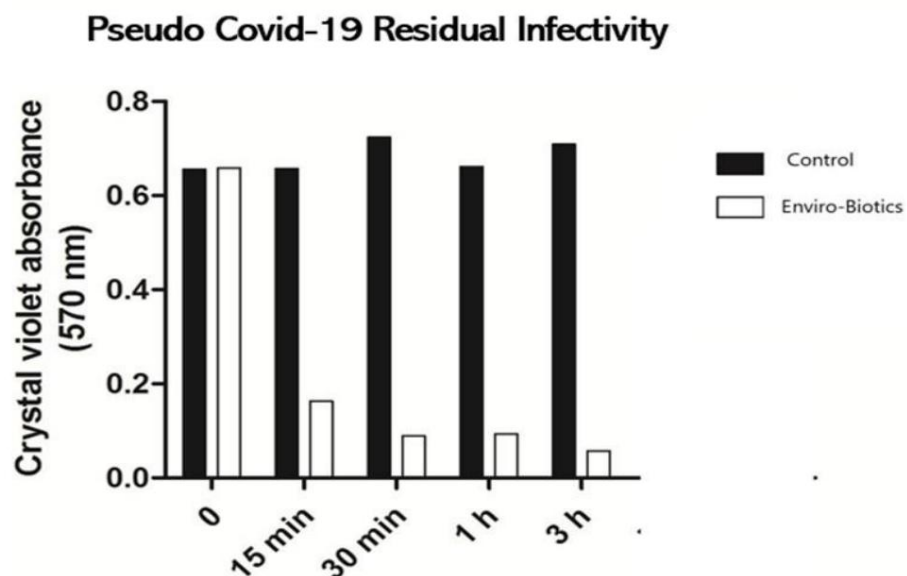




Fig. 7. Quantification du cristal violet par absorbance spectrophotométrique à 570 nm des cristaux dissous correspondant aux colonies formées.

Afin de valider l'efficacité antivirale de Bacillus Enviro-Biotics®, les cellules bactériennes ont été challengeées par une autre construction pseudoCovid-19. À l'instar de l'expérience qui a testé l'inactivation de l'EGFP-pseudoCovid-19, le LUC-pseudoCovid-19 s'est avéré sensible aux cellules Enviro-Biotics® Bacillus. Après 15 minutes d'incubation, la charge virale active a diminué de 70 %. Une incubation supplémentaire a désactivé les particules virales et atteint un taux de réduction de 99 % (une réduction Log d'environ 2) en 3 heures (Fig.8). Les résultats de ce deuxième test ont confirmé l'activité virucide de l'Enviro-Biotics® dès la première heure d'incubation, comme observé précédemment par la quantification par fluorescence réalisée dans le test avec EGFP-pseudoCovid-19.

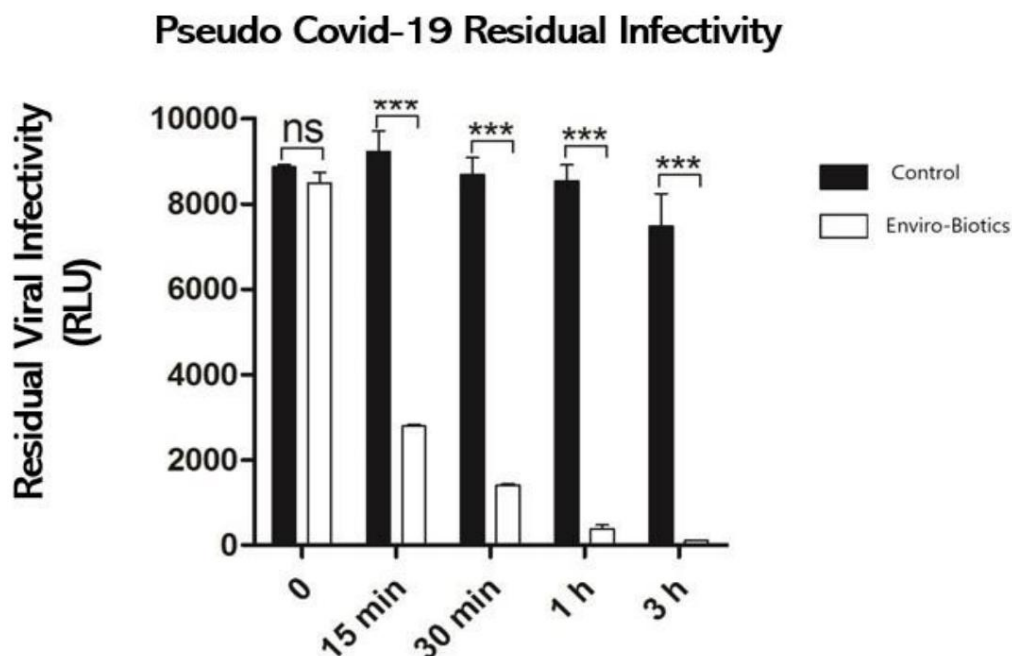


Fig. 8. Quantification par chimiluminescence de l'infectivité résiduelle LUC-Pseudo Covid-19 détectée sous forme d'activité luciférase, présentée sous forme d'unités relatives de luciférase (RLU). Chaque barre correspond à la moyenne  $\pm$  écart-type d'un triple. La valeur P a été calculée par test t non apparié.

## CONCLUSION

Les résultats rapportés ci-dessus indiquent l'activité antivirale significative d'Enviro-Biotics® Bacillus sur un pseudoCovid-19.

L'homologie complète du pseudoCovid-19 et du virus naturel SARS-CoV-2 confirme l'efficacité des cellules Enviro Biotics® Bacillus dans la désinfection des surfaces et des objets intérieurs.

## Declaration

CRS-DI.ME.S. is a facility of the Department of Experimental Medicine (DI.ME.S.) of the University of Genova, an Italian public organism.

Genova, 18<sup>th</sup> January 2021



Prof. Michela Tonetti  
(Director of DI.ME.S.)

